



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA/UIEM

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“HAPLOTIPOS DEL GEN *SLC2A2* EN POBLACIÓN
INFANTIL CON NIVELES DE GLUCOSA
ALTERADA EN AYUNO”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

P R E S E N T A:

MARÍA GUADALUPE RODRÍGUEZ GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. LORENZO SALGADO GOYTIA



CHILPANCINGO, GRO; SEPTIEMBRE 2013.

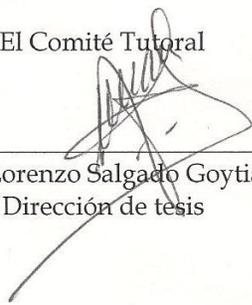


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

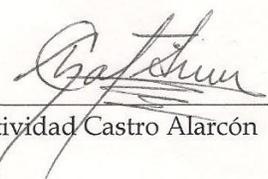
APROBACIÓN DE TESIS

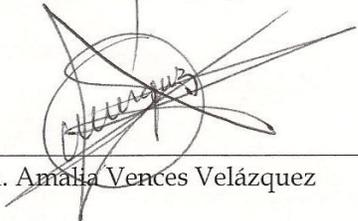
En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 14 días del mes de junio de dos mil trece, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Haplotipos del gen SLC2A2 en población infantil con niveles de glucosa alterada en ayuno", presentada por la alumna María Guadalupe Rodríguez García, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial


Dr. Lorenzo Salgado Goytia
Dirección de tesis


Dra. Isela Parra Rojas

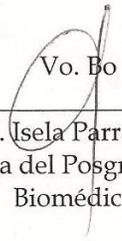

Dra. Natividad Castro Alarcón


Dra. Amalia Vences Velázquez


Dra. Silvia Esperanza Flores Martínez

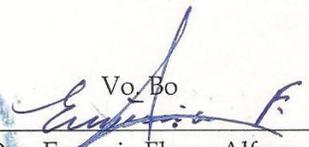


Vo. Bo


Dra. Isela Parra Rojas
Coordinadora del Posgrado en Ciencias Biomédicas



Vo. Bo


Dra. Eugenia Flores Alfaro
Directora de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación en Obesidad y Diabetes de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero.

Bajo la dirección de:
Dr. Lorenzo Salgado Goytia

Asesoría externa de:
Dra. Silvia Esperanza Flores Martínez

La asesoría de:
Dra. Isela Parra Rojas
Dra. Amalia Vences Velázquez
Dra. Natividad Castro Alarcón.

Durante el período en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, la C. María Guadalupe Rodríguez García, recibió beca del CONACYT.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme culminar un proyecto más en mi vida con el apoyo y presencia de mis seres queridos.

A mis padres que con su amor incondicional son uno de mis mayores motivos y fortalezas para cumplir cada una de las metas personales y profesionales, los amo.

A mis hermanos por su amor, apoyo y cuidado que me han brindado desde que llegue a su vida.

A mi esposo por ser parte de los momentos favorables y desfavorables para culminar esta etapa, por su amor, paciencia y apoyo. TAM9.

A cada uno de mis familiares y amigos, que son parte de mi vida y que me han brindado su aliciente, su ánimo y su cariño.

Al Dr. Lorenzo Salgado Goytia, por la confianza brindada para la realización de este proyecto, ya que supo los momentos adecuados en los cuáles estar al lado mío pero también me permitió ser independiente, así también agradezco los momentos en los que me motivo y guió con paciencia; además de considerarlo ejemplo de optimismo y sinceridad.

A mis asesoras de tesis: Dra. Isela Parra, por estar al pendiente de cada paso de este proyecto, por el ánimo que nos inculca como estudiantes para continuar, por su tiempo, amabilidad y sugerencias siempre oportunas. Dra. Silvia Flores, gracias por qué a pesar de la distancia dedicó el tiempo necesario a este trabajo para su revisión. Dra. Amalia Vences, por su tiempo, observaciones y por la amabilidad y disponibilidad que siempre tuvo para conmigo. Dra. Natividad Castro gracias por su tiempo y sugerencias durante las etapas de este proyecto.

A cada uno de los integrantes del L90D con quienes compartí los buenos resultados, así como los momentos de estrés cuando las cosas no resultaban, porque cada uno aportó sugerencias, me dio ánimo y apoyo. Así también mi estancia en el laboratorio me permitió conocer amistades que espero continúen. A ti Kari por tu apoyo en mi ingreso al laboratorio. A mis primeros estudiantes Rafa y Lili por su confianza para apoyarles en su proyecto y por su amistad. A ti Citlalli con quien compartí los momentos experimentales y de escritorio en nuestra mesa de trabajo en común, gracias por tu amistad dentro y fuera del laboratorio. A la química Aralia y la Dra. Paola por sus atenciones en lo requerido en el laboratorio.

A mis amigos y compañeros de generación por todos los momentos compartidos en los que requerimos del apoyo y el ánimo mutuo, dentro y fuera de la universidad. A mi asesora de seminario la Dra. Mónica Espinoza por su apoyo durante este proceso.

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS	i
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
MATERIAL Y MÉTODOS	8
RESULTADOS	13
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	24
REFERENCIAS	32

ABREVIATURAS

AF: Actividad Física.

DL: Desequilibrio de Ligamiento

DM2: Diabetes Mellitus tipo 2.

DPS: Del inglés *Finnish Diabetes Prevention Study*, Estudio Finlandés de Prevención de Diabetes.

GAA: Glucosa Alterada en Ayuno.

GLUT2: Del inglés *Glucose Transporter-2*, Transportador de Glucosa 2.

IMC: Índice de Masa Corporal.

Km: Constante de Michaelis-Menten.

PCR: Del inglés *Polymerase Chain Reaction*, Reacción en Cadena de la Polimerasa.

RFLP: Del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*, Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción.

SNP; Del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*, Polimorfismo de un Solo Nucleótido

TAG: Tolerancia Alterada a la Glucosa

1. RESUMEN

Introducción. La secreción de insulina por células β pancreáticas es estimulada por glucosa, la cual es internalizada a la célula por GLUT2. Polimorfismos en la región promotora (rs5393, rs5394) y codificadora (rs5400 y rs5404) del gen *SLC2A2*, que codifica para GLUT2, influyen en la secreción de insulina alterando los niveles de expresión e interviniendo en la función del transportador. **Objetivo.** Evaluar la asociación de los polimorfismos *rs5393*, *rs5394*, *rs5400* y *rs5404* y haplotipos del gen *SLC2A2* con niveles de glucosa alterada en ayuno y parámetros clínico-bioquímicos en población infantil guerrerense. **Material y Métodos.** Mediante PCR-RFLPs se genotificaron los polimorfismos en muestras de ADN de 150 niños: 100 con niveles de glucosa normal en ayuno y 50 con glucosa alterada en ayuno, se evaluaron parámetros clínico-bioquímicos. El análisis estadístico se realizó con el programa STATA 11 y la inferencia de haplotipos con SHEsis. **Resultados.** Entre los grupos estudiados se observaron diferencias en índice HOMA ($p < 0.05$) y una tendencia en IMC. Los polimorfismos se encuentran en EHW en esta población. Las frecuencias genotípicas son: rs5393 (A/A=95%, A/C=5%), rs5394 (C/C=91%, C/T=8%, T/T=1%), rs5400 (C/C=98%, C/T=2%), rs5404 (G/G=98%, G/A=2%). Las frecuencias haplotípicas son: ACCG=91%, ATCG=4.5%, CCCG=2.5%, ACTG=1%, ACCA=0.5%, ATCA=0.5%. Se observaron diferencias significativas al comparar las frecuencias genotípicas y alélicas del rs5400 entre los grupos estudiados. Al comparar la distribución genotípica y haplotípica de acuerdo a parámetros clínico-bioquímicos, los portadores del genotipo A/A (rs5393) y genotipo G/G (rs5404) mostraron niveles elevados de glucosa; portadores del genotipo C/C (rs5394) mostraron niveles elevados de triglicéridos e IMC; portadores del genotipo C/T (rs5400) presentaron niveles elevados de glucosa, insulina, índice HOMA e IMC, y portadores del haplotipo ACTG mostraron niveles elevados de glucosa. **Conclusiones.** El rs5400 y el haplotipo ACTG del gen *SLC2A2* se asocian con niveles alterados de glucosa en ayuno en población infantil guerrerense.

Palabras clave: *Transportador de glucosa 2, polimorfismos, secreción de insulina, población infantil, célula β pancreática.*

2. ABSTRACT

Introduction. Insulin secretion by pancreatic β cells is stimulated by glucose, which is transported into the cell by GLUT2. Promoter region (rs5393, rs5394) and coding region (rs5400 and rs5404) polymorphism of SLC2A2 gene, encoding GLUT2, influence insulin secretion by intervening in expression levels and transporter function. **Objective.** To evaluate the association of rs5393, rs5394, rs5400 and rs5404 polymorphisms and haplotypes of SLC2A2 gene with fasting altered glucose levels and clinical and biochemical parameters in children of Guerrero State. **Material and Methods.** By PCR-RFLP the polymorphisms were genotyped in DNA samples from 150 children: 100 with fasting normal glucose levels and 50 with impaired fasting glucose, we evaluated clinical and biochemical parameters. Statistical analysis was performed using STATA 11 and the inference of haplotypes by SHEsis. **Results.** Between groups, differences in HOMA index ($p < 0.05$) and a trend in BMI were observed. The polymorphisms were in HWE in the studied population. The genotype frequencies are: rs5393 (A/A=95%, A/C=5%), rs5394 (C/C=91%, C/T=8%, T/T=1%), rs5400 (C/C=98%, C/T=2%), rs5404 (G/G=98%, G/A=2%). Haplotype frequencies are: ACCG=91%, ATCG=4.5%, CCCG=2.5%, ACTG=1%, ACCA=0.5%, ATCA=0.5%. When comparing the study groups significant differences in genotype and allele frequencies to rs5400 polymorphism were observed. When comparing clinical and biochemical parameters according genotype distribution, was observed that carriers of rs5393 A/A and rs5404 G/G genotypes showed elevated levels of glucose, those carrying the rs5394 C/C genotype showed elevated levels of triglycerides and BMI, carriers of rs5400 C/T genotype showed altered levels of fasting glucose, insulin, HOMA index and BMI. The ACTG haplotype was associated with elevated levels of glucose. **Conclusions.** The rs5400 polymorphism and ACTG haplotype of SLC2A2 gene are associated with altered levels of fasting glucose in children from Guerrero.

