

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Identificación de variantes genéticas en el DNA mitocondrial y
sus haplogrupos en población mestizo-mexicana de pacientes
con diabetes mellitus tipo 2 e hipertensión”**

TESIS

Que presenta

IBT. MARIO MIGUEL CAMPOS PÉREZ

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Director de tesis:

DRA. MARÍA DE LOURDES MUÑOZ MORENO

Ciudad de México

Enero, 2023

Comité tutorial

Asesores internos

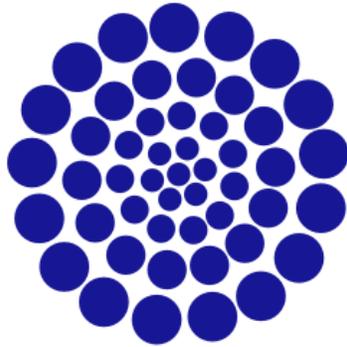
Dra. Rosa María Bermúdez Cruz
Dr. Luis Kameyama Kawabe

Investigadores del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV)

Asesor externo

Dr. Normand García Hernández

Investigador Titular B y jefe del Laboratorio de Genómica Funcional y Proteómica, de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, de la Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Pediatría, del Centro Médico Nacional “Siglo XXI” del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Quiero agradecer a CONACYT por el apoyo brindado a través del proyecto que lleva como título: “Identificación de variantes genéticas en el DNA mitocondrial y sus haplogrupos en población mestizo-mexicana de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 e hipertensión” con número **CB258103**.

Gracias a CONACYT por la beca con que me otorgo con Numero de Apoyo **775624** para realizar mis estudios de Maestría y este proyecto, el cual se llevó a cabo en el Laboratorio 1 del Departamento de Genética y Biología Molecular de CINVESTAV-IPN, Unidad Zacatenco, Ciudad de México, notándose con ello el compromiso que se tiene con el desarrollo científico.

Dedicatoria

A Dios.

Por permitirme día con día seguir en el camino, un camino que lleva mucho aprendizaje en él.

A mi familia.

A mis tíos, mi abuela, a mi abuelo que me observa desde el cielo y sé que me sigue cuidando a pesar de ya no estar físicamente conmigo, a mi hermana y la persona que a lucha por que logre mis objetivo, mi madre, a todos y cada uno de ellos por su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora María de Lourdes Muñoz, por aceptar ser mi directora de tesis, apoyarme cuando lo necesite y ser una fuente de conocimientos, haciéndome aprender mucho con sus consejos y observaciones en los seminarios y siempre apoyarme cuando lo necesite, en verdad muchas gracias doctora.

A mis asesores el Dr. Normand, la Dra. Bermúdez y al Dr. Luis Kameyama, por sus comentarios durante los seminarios y ayudarme en la mejora de este proyecto.

A todos los integrantes del laboratorio, mi amigo Rubén, Heriberto, Herbert, Gerardo, Erika y Karla por siempre estar ahí y apoyarme cuando lo necesitaba, porque muchos de los conocimientos que tengo igual es gracias a ellos y sus observaciones en lo seminarios, gracias.

Agradecimientos

Primero que nada, agradezco a Dios, que me ha guiado a no caer durante esta dura etapa, de pandemia y enfermedad, aunque ha sido complicado concluir no me ha permitido declinar y me ha enviado Espíritu Santo que me ha permitido ver que todo lo que he pasado durante todo este tiempo y ha sido para aprender muchísimo, gracias.

A mi amigo Abraham, un gran amigo desde ya hace muchos años y más que ser mi amigo lo considero como un hermano, siempre apoyándome en mis proyectos, no dejándome solo y desanimado ante las dificultades, levantando el ánimo y siempre siendo alguien del cual aprendo mucho.

A mi amiga Tita, es un ser humano increíble que durante toda la maestría siempre me apoyo y durante nuestras clases siempre estuvo ahí para estudiar, repasar y aprender, pero más allá de ello porque conoce mucho de mí y me ha apoyado más allá de la escuela, en verdad mil gracias.

A mi abuelito Mario porque a pesar del tiempo que lleva en el Reino de Dios, sigue presente en cada día de mi vida, recordarme siempre que hay que trabajar mucho para lograr lo que uno quiere y nunca hay que darse por vencido, sé que me cuida porque era como mi padre, gracias y te extraño.

A mi abuelita, mi “ma”, porque siempre me ha cobijado con su cariño y amor, recordándome el por qué lucho día con día por algo mejor, siendo ella mi inspiración y la quiero con el corazón, gracias por el apoyo que me brinda siempre en todo.

A mi tío Mario, mi tía Sandy y mis primitos Evan y Lya, mis tíos que siempre me apoyan con sus conocimientos y me muestran el cariño que me tiene y mis primitos que a pesar de su corta edad ambos me muestran su amor y me enseñan a no olvidar que cada día es una oportunidad de divertirse, aprender y amar sin importar lo que pase el día anterior.

A mi tío Carlos, tía chave y mis primitos, porque ellos me han enseñado lo bonito del trabajo y de luchas por las cosas que uno quiere, que no importa lo difícil de la situación si uno quiere algo y trabajo por hacerlo se puede lograrlo.

A mi hermana Diana, la nina, que es un ser humano increíble, que cada día me demuestra que siempre hay que luchar por sus sueños y no dejarse vencer, que a pesar de todo nunca hay que olvidar nuestra humanidad y ser solidario ante las dificultades de los demás, te quiero mucho hermana y siempre voy a estar agradecido por todo contigo.

Y por último a mi mamá, Trini como todos la conoce, porque me ha apoyado siempre, porque no importando las diferencias que podamos tener siempre está conmigo, dándome sus consejos, no dejándome en los malos momentos, trabajando y aprendiendo a demostrar día a día su cariño. Se que estos años han sido difíciles para ti por todo lo que se ha pasado, pero nunca te voy a dejar sola. Mamá mil gracias por todo, tú eres a la que al final agradezco por una razón, porque hasta el final sé que estarás conmigo, gracias.

Contenido

i. Lista de figuras y tablas.....	9
ii. Abreviaturas.....	11
iii. Resumen.....	12
iv. Abstract.....	13
Introducción.....	14
Diabetes.....	14
Epidemiología de la diabetes.....	15
Fisiopatología de la diabetes.....	16
Riesgos genéticos de la diabetes.....	17
La diabetes en México.....	19
Hipertensión.....	20
Epidemiología de la hipertensión.....	21
Fisiopatología de la hipertensión.....	22
Riesgos genéticos de la hipertensión.....	23
Mitocondria, DNA y metilación mitocondrial.....	24
Haplogrupos.....	27
Justificación.....	29
Hipótesis.....	30
Objetivo general.....	30
Objetivos específicos.....	30
Estrategia experimental.....	31
Materiales y métodos.....	32

Extracción de material biológico	32
Criterios de selección.....	32
Variables de estudio	33
Extracción y cuantificación de DNA total	37
Amplificación y secuenciación de la región hipervariable del mtDNA.....	37
Determinación de los haplogrupos mtDNA.	38
Análisis estadísticos	39
Resultados	41
Características de las muestras recolectadas.....	41
Discusión	52
Conclusión	56
Perspectiva	56
Referencias	57

i. Lista de figuras y tablas

Figura 1. Mapa de distribución de personas que viven con DMT2 entre las edades de 20 a 79 años.....	16
Figura 2. Mapa de distribución de tasa de mortalidad por enfermedades cerebrovasculares	21
Figura 3. Regiones del mtDNA y las asociaciones con diferentes enfermedades humanas, factores ambientales y SNV nucleares	26
Figura 4. Clasificación de haplogrupos de los individuos mexicanos de 2021	28
Figura 5. Amplificación de la región control en agarosa	42
Figura 6. Electroferograma de muestra tratada de la región control del mtDNA..	43
Figura 7. Distribución de frecuencias por subhaplogrupos del haplogrupo A en grafica de barras	44
Figura 8. Distribución de frecuencias por subhaplogrupos del haplogrupo B en grafica de barra	45
Figura 9. Distribución de frecuencias por subhaplogrupos del haplogrupo C en grafica de barras	46
Figura 10. Distribución de frecuencias por subhaplogrupos del haplogrupo D en grafica de barras	47
Figura 11 A. Comparación de frecuencias de subhaplogrupos A y B por grupos de controles, casos con diabetes (casos) y caso con diabetes e hipertensión (casos+HTA) en graficas de pastel.....	49

