



Análisis de la secuencia del exoma de 100 genes y sus variantes tipo snp en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 por pirosecuenciación

Sergio Araujo-Betanzos¹
José Juan Ceballos-Macias²
Elsa Saldaña-Rivera³
Fabiola Esther G Enriquez-Espinosa⁴
Eleazar Lara-Padilla⁵
Esaú Floriano-Sanchez⁶

¹ M.M.C., jefe de la sección de investigación de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad.

² M.M.C., jefe de la consulta externa de Endocrinología, Unidad de Especialidades Médicas, Naucalpan, Estado de México.

³ M.M.C., jefe de la subsección del Laboratorio Multidisciplinario de Investigación, Escuela Militar de Graduados de Sanidad.

⁴ Cap. 2º investigador adjunto del Laboratorio Multidisciplinario de Investigación, Escuela Militar de Graduados de Sanidad.

⁵ Doctor en ciencias, director de la Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional.

⁶ Tte. Cor. M.C., jefe del curso de la maestría en Ciencias Biomédicas con especialidad en Biología Molecular, Escuela Militar de Graduados de Sanidad, Ciudad de México, subdirector de Investigación de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad, Ciudad de México.

Escuela Militar de Graduados de Sanidad, Unidad de Especialidades Médicas.

RESUMEN

Antecedentes: la mayor parte de las enfermedades crónico-degenerativas resultan de la interacción de factores genéticos y ambientales; el humano tiene la predisposición a padecer diabetes mellitus cuando sus costumbres alimenticias se modifican al incrementar el consumo de azúcares simples y grasas.

Objetivo: identificar las variantes tipo *snp* del exoma de 100 genes en individuos con diabetes mellitus tipo 2 y no afectados por la enfermedad que acuden a la Unidad de Especialidades Médicas.

Material y método: estudio de casos y controles efectuado en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y sanos, sin antecedentes hereditarios de esta enfermedad. Análisis de 100 genes capturados con auxilio del programa de cómputo *SureSelect DNA Standard Design Wizard* (Agilent Technologies), mediante pirosecuenciación con la plataforma 454 GS Junior, con enriquecimiento del equipo *SureSelect*.

Resultados: se reportan 536 variantes que pasaron los filtros para las muestras analizadas, entre ellas la variante "missense" en el gen *mtch2* del cromosoma 11. Este gen está relacionado estrechamente con la obesidad de acuerdo con lo reportado en la bibliografía. El mismo comportamiento mostraron otras variantes según la captura dirigida realizada con el protocolo adaptado de "SureSelect". Se obtuvieron 24 *snp*'s exclusivos en los individuos diabéticos, cuatro mutaciones que solo se encontraron en la totalidad de diabéticos y en ningún control. Aún no se encuentran reportadas como *snp* en las bases de datos.

Conclusión: para corroborar los hallazgos de este estudio es necesario emprender otro con un tamaño de muestra representativo de la población de estudio.

Palabras clave: diabetes mellitus tipo 2, pirosecuenciación, polimorfismos genéticos.

Recibido: 2 de octubre 2015

Aceptado: 2 de febrero 2016

Correspondencia

M.M.C. Sergio Araujo Betanzos
Escuela Militar de Graduados de Sanidad, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea
Cerrada de Palomas s/n esq. Periférico
11200 Ciudad de México
drsaraujob@hotmail.com.



Sequence analysis of the exome of 100 genes and their variants type snp in patients with diabetes mellitus type 2 by pyrosequencing

ABSTRACT

Background: Diabetes mellitus has become a major public health problem due to the high costs of treatment and prevention complications. This disease is the most common cause of blindness, end-stage renal failure, non-traumatic amputations and premature disability, in Mexico and in most countries. Most of the chronic and degenerative diseases result from the interaction of genetic and environmental factors. The individual has the predisposition for the disease when his eating habits are modified to increase the consumption of simple sugars and fats.

Objective: Identify the type SNP variants in the exome of 100 genes in individuals with DM2 and individuals not affected by the disease attending the Unit of Medical Specialties.