Keywords: *glucose transporter 2, polymorphisms, insulin secretion, child population, pancreatic β cell.*

3. INTRODUCCIÓN

La diabetes es un grupo de alteraciones metabólicas caracterizadas por hiperglucemia, resultado de defectos en la secreción de insulina, acción de la insulina o ambas (ADA, 2012). La prevalencia de la diabetes tipo 2, se ha incrementado significativamente en población infantil, presentando en su desarrollo etapas intermedias de niveles de glucosa alterada en ayuno (GAA) y tolerancia alterada a la glucosa (TAG), esta fase es también conocida como prediabetes (Ebe D'Adamo, 2011). En México, se reporta que únicamente 0.7% de los adolescentes han recibido un diagnóstico previo de diabetes (ENSANUT, 2012). La secreción de insulina en células β pancreáticas es estimulada por la glucosa, siendo el principal mecanismo para la secreción, en este proceso la glucosa es transportada hacia el interior de las células β por el transportador de glucosa tipo 2 (GLUT2), y se metaboliza conllevando a un incremento en la concentración de ATP, a lo cual son sensibles los canales de iones K^+ generándose así el cierre del canal, y dando inicio a la despolarización de la membrana de las células β , así como también a la apertura de canales dependientes de iones Ca^{+} , lo cual permite la afluencia y un aumento de las concentraciones intracelulares del ión, con lo cual se induce la secreción de insulina en las células β (Seino *et al.*, 2011).

Las causas que contribuyen a la hiperglucemia pueden ser: 1) la disminución de la expresión de los transportadores GLUT, o 2) defectos funcionales en el proceso de la translocación intracelular de los transportadores GLUT (Czech *et al.*, 2010). El GLUT2 es codificado por el gen *SLC2A2*, el cual se localiza en el cromosoma 3 en la región q26.1-26.2 (Eny *et al.*, 2008). Este gen se expresa en hígado, páncreas, intestino, riñón y cerebro (Leturque *et al.*, 2009).

El GLUT2 es el único con alta constante de Michaelis-Menten (K_m) para la glucosa (17 mM), lo que asegura el rápido equilibrio de glucosa entre el espacio extracelular y el citosol de la célula (Thorens and Mueckler, 2010). En un experimento con ratones transgénicos que expresan un *loop* en el dominio citoplasmático de GLUT2, se observó que se inhibe la detección de glucosa, por la afectación del transportador, lo que conlleva al incremento de la ingesta en las porciones diarias de alimento. Esta

afectación se correlaciona con alteraciones en la activación del factor de transcripción cFos y niveles reducidos de orexina, por lo tanto se aportó evidencia de que GLUT2 es dependiente de la concentración de glucosa y que tiene un papel en la ingesta de alimento, convirtiéndolo en un potencial blanco terapéutico para enfermedades metabólicas (Stolarczyk *et al.*, 2010).

En modelos de ratones, se observa que la resistencia a la insulina se correlaciona con una pérdida de la función de GLUT2, los niveles permanecen altos en membrana apical de enterocitos y bajos en membrana basolateral. De manera normal, la insulina inhibe la absorción de carbohidratos en intestino para prevenir la elevación de niveles de glucosa sanguínea después del consumo de alimentos azucarados. Este mecanismo de protección, se pierde cuando se observa un estado de resistencia a la insulina (Tobin *et al.*, 2008). Por otra parte, se ha observado que en pacientes portadores de mutaciones en el gen que codifica para el GLUT2, no se presenta reabsorción de glucosa, llevando a una acumulación de glucógeno en células del túbulo renal (Stolarczyk *et al.*, 2007), causando el síndrome de Fanconi-Bickel, principalmente caracterizado por glucogenosis. Recientemente, el polimorfismo en la posición 638 C/T (rs5400) del gen *SLC2A2* ha sido asociado con la preferencia por alimentos azucarados (Leturque *et al.*, 2009).

Los defectos en la secreción de insulina se han asociado con diabetes tipo 2, la causa de este tipo de defectos puede ser la presencia de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*), en los genes que regulan la secreción de la insulina; uno de ellos es el gen del transportador GLUT2 (*SLC2A2*). Algunos polimorfismos en este gen se han descrito tanto en la región promotora en las posiciones -4849 A/C (rs5393) y en la posición -4876 C/T (rs5394), así como en los exones 3 y 5 en la posición 638 C/T (rs5400, T110I) y en la posición 903 G/A (rs5404, T198T), respectivamente (Fig. 1) (Kilpelainen *et al.*, 2007).

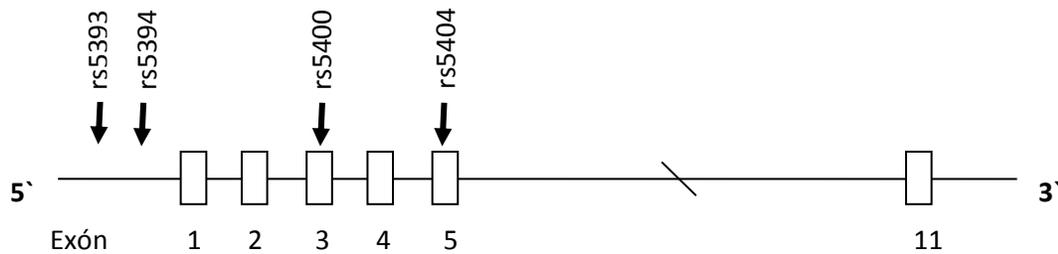


Fig. 1. SNPs en el gen SLC2A2 (Kilpelainen *et al.*, 2007).

El polimorfismo en la posición 638 C/T (rs5400) del gen SLC2A2, resulta en la sustitución del aminoácido treonina por isoleucina en el codón 110 (Thr110Ile). En población canadiense este polimorfismo se ha asociado con el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2, al observar que individuos con esta variación genética presentan una alta ingesta diaria de carbohidratos. Al comparar individuos portadores del alelo T vs portadores del genotipo C/C (Thr/Thr), los portadores del alelo T presentaron una significativa ingesta de carbohidratos, de acuerdo a la evaluación del registro de alimentos suministrados por 3 días en dos visitas separadas, (*visita 1*: 112 ± 9 vs. 86 ± 4 g/día, $p= 0.01$; *visita 2*: 111 ± 8 vs. 82 ± 4 g/día $p= 0.003$); esto mostró reproducibilidad en una segunda población, (131 ± 5 vs. 115 ± 3 g/día, $p= 0.007$). Las observaciones fueron consistentes entre adultos y adultos jóvenes, y en sujetos con DM2 de inicio temprano e individuos sanos (Eny *et al.*, 2008).

En un estudio longitudinal realizado en participantes del Estudio Finlandés de Prevención de Diabetes (DPS) los SNPs rs5393 y rs5400 fueron asociados con la progresión de TAG a DM2. La presencia del genotipo A/A del SNP rs5393 incrementa 3 veces más el riesgo de desarrollar DM2, en la población total en estudio (OR= 3.04, IC_{95%} 1.34-6.88, $p=0.008$). También se observó que el riesgo para desarrollar DM2 fue mayor en los portadores del genotipo A/A del grupo control (5.56 [1.78-17.39], $p= 0.003$) en comparación con el grupo de intervención (1.17 [0.35-3.89], $p= 0.820$). Considerando que en el grupo de intervención, se llevó a cabo un consejo nutricional individualizado e intensivo, así como incremento en la actividad física y reducción en el peso (Laukkanen *et al.*, 2005).

En esta misma población de estudio, se evaluó el efecto de la actividad física (AF) en la progresión de TAG a DM2; para lo cual se dio seguimiento por un promedio de 4.1 años a pacientes finlandeses con sobrepeso e IGT (n=479). Se evaluó la actividad física (AF) anualmente, mediante la realización de un cuestionario, y se observó la asociación de SNPs en los genes *SLC2A2* (GLUT2) y *ABCC8* (SUR1) con la progresión a DM2. A partir de los cuatro SNPs en el gen *SLC2A2*, se reportaron siete haplotipos: ACCG, CTTA, ACTG, CCTG, CCTA CTTG y ACTA. Solo el haplotipo **CTTA** constituido por los alelos polimórficos de los polimorfismos rs5393 A/C, rs5394 C/T, rs5400 C/T y rs5404 G/A, se asoció con el cambio de actividad física moderada a actividad física vigorosa, con diferencias estadísticamente significativas ($p= 0.021$). La interacción entre rs5393, rs5394 o rs5404 y el cambio de AF moderada a vigorosa, categorizada por terciles, fue estadísticamente significativa ($p=0.027$, $p=0.022$, $p=0.022$, respectivamente), por lo tanto el cambio de AF de moderada a vigorosa puede modificar el riesgo de desarrollar DM2, asociado con genes que regulan la secreción de insulina (*SLC2A2*, *ABCC8*) en personas con TAG (Kilpelainen *et al.*, 2007).

En un estudio realizado en población finlandesa y estadounidense (FUSION) donde se analizaron 222 genes candidatos, solo se observó asociación con el SNP rs5400 (Thr110Ile) en el gen *SLC2A2* en individuos con intolerancia a la glucosa ($p= 0.0065$) (Gaulton *et al.*, 2008).

En población finlandesa se analizaron 114 SNPs en 71 genes, solo se observó asociación de 12 SNPs en 9 genes con DM2, entre ellos el rs5400 (OR 2.98; IC_{95%} 1.31-6.79, $p= 0.014$) en el gen *SLC2A2* (Willer *et al.*, 2007).

En un estudio realizado en sujetos caucásicos del Reino Unido se analizaron 152 SNPs en 71 genes, y se encontró al SNP rs5400 en el gen *SLC2A2* asociado con DM2 (OR 1.49, $p=0.0059$), bajo un modelo dominante (Barroso *et al.*, 2003).

Debido a que estudios enfocados a la prediabetes, así como a la predisposición genética en su mayoría son enfocados a población adulta, resulta de interés para

este estudio evaluar la asociación de los haplotipos de los polimorfismos (rs5393, rs5394, rs5400 y rs5404) en el gen *SLC2A2*, el cual codifica para el transportador de glucosa 2 (GLUT2), con niveles alterados de glucosa en ayuno en población infantil guerrerense, para lo cual se determinó la frecuencia genotípica de dichos polimorfismos, la frecuencia de haplotipos, así como la asociación de estos polimorfismos y haplotipos con los niveles alterados de glucosa en ayuno.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Sujetos de estudio

A partir de un banco de ADN del Laboratorio de Investigación en Obesidad y Diabetes perteneciente a la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, se seleccionaron 150 muestras, de las cuales 50 corresponden a niños con niveles alterados de glucosa en ayuno y 100 con niveles normales de glucosa, originarios del estado de Guerrero.