Figura 1 1 B. Comparación de frecuencias de subhaplogrupos C y D por grupos de controles, casos con diabetes (casos) y caso con diabetes e hipertensión (casos+HTA) en graficas de pastel.....	50
Figura 12. Frecuencias relativas de variantes de riesgo	51
Tabla 1. Variables de estudio	33
Tabla 2. Secuencia de las sondas TacMan usadas para identificar los Hg A, C y D	39
Tabla 3. Datos descriptivos metabólicos y antropométricos.	41

ii. Abreviaturas

<i>ALDR1</i>	Aldehído reductasa
<i>AR</i>	Aldosa reductasa
<i>CRS</i>	Secuencia de referencia de Cambridge
<i>DMT2</i>	Diabetes mellitus tipo 2
<i>GHR</i>	Receptor hormonal de crecimiento
<i>GLUT-4</i>	Transportador de glucosa 4
<i>HDL</i>	Lipoproteínas de alta densidad
<i>HTA</i>	Hipertensión
<i>IL-1 e IL-6</i>	Interleucinas 1 y 6
<i>IMC</i>	Índice de masa corporal
<i>IMSS</i>	Instituto Mexicano del Seguro Social
<i>LDL</i>	Lipoproteínas de baja densidad
<i>mtDNA</i>	DNA mitocondrial
<i>PPAR</i>	Receptor activador proliferador de peroxisoma
<i>ROS</i>	Especies reactivas de oxígeno
<i>TNF-α</i>	Factor de necrosis tumoral α

iii. Resumen

Las mitocondrias juegan un papel muy importante en la función y el metabolismo energético celular, estas contienen su propio genoma denominado DNA mitocondrial (mtDNA); las variantes y haplogrupos en el mtDNA juegan un papel fundamental en el desarrollo y la patología de diferentes enfermedades, asociadas al mal funcionamiento de las mitocondrias como en la diabetes e hipertensión. Por lo cual se identificaron las variantes en la región D-Loop del mtDNA para estudiar su asociación con hipertensión en pacientes de una población mestizo-mexicana con diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) que pudieran utilizarse como marcadores moleculares de riesgo o protección. La población de estudio incluye 927 muestras, divididos en tres grupos, uno incluye a los controles sanos y los otros dos a los pacientes con diabetes y pacientes con diabetes e hipertensión, provenientes del hospital No.1 “Dr. Calos MacGregor Sánchez Navarro” perteneciente al Instituto Mexicano del Seguro Social. Para esto se secuencio la región control del mtDNA para identificar las variantes genéticas y los haplogrupos por alineamiento con la secuencia de referencia de Cambridge (CRS). Siguiendo los criterios de Kumar *et al.*, (2011) se identificaron los haplogrupos A4 en el grupo control (7.4%), grupo con diabetes (8.7%), y grupo con diabetes e hipertensión (11%), A2e grupo control (11.6%), grupo con diabetes (6.9%), y grupo con diabetes e hipertensión (7.3%), C1 grupo control (8%), grupo con diabetes (8.7%), y grupo con diabetes e hipertensión (9.4%) y C1c grupo control (3.6%), grupo con diabetes (0.7%), y grupo con diabetes e hipertensión (1.6%), A2 grupo control (23%), grupo con diabetes (18.1%), y grupo con diabetes e hipertensión (11.5%), B2 (grupo control (23.9%), grupo con diabetes (22.2%), y grupo con diabetes e hipertensión (20.4%)), C1b grupo control (1.8%), grupo con diabetes (5.2%), y grupo con diabetes e hipertensión (4.7%) y C1d grupo control (2.5%), grupo con diabetes (1.4%), y grupo con diabetes e hipertensión (0.5%). Mientras que se identificaron 14 variantes con frecuencias igual o superiores al 15% en los grupos de controles y casos con diabetes e hipertensión.

iv. Abstract

The mitochondria play a very important function in cellular energy metabolism, they contain their own genome called mitochondrial DNA (mtDNA); variants and haplogroups in mtDNA play a fundamental role in the development and pathogenesis of different diseases associated with the malfunctioning of mitochondria, such as diabetes and hypertension. Then, we searched for variants in the D-Loop region of mtDNA to study the association of this variants with hypertension in patients from a mestizo-Mexican population with type 2 diabetes mellitus (T2DM) that could be used as molecular markers of risk or protection in these diseases. We have a total population of 927 samples, divided into a control group, patients with diabetes and patients with diabetes and hypertension, from hospital No.1 "Dr. Calos MacGregor Sánchez Navarro" belonging to the Mexican Social Security Institute. Sequencing of the mtDNA control region was performed for subsequent identification of genetic variants and haplogroups by alignment with the Cambridge Reference Sequence (CRS). Haplogroups were determined according to the criteria described by Kumar *et al.* (2011). The haplogroups identified were A4 in the control group (7.4%), the diabetes group (8.7%), the diabetes and hypertension group (11%), A2e in control group (11.6%), the group with diabetes (6.9%), and the group with diabetes and hypertension (7.3%), C1 in the control group (8%), the group with diabetes (8.7%), and the group with diabetes and hypertension (9.4%), C1c in the control group (3.6%), the group with diabetes (0.7%), and the group with diabetes and hypertension (1.6%) haplogroups A2 in the control group (23%), the group with diabetes (18.1%), and the group with diabetes and hypertension (11.5%), B2 in the control group (23.9%), the group with diabetes (22.2%), and the group with diabetes and hypertension (20.4%), C1b in the control group (1.8%), the group with diabetes (5.2%), and the group with diabetes and hypertension (4.7%), and C1d in the control group (2.5%), the group with diabetes (1.4%), and the group with diabetes and hypertension (0.5%). The variants with frequencies equal or greater than 15% were 14 and they will be analyzed to determine the association with diabetes and hypertension compare with the groups of controls and cases.

Introducción

Diabetes

La diabetes mellitus se refiere a las alteraciones metabólicas que dan como resultado hiperglucemia crónica (Kerner & Brückel, 2014). Esta enfermedad se caracteriza por altos niveles de glucosa en la sangre de las personas, debido a un déficit en la cantidad de insulina o porque las células no pueden utilizar de manera eficiente la insulina producida por el páncreas, dando como resultado una afección crónica (Organización Panamericana de la Salud, 2021).

La diabetes se clasifica principalmente en diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, diabetes mellitus gestacional y tipos específicos de diabetes debido a otras causas, teniendo como ejemplo, síndromes de diabetes monogénica dando como resultado la diabetes neonatal, enfermedades del páncreas exocrino como fibrosis quística y pancreatitis, y diabetes inducidas por fármacos o químicos como glucocorticoides que son usados después de algún trasplante de órgano o como tratamiento a VIH (American Diabetes Association, 2020).