Material and methods: We analyzed a total of 25 patients with type 2 diabetes and 25 healthy patients without a family history of DM2. The regions of the 100 genes analyzed were captured by SureSelect DNA Standard Design Wizard software of company Agilent Technologies and were analyzed using pyrosequencing technique with the 454 GS Junior platform enrichment with sure select kit.

Results: 536 variants which passed the filters for the analyzed samples are reported, and within a missense *mtch2* gene variant on chromosome 11, the gene is closely related to obesity as reported in the literature. Other variants have the same behavior according to the targeted capture made with the protocol adapted from "sure select". 24 exclusive snp's were obtained in diabetic individuals, 4 mutations also not yet are reported as SNP databases., the results are encouraging so we consider to conduct further studies with larger sample size to substantiate the preliminary findings presented in present pilot study.

Conclusion: To corroborate the findings of this study is necessary to undertake another with a more representative sample size.

Key words: Diabetes mellitus type 2, Pyrosequencing, Genetic polymorphisms.

ANTECEDENTES

Conforme la prevalencia de la obesidad aumenta, se incrementa la prevalencia de diabetes

mellitus tipo 2.^{1,2} Dependiendo del grado de obesidad, solo alrededor de 25-40% de los individuos obesos llegan a padecer diabetes mellitus tipo 2.³

La Organización Mundial de la Salud calcula que la cantidad de diabéticos en el mundo sobrepasa los 347 millones y pronostica que en el año 20130 habrá 366 millones. En México, a partir del 2000, la diabetes se considera la primera causa de muerte en mujeres y la segunda en hombres.^{4,5} La proporción de adultos con diagnóstico previo de diabetes se incrementó de 5.8% en el 2000 a 9.2% en el 2012, según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición.⁶

En los últimos años las variantes genéticas se asocian con riesgo de diabetes mellitus tipo 2. Los estudios de asociación del genoma y otros enfoques han identificado muchos genes con susceptibilidad para diabetes mellitus tipo 2, a pesar de que solo representan una modesta proporción de su capacidad para heredar la diabetes mellitus tipo 2.³ Los genes que con más frecuencia se asocian con diabetes mellitus tipo 2 en diferentes poblaciones son: *PPARG*, *KCJN11* y *TCF7L2*.⁷ El objetivo de este estudio es identificar las variantes tipo *snp* del exoma de 100 genes en individuos con diabetes mellitus tipo 2 y no afectados por la enfermedad que acuden a la Unidad de Especialidades Médicas.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio de casos y controles efectuado en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y sanos, sin antecedentes heredofamiliares de esta enfermedad. Los controles aparentemente sanos y los diabéticos se reclutaron de la Unidad de Especialidades Médicas de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad. De todos los pacientes se obtuvo información de: edad en años, sexo, estatura, peso, índice de masa corporal, lugar de nacimiento del paciente y de sus padres; datos bioquímicos de: glucosa, hemoglobina glucosilada, colesterol total, HDL, LDL, triglicéridos y perfil tiroideo. A todos los sujetos de estudio se les tomaron muestras de sangre periférica con técnica estéril.

Pirosecuenciación. El ADN genómico (ADNg) se extrajo y purificó con el sistema *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen, Alemania).⁸ Las regiones exónicas de los 100 genes se amplificaron de las muestras de ADNg utilizando una captura dirigida con el programa de cómputo *SureSelect DNA Standard Design Wizard*, adaptando de esta forma el equipo *SureSelect* ((*Agilent Technologies*) a la plataforma 454 GS Junior de Roche.

El análisis se enfocó, primeramente, a estandarizar parámetros de limpieza, recorte de lecturas y filtrado por calidad de las lecturas crudas producidas por el secuenciador GS- Junior 454®.

Los resultados se obtuvieron en archivos de secuenciación limpios (sin adaptadores, filtrado de secuencias contaminantes y respetando la calidad mínima) que se ingresaron a un *pipeline* de análisis de variantes para generar tablas Excel (formato TSV) y archivos VCF (*variant calling file*). Los archivos tabulares Excel y los VCF presentan las variantes resultantes del análisis conjunto de las muestras secuenciadas. El *pipeline* está conformado de la siguiente forma.

FASTQC • Revisión inicial de la calidad de las lecturas.