Identificación del SNP (A/C) rs5393 en el gen SLC2A2

A partir del ADN genómico se amplificó un fragmento de 180 pb por la técnica de PCR, utilizando los siguientes iniciadores: sentido (5' -CAC AGT GAG CCA CTT GCT TAA GG-3'), antisentido (3'-ACT GCA CTC TGC TCC ACA GTT AA- 5'). La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 10 µl por muestra de ADN, que contiene: buffer 1x, MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 0.8 mM, 0.2 µM de cada oligonucleótido, 1.0 U de Taq polimerasa (Invitrogen) y 0.1 µg/µl de ADN. El programa de amplificación consistió de las siguientes etapas: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, desnaturalización del ADN a 94°C por 30 seg., alineamiento de iniciadores a 65°C por 30 seg., extensión del ADN a 72°C por 30 seg. (30 ciclos), y extensión final a 72°C por 3 min.

La genotipificación se llevó a cabo por la técnica RFLPs, usando 2 U de la enzima de restricción Msel (T^vTAA), a 37°C por 3 hrs. Obteniéndose los siguientes fragmentos de 140, 22 y 18 pb para el genotipo A/A; 162, 140, 22 y 18 pb para el genotipo A/C; y fragmentos de 162 y 18 pb para el genotipo C/C. Los genotipos se identificaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%, teñidos con nitrato de plata (Fig. 2).

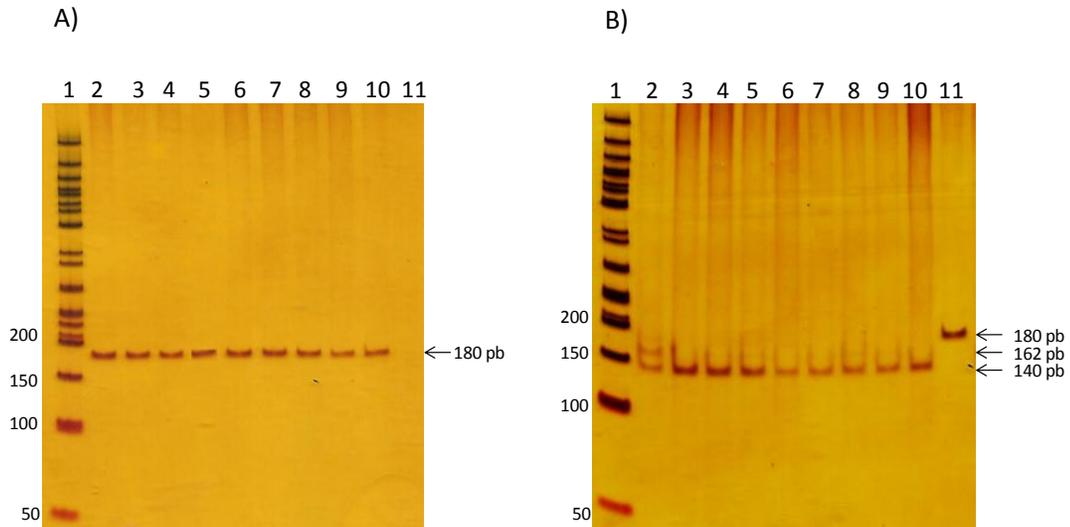


Figura 2. Identificación del polimorfismo A/C rs5393 en el gen *SLC2A2* en geles de poliacrilamida al 6%. A) Carril 1: Marcador de peso molecular (escala de ADN de 50 pb), carriles 2-10: productos de PCR de 180 pb, carril 11: control negativo. B) Identificación de los genotipos después de la digestión con la enzima *MseI*. Carril 1: Marcador de peso molecular (escala de ADN de 50 pb), carril 2: genotipo A/C, carriles 3-10: genotipo A/A y carril 11: producto PCR sin digerir.

Identificación del SNP (C/T) rs5394 en el gen *SLC2A2*. A partir del ADN genómico se amplificó un fragmento de 173 pb por la técnica de PCR utilizando los siguientes iniciadores: sentido (5'-CAA GTC AAC AAT GGT CTC CG-3') antisentido (3'- GAG CTG GTG AAA AGA GAA ATC T-5'). La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 10 μ l por muestra de ADN, que contiene: buffer 1x, $MgCl_2$ 9.5 mM, dNTPs 0.8 mM, 0.1 μ M de cada primer, 1.0 U de Taq polimerasa (Invitrogen) y 0.1 μ g/ μ l de ADN. El programa de amplificación consistió de las siguientes etapas: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, desnaturalización del ADN a 94°C por 30 seg., alineamiento de iniciadores a 57°C por 30 seg., extensión del ADN a 72°C por 30 seg. (30 ciclos), y extensión final 72°C por 3 min.

La genotipificación se llevó a cabo con la técnica RFLPs, usando 2 U de la enzima de restricción *MnlI* (CCTC(N)7 ν), a 37°C por 3 hrs. Obteniéndose los siguientes fragmentos de 98 y 75 pb para el genotipo C/C; 173, 98 y 75 pb para el genotipo C/T; y un solo fragmento de 173 pb para el genotipo T/T. Los genotipos se identificaron

por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%, teñidos con nitrato de plata (Fig. 3).

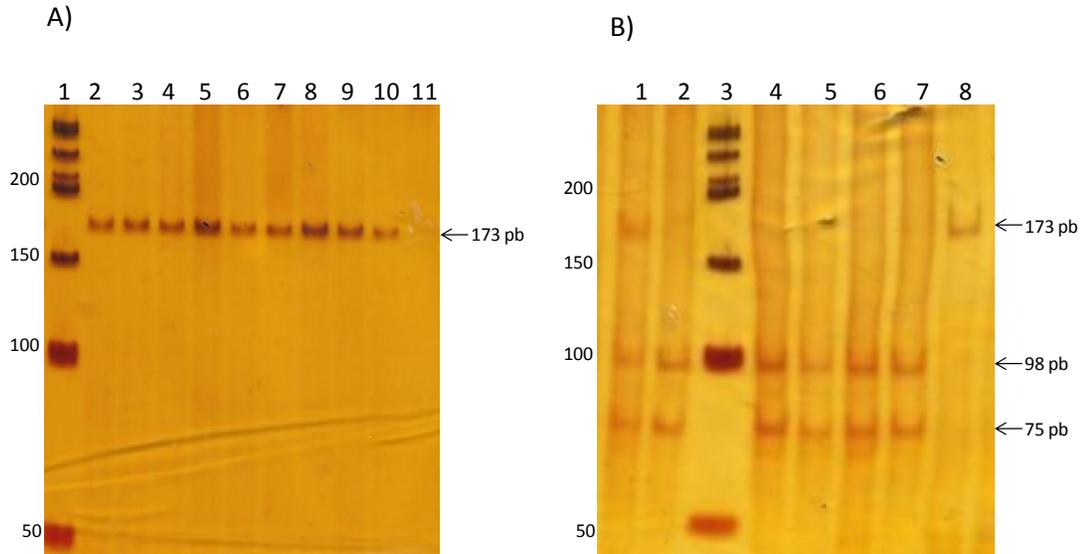


Figura 3. Identificación del polimorfismo rs5394 C/T en el gen *SLC2A2* en geles de poliacrilamida al 6%. A) Carril 1: Marcador de peso molecular (escalera de ADN de 50 pb), carriles 2-10: productos de PCR de 173 pb, carril 11: control negativo. B) Identificación de los genotipos después de la digestión con la enzima *Mnl*. Carril 3: Marcador de peso molecular (escalera de ADN de 50 pb), carriles 2,4-7: genotipo C/C, carril 1: genotipo C/T y carril 8: genotipo T/T.

Identificación del SNP (C/T) rs5400 en el gen *SLC2A2*. A partir del ADN genómico se amplificó un fragmento de 156 pb por técnica de PCR utilizando los siguientes iniciadores: sentido (5'-GAA CTG CCC ACA ATC TCA TAC TCA ATG AAC C-3') antisentido (3'-CCA CCC ACC AAA GAA TGA TGC GGT C -5'). La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 10 μ l por muestra de ADN, que contiene: buffer 1x, $MgCl_2$ 6.0 mM, dNTPs 0.8 mM, 0.2 μ M de cada primer, 1.0 U de Taq polimerasa (Invitrogen) y 0.1 μ g/ μ l de ADN. El programa de amplificación consistió de las siguientes etapas: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, desnaturalización del ADN a 94°C por 30 seg., alineamiento de iniciadores a 60°C por 30 seg., extensión del ADN a 72°C por 30 seg. (por 30 ciclos), y extensión final 72°C por 3 min.

La genotipificación se llevó a cabo con la técnica RFLPs, usando 2 U de la enzima de restricción *Ssi*I (C^vCGC), a 37°C por 3 hrs. Obteniéndose los siguientes fragmentos

de 134 y 22 pb para el genotipo C/C; 156, 134 y 22 pb para el genotipo C/T; y un solo fragmento de 156 pb para el genotipo T/T. Los genotipos se identificaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%, teñidos con nitrato de plata (Fig. 4).