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) tiene la mayor frecuencia dentro de todas las poblaciones del mundo, incluyendo México quien se encuentra dentro de los primeros lugares en prevalencia. Es una enfermedad de suma importancia para la investigación, debido a sus repercusiones económicas, demográficas y en la reducción de la esperanza de vida de la población, impactando negativamente en el bono productivo derivado de la transición epidemiológica. Esta enfermedad presenta diversos factores ambientales y genéticos que pueden ser estudiados desde distintas perspectivas en la población mexicana (Redondo *et al.*, 2020).

Epidemiología de la diabetes

La DMT2 es una de las enfermedades con mayor frecuencia en el mundo, se estimó que en el 2019 existía una población mundial de aproximadamente 7.7 mil millones de personas; 5 mil millones de ellos con edad entre 20 y 79 años, de los cuales 463 millones de personas padecieron en su mayoría DMT2 y de estos fallecieron cerca de 4.2 millones de personas, siendo en países de bajos ingresos donde se calcula que hay un mayor porcentaje de personas que la padecen (International Diabetes Federation, 2019).

En México desde el año 2000 la DMT2 se ha convertido en la principal causa de muerte en mujeres y la segunda en hombres, teniendo en el 2010 un total de 83,000 defunciones (Instituto Nacional de Salud Pública, 2021a). Para el año 2019 se estimaba que en el país existían aproximadamente 12.8 millones de personas con diabetes entre los 20 y 79 años, siendo así el sexto país con mayor número de casos a nivel mundial, solo por debajo de países como China, India y Estados Unidos (**Figura 1**) (International Diabetes Federation, 2019).

Tan solo en el primer trimestre del año 2021 se registraron 3,831 caso de pacientes, con DMT2 (Dirección General de Epidemiología, 2020), si esta tendencia continua y se espera que para el año 2045 al menos 700 millones de adultos tendrán algún tipo de diabetes, siendo los países de ingreso medios a bajos los más afectados (International Diabetes Federation, 2019).

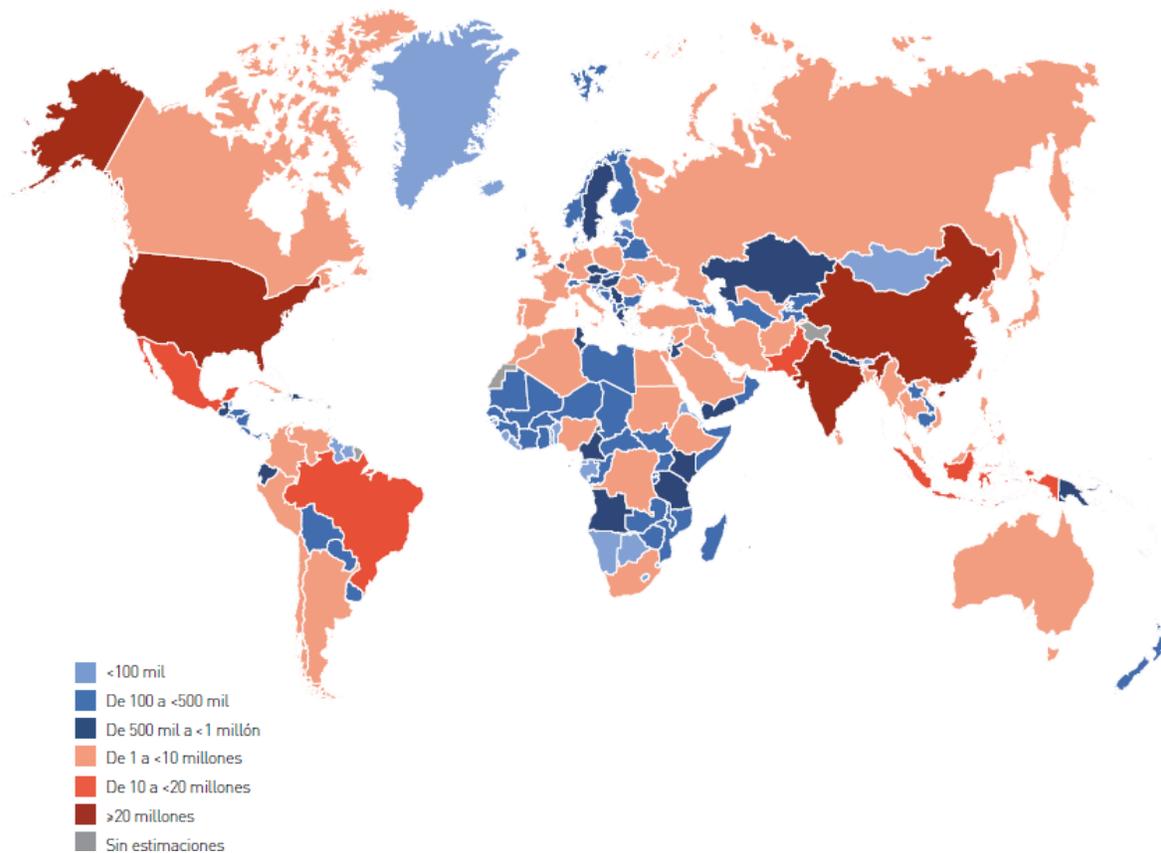


Figura 1. Mapa de distribución de personas que viven con DMT2 entre las edades de 20 a 79 años, figura tomada de International Diabetes Federation, 2019.

Fisiopatología de la diabetes

La DMT2 se caracteriza por concentraciones elevadas de glucosa en plasma y alteraciones metabólicas. La glucosa es la principal fuente de energía en el cuerpo humano, es absorbida en el intestino y se encuentra regulada por un complejo de actividades hormonales. Para que la glucosa entre a las células por difusión facilitada es necesario una eficaz señalización dirigida a través de insulina (Guthrie & Guthrie, 2004). Cuando esta enfermedad no se diagnostica a tiempo o no se le da la atención adecuada, puede desencadenar una serie de complicaciones que involucran otros factores relacionados con obesidad o enfermedades cardiometabólicas (Rozzo, 2020).

Las células beta son la principal fuente de secreción de insulina, si bien los distintos subtipos de diabetes comparten similitudes, la DM2 es la más común y es causada por dos principales factores como son: la secreción defectuosa de insulina por las células β pancreáticas y la incapacidad de los tejidos de responder adecuadamente a los estímulos de la insulina (Galicia-García *et al.*, 2020).

La resistencia a la insulina puede llegar a causar niveles altos de ácidos grasos libres que a su vez provocarán el aumento de la masa de células beta y la secreción de insulina para tratar de compensar la insensibilidad a la insulina. Todo este proceso tiene como consecuencia la alteración del metabolismo de los lípidos contribuyendo así a la disminución de la función de las células beta y la lipotoxicidad, promoviendo la DM2 (Himanshu *et al.*, 2020).

Riesgos genéticos de la diabetes

Existen diferentes factores ambientales (como la alimentación y el estilo de vida) y genéticos, así como sus complejas interacciones que están involucrados en el desarrollo de DM2 (Aka *et al.*, 2021).

Entre los factores genéticos que podrían estar contribuyendo al desarrollo de la diabetes están las diversas alteraciones que ocurren en el transportador de glucosa 4 (*GLUT-4*), la cual es una proteína encontrada en el citoplasma de células de tejido insulino dependientes, cuya función es la de captar glucosa sin gasto energético (Barakat & Almeida, 2021).

Otro factor genético, es la presencia de citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral α (*TNF- α*), las interleucinas 1 y 6 (*IL-1* e *IL-6*), y el ácido graso palmítico, los cuales pueden ocasionar resistencia a la insulina a través de la fosforilación de residuos de serina en el receptor a insulina (Barakat & Almeida, 2021).