Fastx-toolkit • Filtrado de lecturas de baja calidad y el recorte al inicio y final de las lecturas.

GATK pipeline - BWA - SAMTOOLS - PICARD
• Pipeline desarrollado para reportar variantes homocigotas o heterocigotas en humanos.

snpEff/SnpSift • Suite que reporta el impacto funcional de la variación encontrada por GATK.

FASTQC-FASTX-Toolkit

Los parámetros iniciales para el corte y filtrado de lecturas se determinaron aplicando FASTQC. Con la finalidad de no dañar el análisis poste-



rior, luego del proceso de filtrado en las lecturas crudas, la calidad está por debajo del ideal y se tuvo que cortar hasta la posición 320 eliminando los resultados que no pasaron los controles de calidad.

GATK pipeline

Los archivos procesados se analizaron en una primera etapa individualmente y luego se integraron a un análisis comparativo con GATK, BWA, SAMTOOLS y Picard en conjunto. Se mapearon las lecturas procesadas (controles y diabéticos) al genoma de referencia hg19. Se hizo la conversión entre formatos de mapeo (SAM a FASTQ) y se aplicó un filtro de lecturas duplicadas que pueden producir un *bias* en el llamado de variantes y, finalmente, GATK con toda esta información para establecer las variantes reales y filtrar los falsos positivos mediante un sistema de “score” basado en la calidad y análisis estadístico por cada variante reportada.

filtered_output_final_hg19.tsv

Archivo generado a partir de las variantes reportadas para todas las muestras. Este “vcf” se anotó en un *pipeline* denominado “Snpeff”, que reporta el impacto de la variante, cambio de aminoácido y tipo de variación. Además de reportar los cambios fue objeto de varias comparaciones con otras bases de datos de SNP’s, como: “PhastCons” (<http://varianttools.sourceforge.net/Annotation/PhastCons>), bloques de regiones conservadas que reportan variantes. La base de datos de SNP’s de los 1000 genomas, finalmente aquellos snp’s que fueron de relevancia se analizaron en la plataforma snp nexus con la finalidad de obtener sus asociaciones con enfermedades clínicas, además de observar su comportamiento en otras poblaciones (caucásica y México-americanos de Los Ángeles California).

RESULTADOS

En el Cuadro 1 se resume el análisis luego de aplicar los controles de calidad por medio del filtrado y eliminación de las lecturas crudas que no alcanzaron los controles de calidad. Se reportan 536 variantes que pasaron los filtros para las muestras analizadas, y entre ellos una variante “missense” en el gen MTCH2 del cromosoma 11. Este gen está estrechamente relacionado con la obesidad según varios reportes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21795451>). El mismo comportamiento tuvieron otras variantes de acuerdo con la captura dirigida realizada con el protocolo adaptado de “SureSelect”.

En el Cuadro 2 se señalan las variantes encontradas, su longitud y cromosoma en el que se

Cuadro 1. Resumen del análisis de variantes

Genoma	hg19
Fecha	2015-07-31 13:52
Versión SnpEff	Snpeff 4.1b (build 2015-02-13), by Pablo Cingolani
Línea de comandos	Snpeff hg19 filtered_output_final.gatk.vcf
Advertencias	0
Errores	0
Número de líneas (archivo de entrada)	536
Número de variantes (antes del filtro)	536
Número de no variantes (referencia alternativa)	0
Número de variantes procesadas (después del filtro)	536
Número de variantes conocidas	488 (91.045%)
Número de multi-alelicas (mas de dos alelos)	0
Número de efectos	580
Longitud total del genoma	3,137,161,264
Longitud efectiva del genoma	2,691,689,960
Tasa de variantes	1 variante cada 5,021,809 bases

Fuente directa

Cuadro 2. Detalles de las variantes encontradas

Cromosoma	Longitud	Variantes	Tasa de variantes
1	249,250,621	115	2,167,396
2	243,199,373	6	40,533,228
3	198,022,430	29	6,828,359
4	191,154,276	16	11,947,142
5	180,915,260	14	12,922,518
6	171,115,067	68	2,516,398
7	159,138,663	37	4,301,044
8	146,364,022	46	3,181,826
10	135,534,747	70	1,936,210
11	135,006,516	19	7,105,606
12	133,851,895	28	4,780,424
13	115,169,878	3	38,389,959
14	107,349,540	13	8,257,656
15	102,531,392	19	5,396,389
16	90,354,753	34	2,657,492
17	81,195,210	1	81,195,210
18	78,077,248	6	13,012,874
19	59,128,983	2	29,564,491
20	63,025,520	4	15,756,380
22	51,304,566	6	8,550,761
Total	2,691,689,960	536	5,021,809

Fuente directa

ubican. Se advierte que el mayor número de variables se localizó en el cromosoma 1.