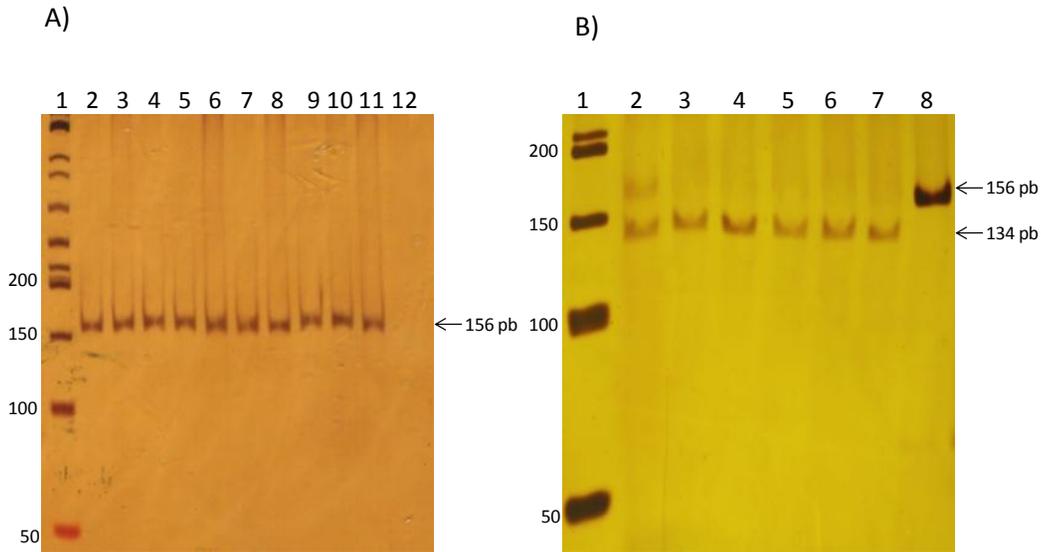


Figura 4. Identificación del polimorfismo rs5400 C/T en el gen *SLC2A2* en geles de poliacrilamida al 6%. A) Carril 1: Marcador de peso molecular (escalera de ADN de 50 pb), carriles 2-11: productos de PCR de 156 pb, carril 12: control negativo. B) Identificación de los genotipos después de la digestión con la enzima *Sst*I. Carril 1: Marcador de peso molecular (escalera de ADN de 50 pb), carril 2: genotipo C/T, carriles 3-7: genotipo C/C y carril 8: producto PCR sin digerir.

Identificación del SNP (G/A) rs5404 en el gen *SLC2A2*. A partir del ADN genómico se amplificó un fragmento de 130 pb por técnica de PCR utilizando los siguientes iniciadores: sentido (5'-TCA TGC AGG GCT ATT TTC AGG CC-3') antisentido (3'-TTT TAC CTG ACT AAT AAG AAT GCG CGT G -5'). La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 10 μ l por tubo, que contiene: buffer 1x, $MgCl_2$ 5.0 mM, dNTPs 0.8 mM, 0.3 μ M de cada primer, 1.0 U de Taq polimerasa (Invitrogen) y 0.1 μ g/ μ l de ADN. El programa de amplificación consistió de las siguientes etapas: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, desnaturalización del ADN a 94°C por 30 seg., alineamiento de iniciadores a 61°C por 30 seg., extensión del ADN a 72°C por 30 seg. (por 30 ciclos), y extensión final 72°C por 3 min.

La genotipificación se llevó a cabo con la técnica RFLPs, usando 3 U de la enzima de restricción *Bst*UI (CG^vCG), a 60°C por 3 hrs. Obteniéndose los siguientes fragmentos

de 106 y 24 pb para el genotipo G/G; 130, 106 y 24 pb para el genotipo G/A; y un solo fragmento de 130 pb para el genotipo A/A. Los genotipos se identificaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%, teñidos con nitrato de plata (Fig. 5).

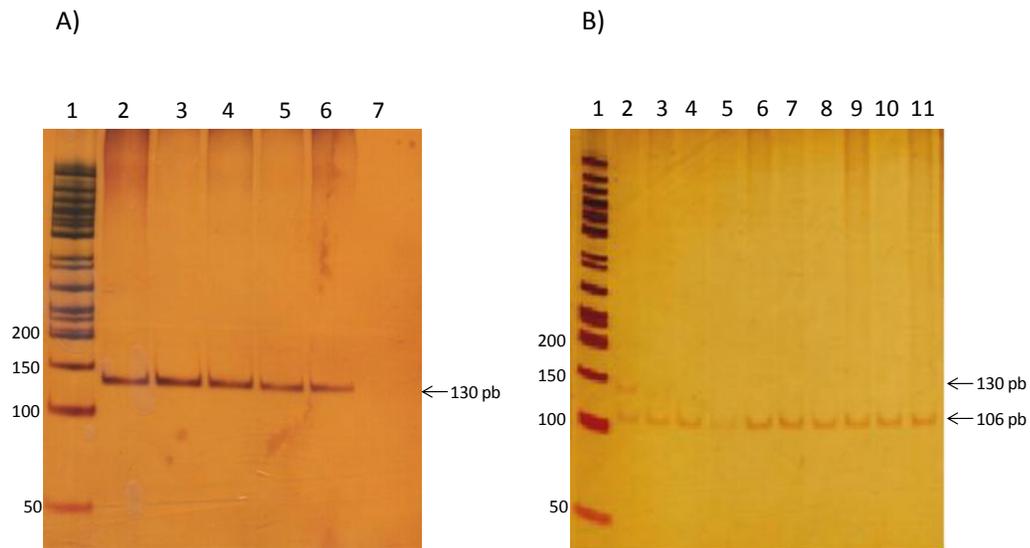


Figura 5. Identificación del polimorfismo rs5404 G/A en el gen *SLC2A2* en geles de poliacrilamida al 6%. A) Carril 1: Marcador de peso molecular (escala de ADN de 50 pb), carriles 2-6: productos de PCR de 130 pb, carril 7: control negativo. B) Identificación de los genotipos después de la digestión con la enzima *Bst*UI. Carril 1: Marcador de peso molecular (escala de ADN de 50 pb), carril 2: genotipo G/A, carriles 3-11: genotipo G/G.

Análisis estadístico.

Se llevó a cabo el análisis para cada una de las variables consideradas en el estudio, para las variables cuantitativas se utilizó mediana y rango intercuartil. Se realizó la prueba de Mann-Whitney para comparar las medianas entre grupos. Se consideró como estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$. Para variables cualitativas se realizó la prueba de X^2 . Se calculó la razón de momios (OR) empleando modelos de regresión lineal múltiple y logística. Para evaluar el equilibrio génico se aplicó la ecuación de Hardy Weinberg ($p > 0.05$). El análisis estadístico se llevó a cabo con el software STATA v.11. Para la inferencia de los haplotipos se utilizó el software SHEsis.

5. RESULTADOS

El presente trabajo tiene como finalidad evaluar si existe asociación de los haplotipos conformados por los polimorfismos rs5393, rs5394, rs5400 y rs5404 en el gen *SLC2A2*, que codifica para la proteína transportadora de glucosa 2 (GLUT2), con los niveles alterados de glucosa en ayuno en población infantil guerrerense, para lo cual se realizó la genotipificación de cada uno de los cuatro polimorfismos estudiados en 150 muestras de ADN, de las cuales 100 correspondieron a niños con niveles normales de glucosa en ayuno (controles) y 50 niños con niveles alterados de glucosa en ayuno (casos).

Del total de la población, 74 (49%) corresponden al género masculino y 76 (51%) al género femenino, la edad promedio entre los grupos estudiados fue de 9 años, sin que se observaran diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$) (Cuadro 1).

Al analizar las medidas somatométricas y clínicas entre los grupos de estudio, se observó que los antecedentes de obesidad y antecedentes de diabetes, así como los niveles de insulina y triglicéridos, no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$). En relación con el IMC se observaron valores más elevados en los casos, con una mediana de 21 (17-24) kg/m^2 en comparación con una mediana de 18 kg/m^2 para el grupo control, con tendencia a una diferencia estadísticamente significativa, mientras que para los valores del índice HOMA se muestra una mediana de 1.85 (1.20-3.12) para el grupo de casos y una mediana de 1.37 (0.58-2.55) para el grupo control, observándose diferencias estadísticamente significativas entre grupos de estudio ($p= 0.0081$) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características somatométricas y clínicas de la población infantil de Chilpancingo, Guerrero.

Variables	Total n=150	Glucosa alterada en ayuno n= 50	Glucosa normal en ayuno n=100	Valor p
Edad (años)	9 (7-10)	9 (8-10)	9 (7-10)	0.15 °
Género				
Masculino	74 (49)	29 (42)	45 (45)	0.13 *
Femenino	76 (51)	21 (58)	55 (55)	
Antecedentes obesidad				
No	66 (44)	22 (44)	44 (44)	1.0 *
Si	84 (56)	28 (56)	56 (56)	
Antecedentes diabetes				
No	86 (57)	33 (66)	53 (53)	0.13 *
Si	64 (43)	17 (34)	47 (47)	
IMC (kg/m²)				
<24.9	19 (16-23)	21 (17-24)	18 (16-23)	0.05 °
24.9-28.29	127 (85)	39 (78)	88 (88)	
≥ 28.3	16 (10)	7 (14)	9 (9)	0.22*
> 28.3	7 (5)	4 (8)	3 (3)	
Insulina µU/ml				
<4.52	7(4-12)	7(5-12)	6 (2-11)	0.10 °
4.52-9.54	51 (34)	11 (22)	40 (40)	
>9.54	49 (32.7)	20 (40)	29 (29)	0.08 *
>9.54	50 (33.3)	19 (38)	31 (31)	
Triglicéridos (mg/dL)				
<150	92 (64-150)	97 (63-150)	92 (64-144)	0.83 °
>150	112 (75)	36 (72)	76 (76)	
>150	38 (25)	14 (28)	24 (24)	0.59*
HOMA	1.50 (0.76-2.80)	1.85 (1.20-3.12)	1.37 (0.58-2.55)	0.0081°

Datos proporcionados en n (%), medianas (p25-75), valor p <0.05 (*X², °Mann Whitney)

Al analizar las frecuencias genotípicas y alélicas de los cuatro SNPs del gen *SLC2A2* estudiados, se observó que para el polimorfismo rs5393, en el grupo control el genotipo A/A se encontró con una frecuencia del 95% y el genotipo A/C con una frecuencia de 5%, mientras que en el grupo de casos solo se observó el genotipo A/A, lo que representa una frecuencia del 100%. Para el polimorfismo rs5394, en el grupo control el genotipo C/C se observó con una frecuencia del 91%, el genotipo C/T con una frecuencia del 8% y con 1% el genotipo T/T y en el grupo de casos el genotipo C/C se observó con una frecuencia del 90% y el genotipo C/T con un 10%. Para el polimorfismo rs5404, en el grupo de casos el genotipo G/G se observó con una frecuencia del 100%, mientras que en el grupo control el genotipo G/G se encontró con una frecuencia del 98% y el genotipo G/A con 2%. Al comparar las frecuencias genotípicas y alélicas entre los grupos de estudio, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) (Cuadro 2). Sin embargo, en relación con el polimorfismo rs5400, si se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.017$ y $p = 0.018$, respectivamente) al comparar las frecuencias genotípicas y alélicas entre los grupos de estudio, debido a que si se observó una distribución diferencial, ya que en el grupo de casos el genotipo C/C se presentó con un 88% y el genotipo C/T con un 12%, y en el grupo control el genotipo C/C se presentó en un 98% y el genotipo C/T en un 2%, y el alelo C se observó con una frecuencia del 94% y el alelo T del 6% en el grupo de casos, mientras que en el grupo control el alelo C se presentó con una frecuencia de 99% y el alelo T del 1% (cuadro 2).