Asimismo, se conoce el papel del gen aldosa reductasa (*AR*), también conocido como aldehído reductasa (*ALDR1*), en pacientes diabéticos que puede ser inducida por el metilglicoxal siendo el producto final de la glicación y el estrés oxidativo en un estado hiperglucémico. La *AR* está codificada por el gen *ALR2*, donde se ha

observado que las variantes asociadas a diabetes se encuentran en la región reguladora 5', corriente arriba de *ALR2* (Jankovic *et al.*, 2021).

La actividad de los receptores nucleares es muy importante para poder llevar a cabo las funciones metabólicas que dependen de la disponibilidad de ligandos endógenos, ácidos grasos y sus derivados producidos por la acción catabólica de las lipasas metabólicas. Un ejemplo es la triglicérido lipasa adiposa que es activada por el receptor activador proliferador de peroxisoma γ (*PPAR γ*) y a la inversa, libera ácidos grasos ligados por medio de los receptores activados por proliferadores peroxisómicos tipo α (*PPAR α*) demostrando la dependencia de las lipasas y los receptores nucleares (Dixon *et al.*, 2021).

Otras variantes importantes se encuentran en el factor de transcripción HNF; las variantes en los genes *HNF1- α* , *HNF4- α* y *HNF1- β* han sido relacionados con la diabetes juvenil también conocida como MODY (Çubuk & Yalçın Çapan, 2021).

Algunos estudios muestran que la presencia de variantes funcionales en *TCF7L2* y posiblemente en los genes que codifican el receptor de sulfonilurea como *KCNJ11* y *ABCC8* afectan la respuesta a las sulfonilureas aumentando el riesgo a DMT2. La compleja interacción de resistencia y secreción de insulina aún no están del todo clara, aunque las diversas investigaciones siguen contribuyendo a través del tiempo para un mejor entendimiento (Redondo *et al.*, 2020).

En México, la conocida variación genética del riesgo para el desarrollo de dislipidemia y DMT2, explica una baja proporción de la variación total del riesgo; entre los genes asociados a la determinación de los niveles de lípidos en la población mexicana están *GCKR*, *AKR1C4*, *HMGCR*, *SLC16A11*, *APOC3*, *APOA5/BUD13*, *ABCA1*, *LIPC*, *LPL* y *APOA1*, *LCAT*, *MLXIPL*, *RBM6*, *SPTLC3*, *ANXA9*, *LDLR*, *FADS1-2-3*, *NCAN* y *APOB*. Sorprendentemente, las variantes *SLC16A11* y *ABCA1*, derivadas de la ascendencia nativa americana, mostraron la mayor contribución a los niveles de lípidos y de DMT2 en esta población (Huerta-Chagoya *et al.*, 2020). Otras variantes en los genes *VEGFA* (rs2010963) y *SIRT1* (rs7896005) están asociados con rasgos cardiometabólicos, HDL-C y DBP en pacientes con DMT2, pudiendo explicar la susceptibilidad a desarrollar

complicaciones cardiovasculares y la comorbilidad derivada como principal causa de muerte en pacientes mexicanos con DMT2 (Totomoch-Serra *et al.*, 2018).

Hallazgos en población maya, grupo étnico del estado de Yucatán reveló una asociación de *SIRT1* (rs7896005) y *WFS1* (rs6446482) con DMT2 y demostró una alta covarianza para DMT2, la edad y el IMC con variantes *PPARGC-1α* (rs8192678), *SIRT1* (rs7896005), *TCF7L2* (rs7903146 y rs122243326), *UCP3* (rs3781907) y *HHEX* (rs1111875) (Dominguez-Cruz *et al.*, 2020).

Aunque la población mexicana se originó principalmente a partir de la mezcla de poblaciones ancestrales europeas y nativas americanas, estudios muestran la puntuación obtenida a partir de variantes genéticas derivadas de europeos no captura completamente el componente genético subyacente para la DMT2 y las dislipidemias en mestizos mexicanos. Por lo que se enfatiza la necesidad de identificar variantes de riesgo genético adicionales, que probablemente sean particulares para la población mexicana y otras poblaciones derivadas de nativos americanos (Huerta-Chagoya *et al.*, 2020).

La diabetes en México

Las poblaciones hispanas/latinas soportan una carga desproporcionadamente alta de DMT2. A pesar de que el riesgo de padecer esta enfermedad se centra directamente en los factores ambientales, con énfasis en los cambios en la dieta y el estilo de vida, se ha estimado que los factores genéticos representan entre el 20 y el 80 % de la variación en el desarrollo de DMT2 (Chande *et al.*, 2020).

La DMT2 es una enfermedad común en todo el mundo, pero su prevalencia varía ampliamente entre los diferentes grupos étnicos. La prevalencia de la diabetes en los EE. UU., según el origen étnico auto informado y la diabetes autodiagnosticada por el médico, varía del 17,7 % en personas europeas blancas al 22,5 % en asiáticos, el 30,6 % en hispanos y africanos y el 45,2 % en indios americanos/nativos de Alaska en adultos ≥ 75 años. Esta diversidad es incluso evidente en los subgrupos étnicos, donde los indios tienen el mayor riesgo de

enfermedad con un 38,8 % entre los asiáticos y los mexicanos tienen la prevalencia más alta 33,4 % entre los hispanos (Yaghootkar *et al.*, 2020).

La diabetes al ser un trastorno metabólico complejo y heterogéneo que a menudo se pre o postexistente con complicaciones tales como enfermedad cardiovascular, hipertensión, inflamación, enfermedad renal crónica, retinopatías y nefropatías diabéticas. La hipertensión o presión arterial alta sostenida (HTA), está fuertemente asociada con complicaciones diabéticas, al igual que es conocida como un factor de riesgo para enfermedad cardiovascular aterosclerótica y complicaciones microvasculares (Shoily *et al.*, 2021).

Hipertensión

La hipertensión arterial o HTA, es una afección en la que los vasos sanguíneos presentan un incremento en la presión de manera constante, debido a que la sangre ejerce una mayor fuerza contra las paredes de los vasos sanguíneos a medida que es bombeada por el corazón, que, a una mayor presión, mayor trabajo tendrá que realizar el corazón para bombear sangre al resto del cuerpo (World Health Organization, 2021). La HTA está relacionada con el desarrollo de comorbilidad y puede aumentar el riesgo de padecer cardiopatía isquémica, accidente cerebrovascular, enfermedad renal crónica o incluso demencia (Zhou *et al.*, 2021).

Las categorías en las que se puede clasificar a la HTA son normotensión (<120 mmHg sistólica y <80 mmHg diastólica), prehipertensión (120-129 mmHg sistólica y <80 mmHg diastólica), hipertensión en estadio 1 (130-139 mmHg sistólica o 80-89 mm Hg diastólica) e hipertensión en estadio 2 (≥ 140 sistólica o ≥ 90 mm Hg diastólica). Aunque estas categorías no se deben de basar en lecturas en un solo punto del tiempo, para confirmar se debe de realizar en 2 o más puntos de tiempo y hacer un promedio de estas tanto entre lecturas dentro como fuera de un consultorio, todo esto descrito en "The Eighth Joint National Committee" (Flack & Adekola, 2020).

Epidemiología de la hipertensión

La HTA es un problema de salud pública mundial que afecta desproporcionadamente a la población que se encuentra entre los de ingresos bajos y medios, donde su sistema de salud es frágil y el acceso a la atención de la enfermedad y comorbilidades asociadas requiere un mayor tiempo. Esta enfermedad no causa síntomas en las primeras etapas por lo que es difícil de identificar quien lo padece, y los que son diagnosticados, frecuentemente no tienen acceso a los tratamientos, impidiendo el control de la enfermedad de manera exitosa (Organización Mundial de la Salud, 2013).