En el Cuadro 3 se observa cómo la mayor parte de los efectos de las variantes se dan en las regiones intrónicas.

Cuadro 3. Efectos por tipo y región

Tipo de efecto	Cantidad	Porcentaje
3_prime_UTR_variante	4	0.69
5_prime_UTR_variante	1	0.172
Rio abajo_gen_variante	10	1.724
intergénica_región	21	3.621
intragénica_variante	15	2.586
intrón_variante	508	87.586
missense_variante	1	0.172
no_codificante_exon_variante	11	1.897
sinónimo_variante	1	0.172
Rio arriba_gen_variante	8	1.379

Fuente directa

Después de analizar la totalidad de polimorfismos tipo snp reportados en el Cuadro 4 se señalan los polimorfismos (24 polimorfismos tipo snp distribuidos en los cromosomas 1,5,6,7,8,10,11,12,15,16,18 y 22) que se encontraron en todos los pacientes diabéticos y que no se observaron en los pacientes controles sin diabetes tipo 2.

En el Cuadro 5 se observa que entre las variantes analizadas hubo cuatro que solo se observaron en individuos diabéticos y no en controles; hasta ahora no están reportadas en la base de datos como snp's.

Entre las variantes analizadas se encontró el rs 1064608 del gen *MTCH2* inserto en el cromosoma 11, NM-014342.3, en el que provoca un cambio de aminoácido prolina hacia alanina (alelo G/C , Pro290Ala) y que está relacionado con la obesidad.

DISCUSIÓN

La diabetes tipo 2 pertenece a un grupo de alteraciones metabólicas de carácter heterogéneo con grado variable de predisposición hereditaria y participación de diversos factores ambientales.⁹ La diabetes mellitus tipo 2 se caracteriza por hiperglucemia persistente debido a la resistencia a la acción de la insulina o por la deficiencia en su producción que afecta el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y grasas.¹⁰ La diabetes mellitus tipo 2 tiene un origen complejo y multifactorial, que principalmente se asocia con obesidad, concentración elevada de triglicéridos y baja de colesterol-HDL y resistencia a la acción de la insulina.¹⁰

La participación de factores genéticos relacionados con la susceptibilidad a padecer diabetes mellitus tipo 2 se asocian estrechamente cuando existen antecedentes heredo-familiares de diabetes.¹⁰

**Cuadro 4.** Lista de los snp's encontradas en la población de individuos con diabetes tipo 2 y que no se observan en controles

SNP	Alelo	Cromosoma	Gen	Transcripto	Entrez gen	Predice función en:
rs1155175	T C	1	NEGR1	NM_173808	257194	Intron
rs10458580	A G	1	NEGR1	NM_173808	257194	Intron
rs6689643	T G	1	NEGR1	NM_173808	257194	Intron
rs10789323	T C	1	NEGR1	NM_173808	257194	Intron
rs4147264	C T	1	NEGR1	NM_173808	257194	Intron
rs1459795	A G	1	NEGR1	NM_173808	257194	Intron
rs2770156	G A	1	RASAL2	NM_170692	9462	Intron
rs152184	C T	5	IPO11	NM_001134779	51194	Intron
rs9368243	A G	6	CDKAL1	NM_017774	54901	Intron
rs4710965	C G	6	CDKAL1	NM_017774	54901	Intron
rs6900022	T A	6	ME1	NM_002395	4199	Intron
rs520161	T C	7	JAZF1	NM_175061	221895	Intron
rs12677632	T G	8	MSRA	NM_001135670	4482	Intron
rs764738	G A	8	MSRA	NM_001135670	4482	Intron
rs62759162	T -	10	CAMK1D	NM_153498	57118	Intron
rs231893	T C	11	KCNQ1	NM_000218	3784	Intron
rs2270589	C A	12	TSPAN8	NM_004616	7103	Intron
rs2270588	T C	12	TSPAN8	NM_004616	7103	Intron
rs1397559	C T	12	TSPAN8	NM_004616	7103	Intron
rs445660	C T	15	LIPC	NM_000236	3990	Intron
rs10521303	G T	16	FTO	NM_001080432	79068	Intron
rs582571	T A	18	ME2	NM_002396	4200	Intron
rs5767203	C T	22	CELSR1	NM_014246	9620	Intron
rs5768768	G T	22	CELSR1	NM_014246	9620	Intron