Con la aplicación de la ecuación de Hardy Weinberg, se determinó el equilibrio génico de los cuatro SNPs (rs5393, rs5394, rs5400 y rs5404) en estudio ($X^2 = 0.06$ $p = 0.79$, $X^2 = 2.49$ $p = 0.1$, $X^2 = 0.010$ $p = 0.92$, $X^2 = 0.010$ $p = 0.92$, respectivamente) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos rs5393 A/C, rs5394 C/T, rs5400 C/T y rs5404 G/A en el gen SLC2A2 en la población infantil de Chilpancingo, Guerrero.

	Total (n= 150)	Glucosa alterada en ayuno (n=50)	Glucosa normal en ayuno (n=100)	Valor p*
rs5393 A/C				
Genotipos				0.17
AA	145 (97)	50 (100)	95 (95)	
AC	5 (3)	0 (0)	5 (5)	
CC	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Alelos				0.17
A	295 (98)	100 (100)	195 (97)	
C	5 (2)	0 (0)	5 (3)	
rs5394 C/T				
Genotipos				0.84
CC	136 (90)	45 (90)	91 (91)	
CT	13 (9)	5 (10)	8 (8)	
TT	1 (1)	0 (0)	1 (1)	
Alelos				1.0
C	285 (95)	95 (95)	190 (95)	
T	15 (5)	5 (5)	10 (5)	
rs5400 C/T				
Genotipos				0.017
CC	142 (95)	44 (88)	98 (98)	
CT	8 (5)	6 (12)	2 (2)	
TT	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Alelos				0.018
C	292 (97)	94 (94)	198 (99)	
T	8 (3)	6 (6)	2 (1)	
rs5404 G/A				
Genotipos				0.55
GG	148 (99)	50 (100)	98 (98)	
GA	2 (1)	0 (0)	2 (2)	
AA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Alelos				0.55
G	298 (99)	100 (100)	198 (99)	
A	2 (1)	0 (0)	2 (1)	

*X² con prueba exacta de Fisher.

EHW (rs5393 X²=0.06 p=0.79; rs5394 X²=2.49 p=0.1; rs5400 X²=0.010 p=0.92 y rs5404 X²=0.010 p=0.92)

Al comparar la distribución de genotipos del polimorfismo rs5393 de acuerdo con los valores somatométricos y bioquímicos (edad, género, antecedentes de obesidad, antecedentes de diabetes, IMC, índice HOMA y niveles de glucosa, insulina y triglicéridos), solo se observaron diferencias significativas para los niveles de glucosa

($p=0.01$), siendo éstos mayores en los portadores del genotipo A/A; sin embargo, tanto en el IMC como en los niveles de insulina a pesar de no presentar diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) entre genotipos, se observan niveles más elevados en los portadores del genotipo A/C; mientras que los niveles de triglicéridos son mayores para portadores del genotipo A/A, en comparación con el genotipo A/C (cuadro 3), posteriormente, se analizaron estratificando por casos y controles (datos no mostrados), sin que se observaran diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$).

Cuadro 3. Características generales de acuerdo a los genotipos del polimorfismo rs5393 del gen SLC2A2 en población infantil de Chilpancingo, Guerrero.

Variable	A/A (n=145)	A/C (n=5)	Valor p
Edad (años)	9 (7-10)	9 (8-11)	0.64 °
Género			
Masculino	72 (49.7)	2 (40)	1.0 *
Femenino	73 (50.3)	3 (60)	
Antecedentes obesidad			
No	64 (44.1)	2 (40)	1.0 *
Si	81 (55.9)	3 (60)	
Antecedentes diabetes			
No	83 (57.2)	3 (60.0)	1.0 *
Si	62 (42.8)	2 (40.0)	
IMC (kg/m²)	18.9 (16.1-23.3)	23.3 (18.1-23.6)	0.21 °
<24.9	123(85)	4 (80)	
24.9-28.2	16 (11)	0 (0)	0.29 *
≥ 28.3	6 (4)	1 (20)	
Glucosa (mg/dL)	97 (89-101)	84 (81-92)	0.01°
Insulina µU/ml	6.6 (3.8-11.7)	10.79 (2.6-13.1)	0.67 °
<4.52	49 (33.8)	2 (40)	
4.52-9.54	49 (33.8)	0 (0)	0.24 *
>9.54	47 (32.4)	3 (60)	
Triglicéridos (mg/dL)	93 (64-150)	84 (64-87)	0.27 °
<150	107 (74)	5 (100)	0.33 *
>150	38 (26)	0 (0)	
HOMA	1.45(0.76-2.80)	2.45 (0.60-2.52)	0.94

Datos proporcionados en: n (%), medianas (p25-75), valor p <0.05 (*X², °Mann Whitney)

En lo que respecta al polimorfismo rs5394, mediante un modelo dominante (C/C vs C/T+T/T) se realizó la comparación de los parámetros somatométricos y bioquímicos de acuerdo a cada uno de los genotipos, y solo para el IMC y los niveles de triglicéridos se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p= 0.03$, $p=0.008$, respectivamente), siendo mayores para los portadores del genotipo C/C. En cuanto a los niveles de insulina, de los individuos que presentan el alelo T en estado homocigoto o heterocigoto (C/T+T/T), el 43% presentan hipoinsulinemia; para el índice HOMA se observan valores mayores en los portadores del genotipo C/C, sin que se observen diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) (cuadro 4).

Cuadro 4. Características generales por genotipos del polimorfismo rs5394 del gen SLC2A2 mediante un modelo dominante (C/C vs C/T+T/T) en población infantil de Chilpancingo, Guerrero.

Variable	C/C (n=136)	C/T + T/T (n=14)	Valor p
Edad (años)	9 (8-10)	9 (7-10)	0.68 °
Género			
Masculino	69 (49)	5 (64)	0.40*
Femenino	67 (51)	9 (36)	
Antecedentes obesidad			
No	57 (42)	9 (64)	0.15 *
Si	79 (58)	5 (36)	
Antecedentes diabetes			
No	79 (58)	7 (50.0)	0.56 *
Si	57 (42)	7 (50.0)	
IMC (kg/m²)	19 (16-24)	16 (16-19)	0.03 °
<24.9	114 (84)	13 (93)	
24.9-28.2	15 (11)	1 (7)	
≥ 28.3	7 (5)	0 (0)	1.0 *
Glucosa (mg/dL)	96 (89-100)	98 (87-103)	0.81 °
Insulina μU/ml	7 (3-12)	5 (4-7)	0.35 °
<4.52	45 (33)	6 (43)	0.60 *
4.52-9.54	44 (32)	5 (36)	
>9.54	47 (35)	3 (21)	
Triglicéridos (mg/dL)	95 (68-150)	65 (57-82)	0.008°
<150	98 (72)	14 (100)	0.02 *
>150	38 (28)	0 (0)	
HOMA	1.65 (0.71-2.88)	1.30 (0.89-1.77)	0.37 °

Datos proporcionados en: n (%), medianas (p25-75), valor p <0.05 (*X², °Mann Whitney).

Al analizar las variables clínico-bioquímicas de acuerdo a los genotipos del polimorfismo rs5400, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para el IMC, índice HOMA y niveles de glucosa e insulina, observando los valores más altos en los individuos heterocigotos C/T (cuadro 5).

Cuadro 5. Características generales de acuerdo a los genotipos del polimorfismo rs5400 del gen SLC2A2 en población infantil de Chilpancingo, Guerrero.

Variable	C/C (n=142)	C/T (n=8)	Valor p
Edad (años)	9 (7-10)	11 (10-11)	0.015
Género			
Masculino	69 (49)	5 (62.5)	0.49 *
Femenino	73 (51)	3 (37.5)	
Antecedentes obesidad			
No	63 (44)	3 (37.5)	1.0 *
Si	79 (56)	5 (62.5)	
Antecedentes diabetes			
No	83 (58)	3 (37.5)	0.29 *
Si	59 (42)	5 (62.5)	
IMC (kg/m²)			
<24.9	18.75 (16-23.1)	24.05 (20.1-24.95)	0.032°
24.9-28.2	122 (86)	5 (62.5)	
≥ 28.3	13 (9)	3 (37.5)	0.08 *
	7 (5)	0 (0)	
Glucosa (mg/dL)	96 (88-100)	103(97.5-112.5)	0.07°
Insulina μU/ml			
<4.52	6.6 (3.2-11.5)	13.2 (8.2-15.3)	0.036°
4.52-9.54	50 (35)	1 (12.5)	
>9.54	48 (34)	1 (12.5)	0.06 *
	44 (31)	6 (75)	
Triglicéridos (mg/dL)			
<150	92 (64-144)	130 (66-188)	0.37 °
>150	108 (76)	4 (50)	0.11 *
	34 (24)	4 (50)	
HOMA	1.42 (0.72-2.61)	3.16 (2.24-4.25)	0.020°

Datos proporcionados en: n (%), medianas (p25-75), valor p <0.05 (*X², °Mann Whitney)

Para el polimorfismo rs5404, se observan diferencias significativas ($p=0.03$) para el IMC con una mediana de 18.9 kg/m² para portadores del genotipo G/G, en comparación con 14.3 kg/m² para portadores del genotipo G/A; también se

observaron diferencias ($p=0.02$) en los niveles de glucosa con valores de 97 mg/dl (89-101) en portadores del genotipo G/G a diferencia de 71 mg/dl (68-73) para portadores del genotipo G/A (Cuadro 6).

Cuadro 6. Características generales de acuerdo a los genotipos del polimorfismo rs5404 del gen SLC2A2 en población infantil de Chilpancingo, Guerrero.