En el 2008 las enfermedades cardiovasculares fueron responsables de aproximadamente 17 millones de muertes, de las cuales 9.4 millones fueron causadas por HTA y se encuentra asociada a 45% de las muertes por cardiopatías y el 51 % de muertes por accidentes cerebrovasculares, mostrándose en la figura 2 como se distribuye a nivel mundial esta mortalidad (Organización Mundial de la Salud, 2013).

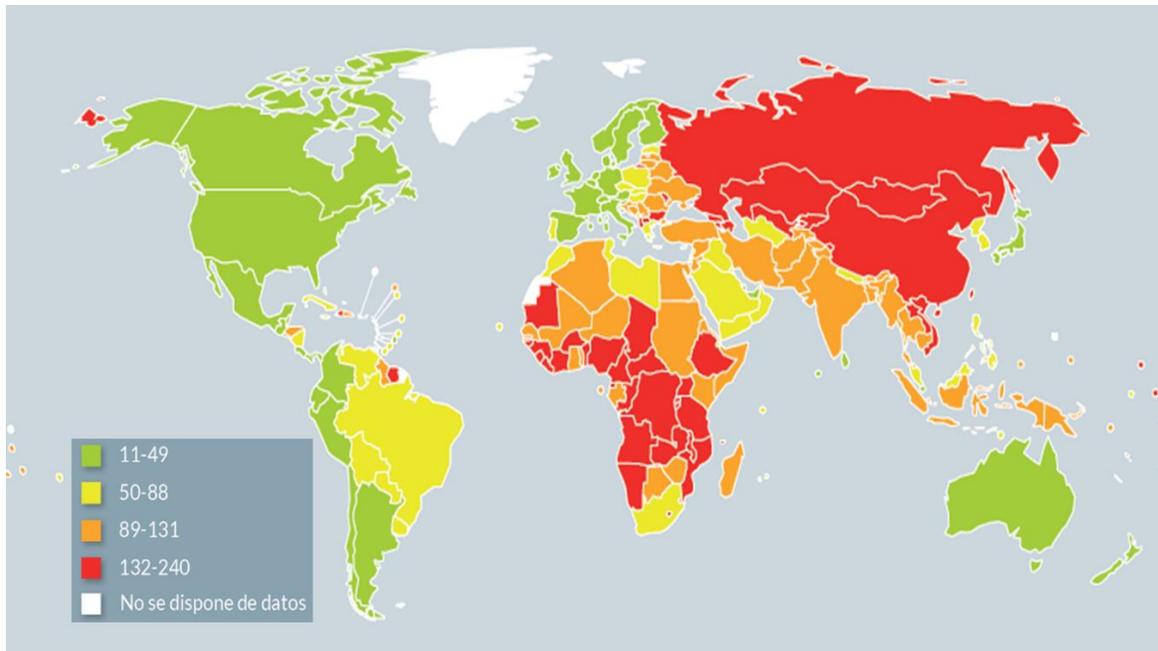


Figura 2. Mapa de distribución de tasa de mortalidad por enfermedades cerebrovasculares, figura tomada de (Organización Mundial de la Salud, 2013).

En el año 2015, en el mundo 1 de cada 4 personas del género masculino y 1 de cada 5 del género femenino padecían HTA. Adicionalmente solo 1 de cada 5 personas diagnosticadas con HTA tiene controlada la enfermedad adecuadamente; en el 2019 se estimó que en el mundo había 1130 millones de personas con esta enfermedad (World Health Organization, 2021).

En la región de las Américas anualmente ocurren 1.6 millones de muertes por enfermedades cardiovasculares, de las cuales medio millón son menores de 70 años; entre el 20 y 40% de la población adulta se ve afectada por la hipertensión, con un promedio de 250 millones de personas que padecen de presión arterial alta (Instituto Nacional de Salud Pública, 2021b).

En México 1 de cada 4 personas padecen de HTA, con una prevalencia de 26.1% en mujeres y 24.9% en hombres; se piensa que aproximadamente el 40% de estos ignoran que padecen la enfermedad y del 60% que conocen el diagnóstico solamente la mitad están controlando adecuadamente la enfermedad, lo cual tiene una importante repercusión en sus condiciones de salud (Instituto Nacional de Salud Pública, 2021b).

Fisiopatología de la hipertensión

La hipertensión al igual que la DMT2 es una de las causas de mayor morbilidad y mortalidad en el mundo debido a la afectación de órganos diana, el aumento de la rigidez vascular y una mayor resistencia vascular sistémica (Foëx & Sear, 2004).

Sin embargo, aún hay una gran incertidumbre sobre la fisiopatología de la hipertensión donde es probable que una gran cantidad de factores estén interrelacionados. Actualmente además de estudiar los factores comunes como son la ingesta de sal, la obesidad, la resistencia a la insulina, las alteraciones en el sistema renina-angiotensina y el sistema nervioso, se evalúan otros factores como son los factores genéticos, la disfunción endotelial, alteraciones en la nutrición intrauterina, bajo peso al nacer, y anomalías neurovasculares (Beevers, 2001).

A medida que las investigaciones han ido avanzando, se puede destacar la interacción entre factores como la inflamación crónica, el estrés oxidativo y el

microbioma que pueden alterar la interacción de la función renal, neural y vascular. Cabe mencionar que estos y otros factores que ya se mencionaron anteriormente pueden variar de ser humano a ser humano, sin embargo, la elevación de la presión arterial es algo que influye de manera significativa, provocando una interdependencia de un factor a otro (Harrison *et al.*, 2021)

Riesgos genéticos de la hipertensión

La hipertensión es un factor de riesgo que provoca una mortalidad muy alta a nivel mundial; algunas variantes identificadas en esta enfermedad en el gen *GRK4* son NP_892027.2:p.Arg65Leu (rs2960306), NP_892027.2:p.Val486Ala (rs1801058) y NC_000006.11:g.11070004A>G (rs2014323), estas variantes solas o combinadas tiene actividades de quinasa incrementada, pudiendo causar hipertensión debido a la regulación negativa del sistema dopaminérgico renal (Yue *et al.*, 2021).

Si bien las variantes pueden predisponen a padecer alguna enfermedad, algunos afectan más a una población que a otra, un ejemplo de esto es el gen *ADD1* el cual contiene la variante NP_001341683.1:p.Gly460Trp (rs4961) la cual se ha relacionado en población ucraniana con el aumento en el riesgo de padecer hipertensión arterial, permitiendo la posibilidad de realizar investigaciones similares en otras poblaciones (Yermolenko *et al.*, 2021).

Aunque hay variantes asociadas directamente a la HTA hay otras que se han asociado de manera indirecta, tal es el caso del gen de receptor hormonal de crecimiento (*GHR*) que se encuentra asociado con la longevidad, donde la variante NM_000163.5:c.-11-51315A>G (rs4130113) potencialmente influye en la unión con los factores de transcripción *E2A*, *MYF*, *NRSF*, *TAL1* y *TCF12*, alterando su expresión, y se propone que individuos con hipertensión mejoran la resiliencia celular que ayuda a proteger del estrés celular ocasionado por la enfermedad (Donlon *et al.*, 2021).

Actualmente se han identificado más de 30 genes con mutaciones raras y 1,477 variantes, que han resultado en formas hereditarias de hipertensión o hipotensión. Las variantes relacionadas con la hipertensión arterial, identificadas por estudios de

asociación en el genoma muestran relaciones pleiotrópicas, que pueden revelar señales y vías biológicas subyacentes, proporcionando oportunidades potenciales para la reorientación de tratamientos en la población afectada (Lip & Padmanabhan, 2020).