Fuente directa

Cuadro 5. Mutaciones dentro de las variantes aún no reportadas como snp

SNP	Alelo	Cromosoma	Gen	Transcripto	Posición	Predice función en:
	AT A	2	GPR35	NM_001195381.1	241548348	Intron
	T/A	8	MRSA	NM_012331.4	9964787	Intron
	GA/G	10	TCF7L2	NM_001146274.1	114903198	Intron
	AT/A	12	TSPAN8	NM_004616.2	71526330	Intron

Fuente directa

Los retos del estudio de asociación genética en humanos implican: 1) diagnóstico adecuado de la enfermedad para evitar un error de clasificación de los sujetos seleccionados como sanos o enfermos. 2) La elección adecuada de ambos grupos a estudiar, que deben ser comparables en edad, sexo, grupo étnico, nivel socio-económico e incluso nivel de escolaridad. 3) Tamaño de la muestra y la población a estudiar, es decir, si se

va a realizar un análisis basado en población abierta, un estudio de casos vs controles o una aproximación por el estudio de familias.¹¹

De acuerdo con lo descrito en los párrafos anteriores nos dimos a la tarea de clasificar adecuadamente a los dos grupos de estudio: diabéticos sin antecedentes de enfermedad tiroidea que pudieran dar falsos positivos de diabetes

mellitus tipo 2, pacientes aparentemente sanos sin antecedentes heredofamiliares de diabetes mellitus tipo 2, cuando menos hasta la segunda generación.

Debido a los costos económicos que se originan del estudio del exoma completo de 100 genes en individuos diabéticos y controles, lo heterogéneo que es la diabetes mellitus tipo 2, en este estudio, por el tamaño de la muestra, no pueden obtenerse conclusiones con aplicación en la población mexicana en general. En concordancia con lo expuesto por Miguel Cruz,¹¹ y para este estudio en particular, por lo complejo de la diabetes mellitus tipo 2 lo conveniente, de acuerdo con las estadísticas de prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 en la Unidad de Especialidades Médicas, sería ideal abordar el estudio con 1500 pacientes diabéticos y controles, respectivamente, para obtener datos estadísticamente significativos en la población de la Unidad de Especialidades Médicas.

La inclusión de la información genética de *loci* asociados previamente con factores de riesgo cuantitativo para diabetes tipo 2, pero no principalmente con la diabetes, aumenta de manera significativa el poder de discriminar entre personas con y sin diabetes tipo 2 clínicamente manifiesta.¹²

Esto pone de relieve el carácter multifactorial de la diabetes tipo 2 y resalta el importante papel potencial en el inicio de la enfermedad que desempeñan los *loci* que no alcanzan un nivel de significación de todo el genoma para diabetes mellitus tipo 2.¹³ Estamos de acuerdo con lo descrito por Renstrom, sin perder de vista los alcances de este estudio que solo se centran en el análisis del exoma de 100 genes para determinar cuáles polimorfismos de nucleótido simple o snp, son exclusivos en pacientes diabéticos. Nuestros hallazgos de polimorfismos en los genes *NEGR1*, *RASAL2*, *IPO11*, *CDKAL1*, *ME1*,

JAZF1, *MSRA*, *CAMK1D*, *KCNQ1*, *TSPAN8*, *LIPC*, *FTO*, *ME2YCELSR1*, principalmente, como se muestra en el Cuadro 4 de resultados, que de una forma directa o indirecta implican un riesgo de susceptibilidad para diabetes mellitus tipo 2, según lo reportado en las bases de datos y en el banco de genes (genbank).