Variable	G/G (n=148)	G/A (n=2)	Valor p
Edad (años)	9 (8-10)	6.5 (6-7)	0.06 °
Género			
Masculino	73 (49)	1 (50)	1.0 *
Femenino	75 (51)	1 (50)	
Antecedentes obesidad			
No	64 (43)	2 (100)	0.19 *
Si	84 (57)	0 (0)	
Antecedentes diabetes			
No	84 (57)	2 (100)	0.51 *
Si	64 (43)	0 (0)	
IMC (kg/m²)			
<24.9	18.9 (16.2-23.4)	14.3 (14.1-14.4)	0.03°
24.9-28.2	125 (84)	2 (100)	
≥ 28.3	16(11)	0 (0)	1.0 *
	7 (5)	0 (0)	
Glucosa (mg/dL)	97 (89-101)	71(68-73)	0.02°
Insulina μU/ml			
<4.52	6.6 (3.3-11.8)	10.2 (7.1-13.3)	0.40 °
4.52-9.54	51 (35)	0 (0)	
>9.54	48 (32)	1 (50)	0.54 *
	49 (33)	1 (50)	
Triglicéridos (mg/dL)			
<150	93 (64-150)	58 (49-67)	0.14 °
>150	110 (74)	2 (100)	
	38 (26)	0 (0)	1.0 *
HOMA	1.50 (0.74-2.82)	1.80 (1.19-2.41)	0.90 °

Datos proporcionados en n (%), medianas (p25-75), valor p <0.05 (*X², °Mann Whitney)

Dado que se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs5400, y también con los niveles de glucosa de acuerdo a los genotipos, se evaluó la asociación de este SNP con las

distintas variables consideradas en el estudio. Observando asociación del SNP con glucosa alterada en ayuno (OR 6.68, IC_{95%} 1.30-34.42, p= 0.02) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Asociación de los genotipos del polimorfismo rs5400 con características somatométricas y bioquímicas de la población de estudio.

Variables	CC n (%)	CT n (%)	Modelo Crudo			Modelo Ajustado°		
			OR	IC _{95%}	P	OR	IC _{95%}	p
Antec. obesidad								
NO	63 (44)	3 (38)	1*					
SI	79 (56)	5 (63)	1.33	0.31-5.77	0.70	1.45	0.32-6.55	0.63
Antec. diabetes								
NO	83 (58)	3 (37)	1*					
SI	59 (42)	5 (63)	2.34	0.54-10.19	0.26	2.18	0.48-9.87	0.31
IMC (kg/m²)								
<24.9	122 (86)	5 (63)	1*					
24.9-28.2	13 (9)	3 (38)	5.63	1.20-26.30	0.03	4.98	0.99-25.13	0.05
>o = 28.3	7 (5)	0 (0)	3.48	0.06-37.82	0.31	3.48	0.06-37.82	0.31
Glucosa (mg/dl)								
Normal	98 (69)	2 (25)	1*					
Alterada	44 (31)	6 (75)	6.68	1.30-34.42	0.02	6.36	1.18-34.37	0.03
Insulina µU/ml								
4.52-9.54	48 (34)	1 (13)	1*					
<4.52	50 (35)	1 (13)	0.96	0.05-15.78	0.98	1.26	0.73-21.88	0.87
>9.54	44 (31)	6 (74)	6.54	0.75-56.53	0.09	6.42	0.72-57.14	0.10
Triglicéridos (mg/dl)								
<150	108 (76)	4 (50)	1*					
>150	34 (24)	4 (50)	3.17	0.75-13.38	0.12	2.63	0.59-11.70	0.20
HOMA								
1.06-2.29	49 (35)	1 (13)	1*					
< 1.06	49 (35)	1 (13)	1	0.06-16.44	1.0	1.42	0.82-24.69	0.81
>2.29	44 (30)	6 (74)	6.68	0.77-57.69	0.08	6.76	0.76-60.20	0.09

*Categoría de referencia. OR (odds ratio) con un IC (intervalo de confianza) del 95% y un valor de p significativo <0.05. °Ajustado por edad y sexo.

De acuerdo a la posición de los cuatros SNPs se realizó la construcción de haplotipos (Figura 6).

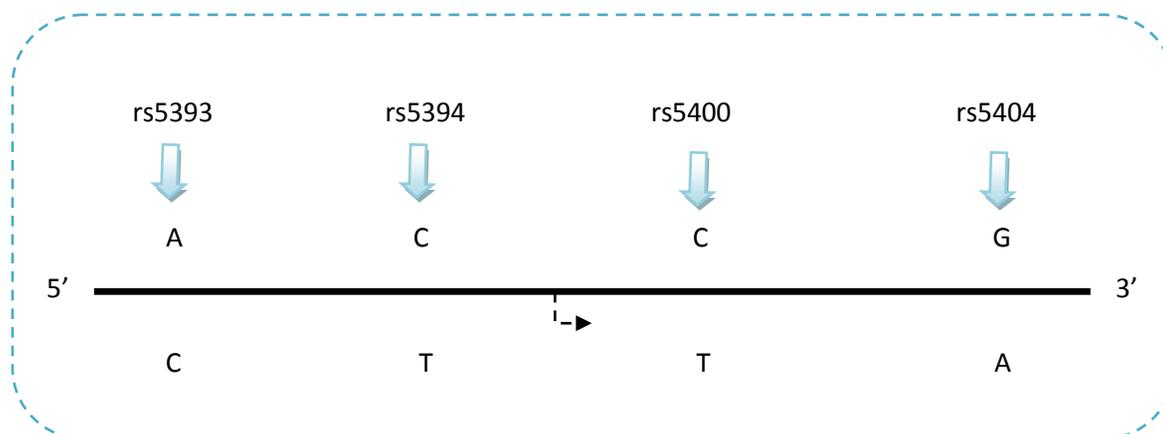


Fig 6. SNPs A/C (rs5393), C/T (rs5394), C/T (rs5400) y G/A (rs5404) en el gen SLC2A2.

Debido a que cada SNP es bialélico ($2^4=16$) es posible obtener 16 combinaciones alélicas (haplotipos), sin embargo mediante el programa SHEsis solo se infirieron 6 haplotipos (ACCG, ATCG, ACTG, CCCG, ACCA, ATCA), de los cuales solo el haplotipo ACTG se asocia con los niveles alterados de glucosa en ayuno (OR 6.10, IC_{95%} 1.21-30.78, $p= 0.01$), (Cuadro 8).

Cuadro 8. Asociación de los haplotipos de los polimorfismos rs5393, rs5394, rs5400 y rs5404 del gen SLC2A2 en la población de estudio.

Haplotipos	Casos (%)	Controles (%)	Modelo crudo		
			OR	IC (95%)	p
ACCG*	0.89	0.910	1.0*		
ATCG	0.05	0.045	1.07	0.35-3.27	0.91
ACTG	0.06	0.010	6.10	1.21-30.78	0.01
CCCG		0.025	ND	ND	ND
ACCA		0.005	ND	ND	ND
ATCA		0.005	ND	ND	ND

*Categoría de referencia. OR (odds ratio) con un IC (intervalo de confianza) del 95% y un valor de p significativo <0.05.

Los polimorfismos evaluados presentaron un alto desequilibrio de ligamiento (DL), lo cual indica que no se segregan de manera independiente, con excepción de los polimorfismos rs5394 y rs5404 (cuadro 9).

Cuadro 9. Desequilibrio de ligamiento (D') entre los SNPs de *SLC2A2*.

<i>SLC2A2</i>	rs5394	rs5400	rs5404
rs5393	1.000	1.002	1.009
rs5394		1.000	0.446
rs5400			1.005

6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Defectos en la liberación de insulina por la célula β pancreática pueden dar como resultado un desorden en la regulación de los niveles de glucosa, al reducir la eficiencia de la entrada de glucosa y afectar los niveles de secreción de insulina. Se sugiere que determinantes genéticos y ambientales puede conllevar a esta falla, por lo que es necesario el conocimiento de las bases genéticas de este proceso y de la actividad celular (Kahn *et al.*, 2006). Una de las proteínas que participan en este proceso es GLUT2 codificada por el gen *SLC2A2* (Eny *et al.*, 2008), en este gen se han descrito polimorfismos de un solo nucleótido (rs5393, rs5394, rs5400, rs5404), que se asocian con los niveles alterados de glucosa en ayuno, fase denominada prediabética, antecesora al desarrollo de DM2 (Kilpelainen *et al.*, 2007, Ebe D'Adamo, 2011).

Al evaluar las características somatométricas y clínicas de la población infantil en el grupo de glucosa alterada en ayuno y el grupo de glucosa normal en ayuno se observó tendencia a una diferencia estadísticamente significativa en el IMC, presentando valores mayores para el grupo de glucosa alterada 21 kg/m^2 (17-24), se sabe que el sobrepeso y la obesidad juegan un papel importante en la fisiopatología y progresión hacia DM2, ya que la adiposidad visceral es un factor importante de resistencia a insulina (Hayashi *et al.*, 2008), dicha resistencia puede ser evaluada con el índice HOMA parámetro que presento diferencias entre los grupos de estudio, ya que en el grupo de casos los valores fueron mayores 1.85 mg/dl (1.20-3.12); sin embargo, el incremento en la resistencia a insulina puede compensarse mediante un aumento en la secreción de la hormona (Cnop *et al.*, 2007), esto en presencia de una adaptación normal de la célula β ante dicho fenómeno.

Al estratificar los niveles de insulina por terciles, no se observaron diferencias entre los grupos, sin embargo, se observa que un 38% de los casos presentan niveles de hiperinsulinemia ($>9.54 \text{ } \mu\text{U/ml}$), lo cual refleja un intento por compensar los niveles elevados de glucosa, por otro lado un 22% de los casos presentan hipoinsulinemia

(<4.51 μ U/ml), lo cual es indicativo de una falla en el incremento de secreción de insulina llevando a niveles de glucosa alterada con una posible progresión hacia DM2 (Festa *et al.*, 2006). Algunos individuos tienen reducida secreción de insulina o reducida masa de células β pero niveles normales de glucosa, como se observa en el 40% del grupo control, ya que la sensibilidad a la insulina es suficiente para mantener la homeostasis de la glucosa (Fonseca, 2009).

En lo que respecta a población infantil, no se cuentan con valores establecidos para insulina, en los estudios realizados en población infantil mexicana como el realizado por Méndez-Castillo y colaboradores en el 2007, se reportan niveles de insulina de 7.8 ± 1.1 μ U/ml en niños y de 10.1 ± 1.1 μ U/ml en niñas en edad escolar de San Luis Potosí, indicando que las cifras de hiperinsulinemia en esta población son altas, especialmente en el género femenino; siendo estas cifras similares a las obtenidas en este estudio, las cuales corresponde a niveles de 7 μ U/ml (4-12). Mientras que en un estudio realizado en Durango en población de 6 a 9 años de edad, se observó que las concentraciones séricas de insulina (peso normal 10.74 ± 15.31 , sobrepeso 24.37 ± 28.57) y el grado de resistencia (peso normal 2.54 ± 3.84 , sobrepeso 5.66 ± 6.85) fue mayor en los niños escolares con obesidad o sobrepeso respecto a los niños con peso normal ($p < 0.05$) (González *et al.*, 2010). En población de Tulancingo, Hidalgo se establecieron valores de insulina de 5.2 ± 3.8 μ U/ml para los individuos con normopeso (Arias, 2005), los cuales son menores a los observados en la población de este estudio.