La asociación entre HTA y DMT2 es alta; el hecho de padecer DMT2 supone un aumento de riesgo de 2 a 4 veces más de sufrir enfermedades cardiovasculares a diferencia de aquellos individuos no diabéticos, este riesgo se ve multiplicado por 2 para complicaciones cardíacas, y por 4 para accidentes cerebrovasculares; esta combinación de DMT2 y HTA aumenta el riesgo de complicaciones tanto macro como microvasculares, considerando este el binomio patológico que más morbilidad causa en el ser humano (Abellán Alemán *et al.*, 2011).

Las enfermedades metabólicas producidas por una pérdida de la función mitocondrial son conocidas como enfermedades mitocondriales; en el mtDNA las mutaciones dan como resultado tanto una generación inadecuada de ATP como una mayor producción de especies reactivas de oxígeno, afectando potencialmente tejidos y órganos que tienen mayores demandas de energía como son el cerebro, el corazón y los músculos. La disfunción mitocondrial parece tener un papel en la patología de diabetes e hipertensión, una reducción en la eficiencia bioenergética mitocondrial para producir ATP puede tener un efecto nocivo directo sobre la capacidad de las células (Manolis *et al.*, 2021).

Mitocondria, DNA y metilación mitocondrial

Las mitocondrias tienen una función muy importante en el metabolismo energético celular, cuyo número va a depender de la demanda energética de la célula. Estas pueden alterar su morfología en respuesta a cambios en el estado metabólico; contienen su propio genoma (DNA mitocondrial) que está presente en múltiples copias en cada célula (Fazzini *et al.*, 2021).

El DNA mitocondrial (mtDNA) es circular de doble hebra y tiene aproximadamente 16.5kb de longitud, codifica para 37 genes. La replicación inicia en el bucle de desplazamiento o D-loop y aunque no se conoce totalmente su función, se sabe que

hay una amplia variabilidad en su secuencia; los exones son secuencias que codifican genes y que se encuentran fuera de la región D-loop, por lo que la probabilidad de que las variantes en el mtDNA sufran mutaciones es mayor respecto al DNA autosómico, lo que puede afectar directamente sus funciones (Wang Z. *et al.*, 2021).

A diferencia del DNA nuclear, que contiene por lo menos un promotor por gen, el mtDNA contiene solo tres regiones promotoras, para genes codificados por la cadena ligera (LSP), y promotores (HSP1 y HSP2) para los genes codificados por la cadena pesada H, que es el molde para la transcripción de la mayor parte de los genes, ubicados en el D-loop que contiene 1124 pb (Stoccoro & Coppedè, 2021). Aunque, los estudios en relación con los efectos funcionales de las variantes del mtDNA y el potencial terapéutico de los péptidos derivados de las mitocondrias en los en las variantes han sido poco explorados (Zempo *et al.*, 2021).

Las tasas de mutación del mtDNA depende de factores, tales como el grado de estrés oxidativo y la fidelidad de la DNA polimerasa mitocondrial, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), hallándose como el resultado inevitable del proceso de fosforilación oxidativa que ocurre dentro de la mitocondria, estos subproductos químicos son por naturaleza dañinos para el DNA (H. Li *et al.*, 2019).

Algunos estudios demuestran que la variante en la posición 16,189 del mtDNA se ha asociado con el síndrome metabólico, en un estudio de casos y controles en pacientes chinos de Taiwan de 40 años o más, repostándose una prevalencia de la variante del 38.2%, estos resultados son similares a los reportados por otras poblaciones como coreana (28.8%), japonesa (34.4%), china continental (30%) y amerindia de Panamá (28.5%); de igual manera se ha asociado la variante con mayores concentraciones de insulina en ayunas, índice de resistencia a la insulina e infarto cerebral lacunar. Estos datos apoyan la participación de la variación genética mitocondrial en la patogénesis de la DMT2 (Wang P.-W. *et al.*, 2009).

Las alteraciones epigenéticas del genoma nuclear, incluyendo su metilación, la regulación postranscripcional del RNA no codificante y las modificaciones de histonas se han identificado más frecuentemente en la patogénesis de varias

enfermedades humanas. También, existen evidencias que sugieren que las modificaciones epigenéticas del genoma mitocondrial pueden estar interviniendo en la etiología de las enfermedades humanas con son el cáncer, la obesidad, la diabetes, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas, asociadas a diferentes regiones del genoma mitocondrial (**Figura 3**). Se han encontrado niveles alterados de metilación del mtDNA en modelos animales y en tejidos humanos de pacientes afectados por cáncer, obesidad, DMT2 y enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, lo que ha ayudado a identificar una probable influencia de los factores ambientales, así como de las variantes del DNA nuclear, a través de alteraciones en los patrones de metilación del mtDNA (Stocco & Coppedè, 2021).

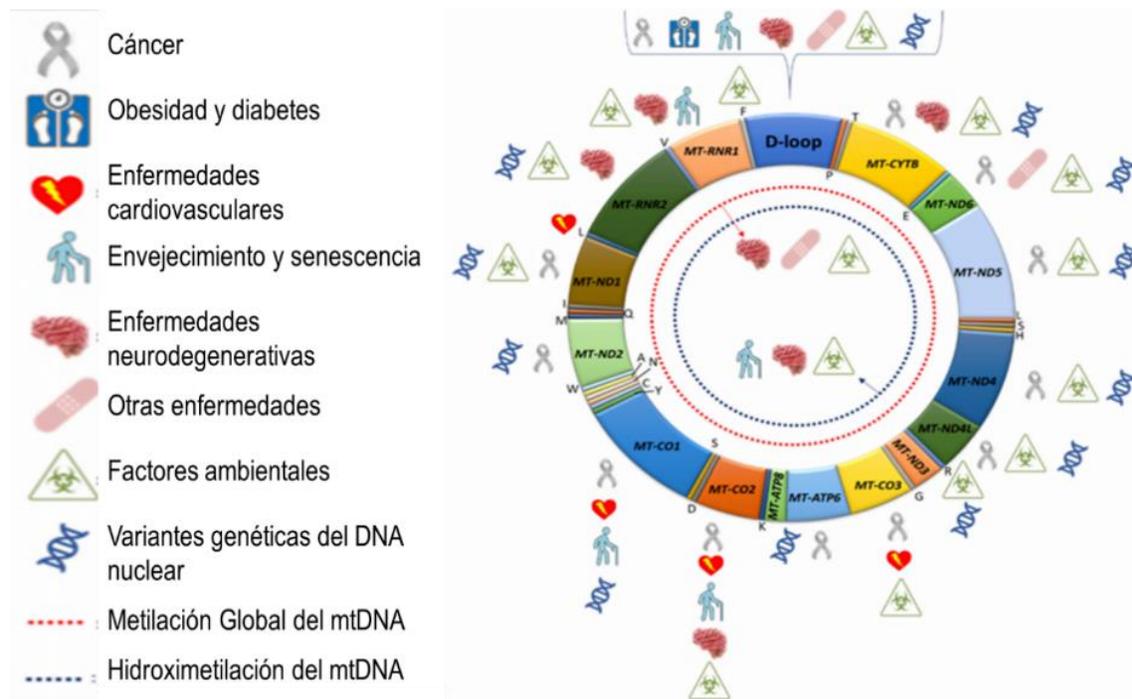


Figura 3. Regiones del mtDNA y las asociaciones con diferentes enfermedades humanas, factores ambientales y SNV nucleares. Figura tomada de (Stocco & Coppedè, 2021).