También se encontraron mutaciones en los genes *GPR35*, *MRSA*, *TCF7L2* Y *TSPAN8* que aún no están en las bases de datos consultadas. Por lo reportado para esos genes en la bibliografía se cree que confieren riesgo para diabetes mellitus tipo 2. Estamos de acuerdo con la opinión generalizada de lo heterogéneo de la diabetes mellitus tipo 2 y si bien de 100 genes solo se encontró exclusividad para diabéticos en 16 de ellos, no por esto se da por asentado que las mutaciones tipo snp encontradas en pacientes diabéticos y en los controles queden excluidas de conferir riesgo. Para demostrarlo hacen falta estudios de desequilibrio genético que determinen qué snp,s o haplotipos se secretan de manera conjunta y así adjudicar un riesgo de llegar a padecer diabetes mellitus tipo 2, que en lo individual no se aprecia.

En genética, una mutación con cambio de sentido o contrasentido (*missense*), es un tipo de mutación puntual no sinónima en la que se produce un cambio en un único nucleótido, lo que provoca la aparición de un codón que codifica para un aminoácido diferente. Esto puede provocar un producto proteico incapaz de cumplir su función. Es el caso del polimorfismo (rs1064608) encontrado en el gen *MTCH2* que se ubica en el cromosoma 11, NM_ 014342.3, en el que provoca un cambio de aminoácido prolina hacia alanina (alelo G/C , Pro290Ala) y que está relacionado con la obesidad, como lo mencionan diversos autores de acuerdo con estudios en otras poblaciones.¹⁴⁻¹⁶ Si bien no fue objeto de este estudio la obesidad, estamos de acuerdo con lo descrito por William L,³ quien



menciona que dependiendo del grado de obesidad, de 25 a 40% de los obesos tendrán diabetes mellitus tipo 2.

Desde finales del siglo XV la población de lo que hoy se llama América Latina ha sufrido grandes cambios demográficos en el contexto de un entorno físico y social sumamente diversificado.¹⁷ Estos cambios incluyen la ocurrencia de olas de inmigración de diversas partes de África y Europa, la consiguiente disminución de las poblaciones nativas más expuestas a los inmigrantes y una mezcla variable entre estos grupos. También ha habido una serie de movimientos de población sensibles en la región. Por ejemplo, en las últimas generaciones ha habido una extensa migración a las ciudades. América Latina es ahora la región más urbanizada del mundo (alrededor de 80% de su población está actualmente considerada urbana).¹⁷ Estas poblaciones muestran una variación considerable en lugar de nacimiento y de una serie de variables biológicas y sociales, que ilustra la amplia heterogeneidad de los latinoamericanos.

Debido a la heterogeneidad de la población mexicana y lo complejo de la diabetes mellitus tipo 2, consideramos pertinente abordar en el futuro el estudio de esta enfermedad con estudios de ancestría y de genética de poblaciones para acotar las posibles huellas génicas que pudieran ser específicas de nuestra población o de un grupo de la población, con la finalidad de aplicar los resultados de una manera dirigida y responsable en pro de los grupos poblacionales.

CONCLUSIONES

Debido a lo heterogéneo de la diabetes mellitus tipo 2, a la influencia para conferir un riesgo de susceptibilidad por cada uno de los spn,s explorados y a los resultados obtenidos debe abordarse el estudio con un tamaño de muestra representativo de la población de estudio, to-

mando en cuenta realizar estudios de genética de poblaciones, y el análisis de todo el exoma humano con estudios de asociación a factores bioquímicos cuantitativos.

Conflicto de intereses. Los recursos para este proyecto fueron auspiciados por la Secretaría de la Defensa Nacional de México por parte del programa SEDENA-CIDEFAM. Programa Presupuestario A022-2014: "Investigación y desarrollo militar en coordinación con universidades públicas, instituciones públicas de educación superior y/o demás centros públicos de investigación".