En un estudio realizado en población adulta de 20 a 65 años de edad, se establecen los valores normales de insulina sérica de una persona sin sobrepeso, con metabolismo normal de la glucosa y sin dislipidemias de 8.7 ± 3.2 μ U/ml (Vázquez *et al.*, 2003), estos datos son ligeramente mayores a los de la población infantil de Chilpancingo, Guerrero (Cuadro 1); sin embargo, existe una diferencia en cuanto a la edad de la población.

En esta investigación no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs rs5393, rs5394 y rs5404. Para el SNP rs5393 se observó con mayor frecuencia el genotipo A/A con un 95%, datos similares se muestran en el estudio realizado por Laukkanen en el 2005, en población finlandesa donde este genotipo se reporta en un 88%. El genotipo homocigoto C/C del SNP rs5394, fue el genotipo predominante con una frecuencia de 91% del total de la población, el alelo T se presentó en el 5% de la población y el alelo C en un 95%, esto es similar a lo reportado por Kilpelainen en el 2007, quien reporta el alelo C con un 91% y el alelo T con un 9%. En este mismo estudio se reporta un 10% para el alelo A del SNP rs5404, mientras que en este estudio se presentó en un 1%, menor a lo reportado por Kilpelainen; predominando el genotipo G/G con un 98% y el heterocigoto G/A con un 2%.

A diferencia de los tres SNPs anteriores, para el SNP rs5400 se mostraron diferencias en cuanto a las frecuencias genotípicas entre grupos de estudio, ya que el genotipo C/T se presentó en el 12% del grupo de glucosa alterada en ayuno en comparación con un 2% en el grupo de glucosa normal en ayuno; de igual manera se presentaron diferencias en las frecuencias alélicas con un 6% para el alelo T en el grupo de glucosa alterada; lo cual indica que el riesgo para niveles alterados de glucosa está dado por la presencia de este alelo, mientras que Kilpelainen reporta un 13% para el alelo T.

Las frecuencias genotípicas reportadas en el presente estudio se encuentran en equilibrio génico ($p > 0.05$), lo que indica que las frecuencias génicas se mantienen constantes de generación en generación, ya que en la población se cumple con ciertas condiciones, se reproduce aleatoriamente, la población es suficientemente grande, no existe migración, mutación o selección natural (Iniesta *et al.*, 2005).

Posteriormente, se analizaron las variables somatométricas y bioquímicas de acuerdo a la distribución de genotipos, para el SNP rs5393 se observaron diferencias en los niveles de glucosa con valores de 97 (89-101mg/dl) para portadores del

genotipo A/A y valores de 84 (81-92 mg/dl) para portadores del genotipo A/C, estos datos son similares al estudio realizado en población finlandesa en sujetos obesos con glucosa alterada en ayuno, donde el genotipo A/A incrementa el riesgo de DM2 (OR 3.04, IC_{95%} 1.34-6.88, p= 0.008) (Laukkanen *et al.*, 2005). Sin embargo, esto difiere del estudio realizado de igual manera en población finlandesa donde se evaluó la actividad física observando que los portadores del genotipo A/A presentaron una disminución en el riesgo para desarrollar DM2 (OR 3.7- OR 2.6) a diferencia de los portadores del alelo C, sin que se observará alguna respuesta al cambio de actividad física (Kilpelainen *et al.*, 2007). Por otro lado, se conoce que GLUT2 es regulado en su conjunto por glucosa y por factores lipogénicos (Leturque *et al.*, 2009). Algunos factores transcripcionales que se han visto implicados en la regulación de la célula β son homeobox-1 duodenal pancreático (PDX-1) y Foxo-1, expresándose mayoritariamente en islotes pancreáticos de pacientes diabéticos en comparación con los no diabéticos (Del Guerra *et al.*, 2005).

Al realizar el análisis comparativo de medidas somatométricas y bioquímicas con respecto de los genotipos del SNP rs5394 mediante un modelo dominante (C/C vs C/T+T/T), se observó un incremento del IMC en los portadores del genotipo C/C. En un estudio multicéntrico realizado en Estados Unidos con 169 niños y adolescentes obesos, la prevalencia de tolerancia a la glucosa alterada fue elevada en 25% de los niños entre 4 y 10 años y 21% de los adolescentes, confirmando DM2 en un 4% (Licea *et al.*, 2008), lo que muestra una relación entre el aumento de IMC y los niveles de glucosa, como se observa en los portadores del genotipo C/C, así también en los portadores de este genotipo se observa un incremento en los niveles de triglicéridos 95 (68-150 mg/dl) en comparación con los portadores del alelo T (C/T+T/T). La obesidad y el incremento de ácidos grasos están asociados con la resistencia a insulina, ya que el incremento intracelular de ácidos grasos puede resultar por una competición con la glucosa por el sustrato de oxidación, llevando a una serie de inhibiciones de enzimas glucolíticas, por otro lado el incremento de ácidos grasos libres y la disminución del metabolismo intracelular, resulta en un incremento intracelular de diacilglicerol, acetil CoA y ceramidas, que llevan a la

activación de la cascada de fosforilación serina/treonina del IRS1 e IRS2, con una reducida capacidad de estas moléculas para activar PI3K (Kahn *et al.*, 2006). El 35% de los portadores del genotipo C/C presentan niveles de hiperinsulinemia, lo cual puede explicarse por el efecto compensatorio a la resistencia a la insulina a causa de los niveles elevados de IMC y triglicéridos, ya que a pesar de no presentar diferencias estadísticamente significativas, los portadores del alelo T (C/C+C/T) presentan en un 43% valores de insulina $<4.52 \mu\text{U/ml}$, lo cual indica una baja secreción de insulina y por lo tanto niveles ligeramente mayores de glucosa 98 (87-103 mg/dl) en comparación de portadores del genotipo C/C. Este SNP se ha asociado en estudios previos con una disminución de los niveles de insulina y la progresión de glucosa alterada en ayuno a DM2 (Bae *et al.*, 2010).

Tanto el SNP rs5393 como el SNP rs5394 se localizan en la región promotora del gen *SLC2A2*, lo cuál sería un indicativo de alguna alteración en el nivel de expresión; sin embargo, no se cuentan con datos precisos de que sean sitios de unión a factores de transcripción, Del Guerra y colaboradores en el 2009, reportaron que la presencia del polimorfismo rs5394 se asocia con una reducción del 30% en la expresión de ARNm de GLUT2, en cultivos celulares de islotes pancreáticos. Sin embargo, en el presente estudio no se realizó esta evaluación la cual podría dar un resultado más claro de lo que sucede con la expresión de la proteína.

El SNP rs5400 conlleva a un cambio de aminoácido (treonina-isoleucina) en el dominio transmembranal dos de GLUT2, no se ha demostrado que esta variante conlleve a alguna disminución en la actividad del transportador, pero recientemente se encontró que en población canadiense los portadores de la variante consumían un 14% más de azúcares (Eny *et al.*, 2008). En el presente estudio los portadores del genotipo C/T mostraron niveles más elevados de glucosa 103 (97.5-112.5 mg/dl) en comparación con los portadores del genotipo C/C, lo cual podría indicar que estos individuos tienen una alta ingesta de carbohidratos, por lo cual el transportador se encuentra altamente activo para la secreción de los niveles de insulina 13.2 (8.2-15.3 $\mu\text{U/ml}$) que compensa las altas cantidades de glucosa, por otro lado, se observa que

los portadores del genotipo C/T presentan un alto IMC 24.05 (20.1-24.95 kg/m²), lo cual genera una resistencia a insulina ya que el índice HOMA para los portadores de este genotipo es alto 3.16 (2.24-4.25). En un estudio de genes candidato realizado en población finlandesa y estadounidense se observó asociación del SNP con el desarrollo de DM2 (OR 1.28, IC_{95%} 1.11-1.49, p= 0.0023) (Gaulton *et al.*, 2008) ya que aquellos pacientes con glucosa alterada tienden al desarrollo de DM2. De igual manera Willer en el 2007 en población finlandesa observó asociación del SNP rs5400 con el desarrollo de DM2 (OR 2.98; IC_{95%} 1.31-6.79, p= 0.014). Por otro lado, Barroso y colaboradores en el 2003 observaron la asociación del SNP bajo un modelo dominante (OR 1.49, p=0.0059).

Estos reportes son evidencia de la asociación del SNP con el desarrollo de DM2, y niveles elevados de glucosa, sin embargo, no se tienen datos claros de lo que sucede en la proteína por el cambio aminoacídico y de cómo esto interviene en la secreción de insulina, de acuerdo a lo observado en el estudio, se podría sugerir que la actividad del transportador se incrementa y por lo tanto se genera una mayor secreción de insulina.

Así también en el análisis de la estructura funcional de GLUT2 se indica que el transporte ocurre por la unión de la glucosa con los sitios de acoplamiento dentro del canal, causando cambio conformacional de la proteína, pero en mutantes de GLUT2, la unión de la glucosa en el sitio interno del canal puede limitar a la proteína en este sitio activo de señalización y de cambio conformacional (Leturque *et al.*, 2009).

El SNP rs5404 a pesar de presentar un cambio de nucleótido no genera un cambio aminoacídico. Al analizar las variables somatométricas y bioquímicas con respecto a los genotipos de este SNP, se observó que los niveles elevados de glucosa corresponde a los portadores del genotipo G/G 97 (89-101 mg/dl) en comparación con el genotipo G/A, así también se observa un incremento en el IMC; sin embargo, esto no se relaciona con resistencia a insulina, ya que los niveles mayores en el índice HOMA, así como en la secreción de insulina se observan en portadores del

genotipo G/A, sin mostrar diferencias significativas. En el estudio realizado por Laukkanen y colaboradores se reporta el incremento en los niveles de glucosa en un 13% para el genotipo G/G en comparación de un 12.20% para portadores del alelo A; sin embargo, no se reportan diferencias en los niveles de insulina, índice HOMA e IMC entre los genotipos, atribuyendo el riesgo al homocigoto silvestre G/G. A diferencia del estudio realizado por Barroso y colaboradores en el 2003, en el cual el riesgo de desarrollar DM2 es atribuido al alelo T del SNP rs5400 y al alelo A del SNP rs5404.