Las variaciones y la disfunción del mtDNA juegan un papel fundamental en el desarrollo y la patogenia de diferentes enfermedades. La evidencia sustancial implica una asociación fundamental entre los haplogrupos de mtDNA humano y

enfermedades asociadas a al mal funcionamiento de las mitocondrias (Bao *et al.*, 2021) .

Haplogrupos

México es una rica fuente de estudios antropológicos y de genética de poblaciones con alta diversidad en grupos lingüísticos y étnicos, el cual fue testigo del auge y la caída de las principales civilizaciones, incluidas la maya y la azteca dando como resultado la colonización europea, cambiando así el panorama de la población drásticamente. Hoy en día, la mayoría de los mexicanos no se identifican como indígenas sino como mestizos, y parecen tener muy poco en común con sus antecesores precolombinos. Sin embargo, cuando se investiga el mtDNA heredado de la madre en la población mexicana moderna, este no es el caso; las secuencias de la región de control de muestras de 2021 derivadas de todo el país revelaron un abrumador legado indígena estadounidense, con casi el 90 % de los mtDNA pertenecientes a los cuatro principales haplogrupos panamericanos A2, B2, C1 y D1 (**Figura 4**) (Bodner *et al.*, 2021a).

Varios estudios muestran que la variación del mtDNA surgió durante la dispersión humana moderna en todo el mundo. Muchas variantes que modulan la producción de energía también están asociadas con subproductos metabólicos dañinos y disfunción mitocondrial, que, a su vez están implicados en el inicio y la gravedad de varias enfermedades mitocondriales adultas diferentes. Por lo tanto, la variación del mtDNA que gobierna la bioenergética, el metabolismo y la termorregulación puede tener consecuencias potencialmente adversas para la salud humana (Friedrich *et al.*, 2021).

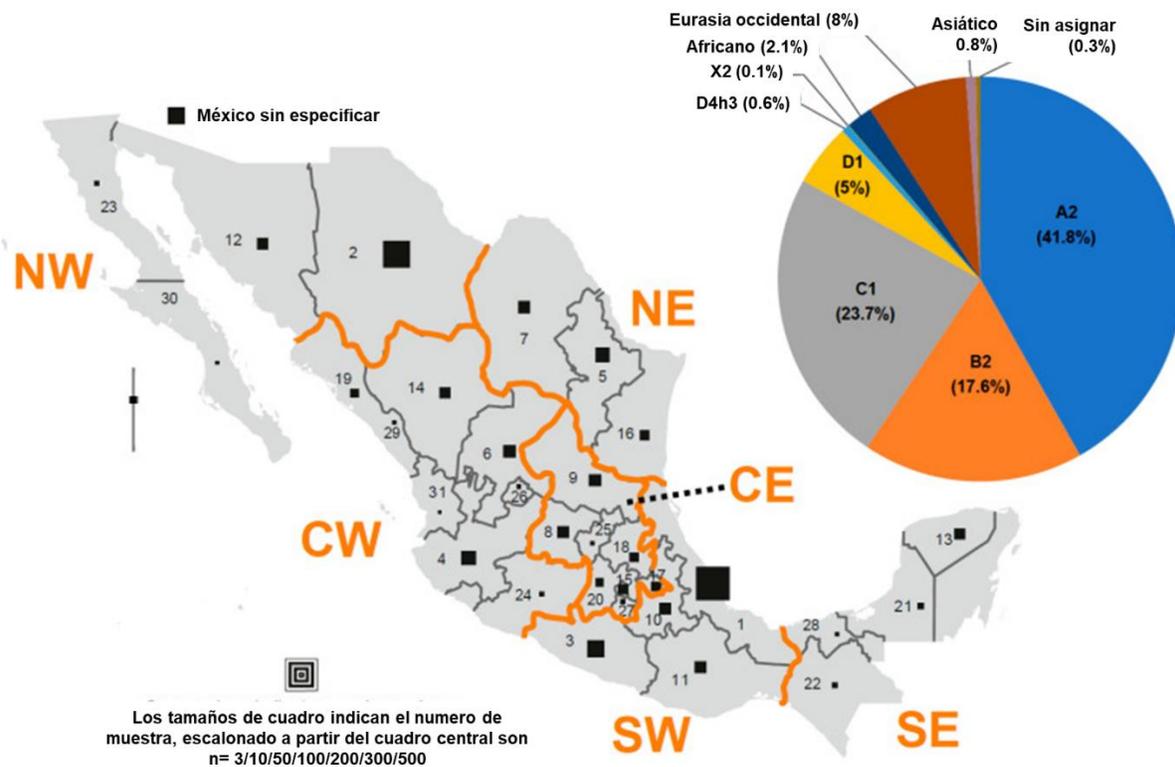


Figura 4. Clasificación de haplogrupos de los individuos mexicanos de 2021. El mapa muestra las 32 unidades administrativas de México (31 estados y la Ciudad de México, el antiguo Distrito Federal) y las muestras de cada una de las unidades analizadas en este estudio (representadas en diferentes tamaños de cuadro). Los subconjuntos geográficos indicados por líneas naranjas y texto son Noroeste (NW), Noreste (NE), Centro-Oeste (CW), Centro-Este (CE), Suroeste (SW) y Sureste (SE). El gráfico circular muestra las proporciones de los haplogrupos indígenas americanos y otras contribuciones al conjunto de mtDNA mexicano. Figura tomada de (Bodner *et al.*, 2021b).

Ya que las mitocondrias son las principales encargadas del metabolismo de la célula y por lo tanto consideramos que puede existir un papel directo sobre la DMT2 e hipertensión, y debido a la importancia del mtDNA y sus funciones, el presente estudio se enfocó al análisis de las variantes y sus haplogrupos para evaluar la asociación que puede existir en individuos con DMT2 e hipertensión comparados con individuos no afectados.

Justificación

La DMT2 es una enfermedad crónica con una alta incidencia en la población mexicana y entre las comorbilidades asociadas a un estado hiperglucémico crónico derivado de la enfermedad se encuentra la hipertensión arterial, la cual también tiene una incidencia alta en población mexicana. En México estas enfermedades representan problemas graves de salud, ya que desde el año 2000 la DMT2 es la principal causa de muerte entre mujeres y la segunda en hombres, teniendo en el 2019 un total de 104,352. Así también la hipertensión ha tenido una prevalencia de 26.1% en mujeres y 24.9% en hombres, padeciéndola 1 de cada 4 personas, lo que repercute en las condiciones de salud de los mexicanos, en la esperanza de vida y en afectaciones económicas para el país, derivado del desarrollo de comorbilidad y gastos permanentes en atención de salud, suministros médicos y mayor demanda de recursos humanos en salud. La prevalencia de ambas enfermedades sigue aumentando en México y en todo el mundo a medida que se adoptan estilos de vida poco saludables como la ingesta de alimentos con alto valor calórico y actividades de bajo gasto energético. Su frecuente coexistencia en un individuo no es coincidencia, ya que hay aspectos fisiopatológicos compartidos por ambas enfermedades, especialmente las relacionadas con la obesidad y su resistencia a la insulina.

A pesar de que el mtDNA es de gran importancia en el desarrollo de la DMT2 y la hipertensión, la identificación de variantes en el mtDNA y su asociación con ambas enfermedades no ha sido muy estudiada. Por lo tanto, el enfoque de este trabajo es hacer un estudio de casos y controles para identificar las variantes en la región D-Loop del mtDNA asociadas a la hipertensión en pacientes mexicanos con DMT2.

Hipótesis

Si algunas variantes en el mtDNA están relacionadas con el desarrollo de la enfermedad, entonces podrían utilizarse como marcadores moleculares de riesgo o protección a diabetes y/o hipertensión.