Agradecimientos: Al Centro de Investigación y Desarrollo del Ejército y Fuerza Aérea Mexicanos (C.I.D.E.F.A.M.) que en todo momento apoyó y gestionó para que se autorizara el financiamiento con cargo al programa presupuestario "A022 Investigación y desarrollo militar en coordinación con universidades públicas, instituciones públicas de educación superior y demás centros públicos de educación superior".

REFERENCIAS

1. Funk JL. Trastornos del páncreas endocrino. En: McPhee SJ, Hammer GD. Fisiopatología de la enfermedad. New York: McGraw-Hill, 2011;497-522.
2. Insulin Resistance and Prediabetes. Human U.S. Department of Health and Services. NIH Publication No. 09-4893 October 2008. Disponible en <http://permanent.access.gpo.gov/lps115346/insulinresistance.pdf>
3. Lowe WL, Bain JR. Prediction is very hard, especially about the future: new biomarkers for type 2 diabetes. *Diabetes* 2013;62(5):1384-85. Disponible en <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/62/5/1384.extract>.
4. Secretaría de Salud (SSA)-Dirección General de Información en Salud. Elaborado a partir de la base de datos de defunciones 1979-2008 INEGI/SS compendio Histórico. Disponible en www.dgis.salud.gob.mx/descargas/xls/m_001.xls
5. Secretaría de Salud. Estadísticas de mortalidad en México: muertes registradas en el año 2000. *Salud Pública Mex* 2002;44:266-82. Disponible en <http://bvs.insp.mx>
6. Secretaría de Salud. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012, resultados nacionales. México. Disponible en <http://ensanut.insp.mx/>
7. Prokopenko I, McCarthy MI and Lindgren CM. Type 2 diabetes: new genes, new understanding. *Trends Genet* 2008;24(12):613-21. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2008.09.004>.
8. Dedoussis GV, Kaliora AC, Panagiotakos DB. Genes, diet and type 2 diabetes mellitus: a review. *Rev Diabet Stud* 2007;4(1):13-24. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1892523/>

9. Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H, et al. Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC), McCarthy MI, Hattersley AT: Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* 2007; 316(5829):1336-41. Disponible en: <http://doi.org/10.1126/science.1142364>.
10. American Diabetes Association (2014) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*;37: S81-S89. Disponible en: http://care.diabetesjournals.org/content/37/Supplement_1/S81.full.pdf
11. Cruz M, García-Mena J, López-Orduña E, Valladares A, Sánchez R, Wachter-Rodarte N, y col. Genes candidatos como posibles marcadores de susceptibilidad a diabetes tipo 2. *Revista de Educación Bioquímica* 2005; 24 (3-4): 81-86. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/490/49024403.pdf>
12. Fontaine-Bisson B, Renstrom F, Rolandsson O; MAGIC, Payne F, Hallmans G, Barroso I, Franks PW. Evaluating the discriminative power of multi-trait genetic risk scores for type 2 diabetes in a northern Swedish population. *Diabetologia* 2010; 53: 2155-2162.
13. Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, et al. A genome-wide association study of type 2 diabetes in fins detects multiple susceptibility variants. *Science* 2007 June 1; 316(5829): 1341-45. Disponible en: <http://doi.org/10.1126/science.1142382>.
14. Willer CJ, Speliotes EK, Loos RJ, Li S, Lindgren CM, Heid IM, et al. Genetic Investigation of Anthropometric Traits Consortium: Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat Genet* 2009 January; 41(1): 25-34. doi: 10.1038. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19079261>
15. Locke AE, Kahali B, Berndt SI, Justice AE, Pers TH, Day FR, et al. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature* 2015 February 12; 518(7538):197-206. Disponible en: <http://www.nature.com/nature/journal/v518/n7538/full/nature1417.html>
16. Hindorf LA, Sethupathy P, Junkins HA, Ramos EM, Mehta JP, Collins FS, Manolio TA. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *PNAS*, June 9, 2009; vol. 106 no. 23 , 9362-9367. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19474294>
17. Ruiz-Linares A, Adhikari K, Acuña-Alonzo V, Quinto-Sanchez M, Jaramillo C, Arias W, et al. Admixture in latinamerica: geographic structure, phenotypic diversity and self-perception of ancestry based on 7,342 individuals. *PLoS Genet* 2014 Sep 25; 10(9): e1004572. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1004572>