Los cuatro SNPs evaluados son bialélicos al realizarse la combinación de alelos se podrían generar 16 haplotipos distintos, sin embargo, de acuerdo a los genotipos encontrados en cada SNP y a la inferencia realizada mediante el programa SHEsis, se infirieron 6 haplotipos (ACCG, ATCG, ACTG, CCCG, ACCA, ATCA), este dato es similar a lo reportado por Laukkanen donde se realizó la inferencia de siete haplotipos (ACCG, ACTG, ACTA, CCTG, CCTA, CTTG y CTTA); sin embargo, solo el haplotipo ACCG y ACTG inferidos en el presente estudio coinciden con los reportados por Laukkanen, quién reporta que ninguno de los siete haplotipos incremento el riesgo de DM2 y el haplotipo CTTA se observó como protector del desarrollo de DM2 (OR 0.27, IC_{95%} 0.09-0.79, p=0.016).

Al observar que el alelo T del SNP rs5400 está asociado con niveles alterados de glucosa en ayuno y que se observó un incremento en los niveles de glucosa para los portadores de los alelos de menor frecuencia de los SNPs rs5393, rs5394 y rs5404; el haplotipo ACTG fue asociado con niveles alterados de glucosa en ayuno (OR 6.10, IC_{95%} 1.21-30.78, p=0.01). En el estudio realizado por Kilpelainen y colaboradores en el 2007, se observa que de los cuatro SNPs se forman los mismos siete haplotipos reportados por Laukkanen, donde la interacción del haplotipo CTTA formado por el alelo C del SNP rs5393, el alelo T del SNP rs5394, el alelo T del SNP rs5400 y el alelo A del SNP rs5404, con el cambio en la actividad física efectuada por los participantes del estudio mostró una disminución en el riesgo de desarrollar DM2, lo

cual se explica por una mejor preservación de la función de la célula β en los portadores de los genotipos en respuesta al ejercicio.

Se analizaron de manera simultánea cuatro polimorfismos del gen *SLC2A2*, los cuales presentaron un alto desequilibrio de ligamiento, es decir la probabilidad de que estos cuatro loci cercanos se recombinen es baja. El desequilibrio de ligamiento es útil para localizar polimorfismos asociados con la enfermedad (Inieta *et al.*, 2005). Estudios realizados en población finlandesa muestran un alto desequilibrio de ligamiento ($r^2 > 0.98$), ($r^2 > 0.8$) (Laukkanen *et al.*, 2005, Kilpelainen *et al.*, 2007); lo cual coincide a lo observado en este estudio.

Con base a lo anteriormente descrito, se puede concluir que las frecuencias genotípicas para cada uno de los SNPs son las siguientes: rs5393 (A/A=95%, A/C=5%), rs5394 (C/C=91%, C/T=8%, T/T=1%), rs5400 (C/C=98%, C/T=2%), rs5404 (G/G=98%, G/A=2%). Mientras que la determinación de las frecuencias de haplotipos son: (ACCG=91%, ATCG=4.5%, CCCG=2.5%, ACTG=1%, ACCA=0.5%, ATCA=0.5%). Al comparar parámetros clínico-bioquímicos, los portadores del genotipo A/A del SNP rs5393 mostraron niveles elevados de glucosa al igual que los portadores del genotipo G/G del SNP rs5404, así como un mayor IMC, los portadores del genotipo C/T del SNP rs5394 mostraron niveles elevados de triglicéridos e IMC, los portadores del genotipo C/T del SNP rs5400 presentaron niveles alterados de glucosa en ayuno, así como niveles elevados de insulina, índice HOMA e IMC. El haplotipo ACTG del gen *SLC2A2* inferido mostró asociación con niveles alterados de glucosa en ayuno.

7. REFERENCIAS

1. ADA, A. D. A. (2012) Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *DIABETES CARE*, 34, 562-569.
2. ARIAS, L. (2005) Resistencia a la insulina y otras variables metabólicas en niños escolares con sobrepeso y obesidad de Tulancingo, Hidalgo. *Área Académica de Nutrición*. Hidalgo, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias de la Salud.
3. BAE, J. S., KIM, T. H., KIM, M. Y., PARK, J. M., AHN, Y. H. (2010) Transcriptional regulation of glucose sensors in pancreatic beta-cells and liver: an update. *Sensors (Basel)*, 10, 5031-53.
4. BARROSO, I., LUAN, J., MIDDELBERG, R. P., HARDING, A. H., FRANKS, P. W., JAKES, R. W., *et al.* (2003) Candidate gene association study in type 2 diabetes indicates a role for genes involved in beta-cell function as well as insulin action. *PLoS Biol*, 1, E20.
5. CNOP, M., VIDAL, J., HULL, R. L., UTZSCHNEIDER, K. M., CARR, D. B., SCHRAW, T., *et al.* (2007) Progressive loss of beta-cell function leads to worsening glucose tolerance in first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 30, 677-82.
6. CZECH, A., TATON, J., PIATKIEWICZ, P. (2010) Cellular glucose transport disturbances in the pathogenesis and therapy of type 2 diabetes mellitus. *Endokrynol Pol*, 61, 292-302.
7. DEL GUERRA, S., LUPI, R., MARSELLI, L., MASINI, M., BUGLIANI, M., SBRANA, S., *et al.* (2005) Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes*, 54, 727-35.
8. EBE D'ADAMO, S. C. (2011) Type 2 Diabetes in Youth: Epidemiology and Pathophysiology. *Diabetes Care*, 34, 161-165.
9. ENSANUT (2012) Encuesta Nacional de Salud. IN 1 (Ed. *Resultados Nacionales*. Instituto Nacional de Salud Pública.
10. ENY, K. M., WOLEVER, T. M., FONTAINE-BISSON, B., EL-SOHEMY, A. (2008) Genetic variant in the glucose transporter type 2 is associated with higher intakes of sugars in two distinct populations. *Physiol Genomics*, 33, 355-60.
11. FESTA, A., WILLIAMS, K., D'AGOSTINO, R., JR., WAGENKNECHT, L. E., HAFFNER, S. M. (2006) The natural course of beta-cell function in nondiabetic and diabetic individuals: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes*, 55, 1114-20.
12. FONSECA, V. A. (2009) Defining and characterizing the progression of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 32 Suppl 2, S151-6.
13. GAULTON, K. J., WILLER, C. J., LI, Y., SCOTT, L. J., CONNEELY, K. N., JACKSON, A. U., *et al.* (2008) Comprehensive association study of type 2 diabetes and related quantitative traits with 222 candidate genes. *Diabetes*, 57, 3136-44.
14. GONZÁLEZ, M., MADERO, M., MARTÍNEZ, V., SERRANO, L. (2010) Insulina, leptina y grado de resistencia a la insulina en niños escolares con y sin obesidad. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 15, 197-203.

15. HAYASHI, T., BOYKO, E. J., MCNEELY, M. J., LEONETTI, D. L., KAHN, S. E., FUJIMOTO, W. Y. (2008) Visceral adiposity, not abdominal subcutaneous fat area, is associated with an increase in future insulin resistance in Japanese Americans. *Diabetes*, 57, 1269-75.
16. INIESTA, R., GUINÓ, E. & MORENO, V. (2005) Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac. Sanit.*, 19, 333-341.
17. KAHN, S. E., HULL, R. L., UTZSCHNEIDER, K. M. (2006) Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 444, 840-6.
18. KILPELAINEN, T. O., LAKKA, T. A., LAAKSONEN, D. E., LAUKKANEN, O., LINDSTROM, J., ERIKSSON, J. G., *et al.* (2007) Physical activity modifies the effect of SNPs in the SLC2A2 (GLUT2) and ABCC8 (SUR1) genes on the risk of developing type 2 diabetes. *Physiol Genomics*, 31, 264-72.
19. LAUKKANEN, O., LINDSTROM, J., ERIKSSON, J., VALLE, T. T., HAMALAINEN, H., ILANNE-PARIKKA, P., *et al.* (2005) Polymorphisms in the SLC2A2 (GLUT2) gene are associated with the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes: the Finnish Diabetes Prevention Study. *Diabetes*, 54, 2256-60.
20. LETURQUE, A., BROT-LAROCHE, E., LE GALL, M. (2009) GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 296, E985-92.
21. LICEA, M., BUSTAMANTE, M., LEMANE, M. (2008) Diabetes tipo 2 en niños y adolescentes: aspectos clínico-epidemiológicos, patogénicos y terapéuticos. *Rev. Cubana Endocrinol*, 19, 11-20.
22. SEINO, S., SHIBASAKI, T., MINAMI, K. (2011) Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. *J Clin Invest*, 121, 2118-25.
23. STOLARCZYK, E., GUISSARD, C., MICHAU, A., EVEN, P. C., GROSFELD, A., SERRADAS, P., *et al.* (2010) Detection of extracellular glucose by GLUT2 contributes to hypothalamic control of food intake. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298, E1078-87.
24. STOLARCZYK, E., LE GALL, M., EVEN, P., HOULLIER, A., SERRADAS, P., BROT-LAROCHE, E., *et al.* (2007) Loss of sugar detection by GLUT2 affects glucose homeostasis in mice. *PLoS One*, 2, e1288.
25. THORENS, B., MUECKLER, M. (2010) Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298, E141-5.
26. TOBIN, V., LE GALL, M., FIORAMONTI, X., STOLARCZYK, E., BLAZQUEZ, A. G., KLEIN, C., *et al.* (2008) Insulin internalizes GLUT2 in the enterocytes of healthy but not insulin-resistant mice. *Diabetes*, 57, 555-62.
27. VÁZQUEZ, C., SALINAS, S., GÓMEZ, R., ROSSO, M., JIMÉNEZ, M., ARGUERO, R. (2003) ¿Cuál es el nivel de insulina en una población mexicana en peso ideal. *Rev. de Endocrinología y Nutrición.*, 11, 22-27.
28. WILLER, C. J., BONNYCASTLE, L. L., CONNEELY, K. N., DUREN, W. L., JACKSON, A. U., SCOTT, L. J., *et al.* (2007) Screening of 134 single nucleotide polymorphisms (SNPs) previously associated with type 2 diabetes replicates association with 12 SNPs in nine genes. *Diabetes*, 56, 256-64.