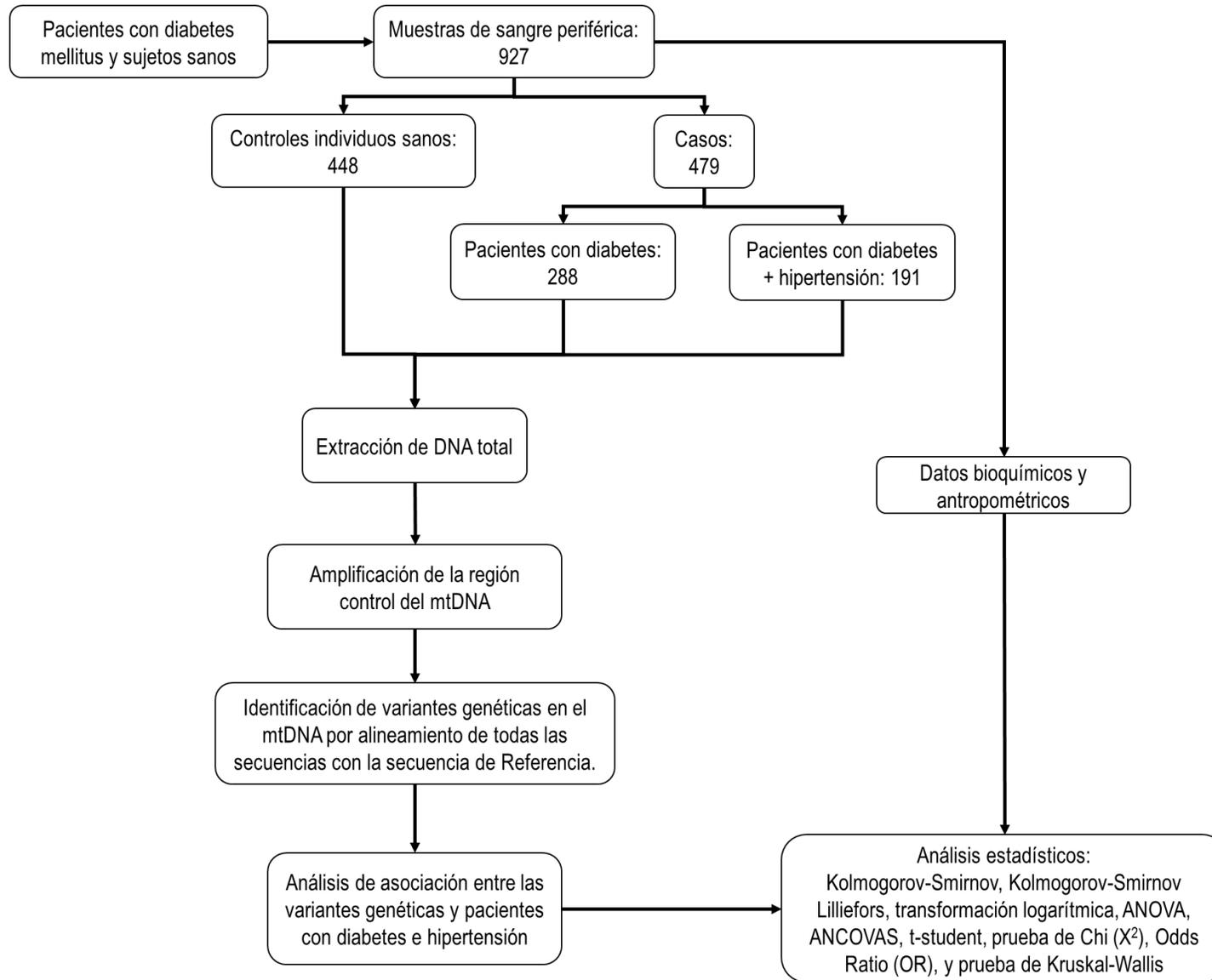
Objetivo general

Identificar las variantes en la región D-Loop del mtDNA asociados a la hipertensión en pacientes de una población mestizo-mexicana con DMT2.

Objetivos específicos

1. Identificar las variantes en la región control del mtDNA de pacientes con DTM2, pacientes con DTM2 e hipertensión, y controles sanos.
2. Realizar un estudio de asociación entre las variantes en la región control del mtDNA de personas con DMT2 e hipertensión comparado con controles sanos.
3. Elaborar un estudio para asociación casos y controles de los haplogrupos en pacientes con DMT2, pacientes con DMT2 e hipertensión y controles sanos.
4. Determinar las variantes genéticas, las variables clínicas y metabólicas en los grupos de diabetes y diabetes con hipertensión, comparados con controles sanos.

Estrategia experimental



Materiales y métodos

Diseño del estudio

Casos y controles, transversal, retrospectivo.

Extracción de material biológico

Con base a los trabajos previos en el grupo de investigación, se trabajará con el DNA total de 927 muestras, agrupándose en controles, casos con diabetes y casos con diabetes e hipertensión, siendo un estudio por conveniencia de acuerdo con (Hernández & Carpio, 2019). Las muestras son provenientes del Hospital General Regional No. 1 “Carlos MacGregor Sánchez Navarro”, del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), previamente el protocolo fue aprobado por el Comité Nacional de Investigación Científica del IMSS, con número de registro R-2017-785-071, conservando la confidencialidad de la información. A todos los pacientes se les informó sobre los procedimientos a realizar y se obtuvo su consentimiento escrito correspondiente.

Criterios de selección

1) Criterios de inclusión

En el grupo de casos se seleccionaron de acuerdo con los criterios de la Asociación Americana de Diabetes

- Participantes mexicanos con al menos tres generaciones en México.
- Que cumplieran con cualquiera de los siguientes niveles de glucosa:
 - o Glucosa basal ≥ 126 mg/dL (7.0mmol/L).
 - o Glucosa casual >200 mg/dL (11.11 mmol/L) en caso de los enfermos con síntomas de hiperglucemia.
 - o Glucosa postprandial >200 mg/dL.
- Glicemia normal mientras toma hipoglucemiantes orales.
- Cualquier genero
- Edad entre 42 y 55 años

Para el grupo de controles estos debieron cumplir con:

- No presentar criterios que los ubiquen con síndrome metabólico de acuerdo con los criterios de ATP III (National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III).
 - Glucosa basal de 12 horas <100 mg/dL
 - Glucosa postprandial <140 mg/dL.
 - Edad entre 42 a 55 años.
- 2) Criterios de no inclusión
- Casos que presentaron alguna enfermedad infectocontagiosa u otras que pudieran reducir su sobrevida o que pudieran confundir la ocurrencia de eventos.
 - Mujeres embarazadas
- 3) Criterios de exclusión
- Pacientes que no desearon participar en el proyecto de investigación.
 - Pacientes que no cumplieron con alguno de los requisitos.

Variables de estudio

En la tabla 1 se muestran las variables consideradas para este estudio.

Tabla 1. Variables de estudio.

Variable	Definición operacional	Escala de medición	Unidad de medición
Diabetes Mellitus tipo 2	Es un conjunto de trastornos metabólicos, cuya característica principal es la presencia de concentraciones elevadas de glucosa en la sangre de manera crónica, debido ya sea a un defecto en la producción de insulina o resistencia a la misma. Será evaluada por diagnóstico médico confirmatorio.	Cuantitativa nominal	Presente/ausente

Hipertensión	La hipertensión arterial es una enfermedad crónica en la que aumenta la presión con la que el corazón bombea sangre a las arterias, para que circule por todo el cuerpo.	Cuantitativa nominal	Presente/ausente
Edad	Tiempo que ha vivido una persona u otro ser vivo contando desde su nacimiento.	Cuantitativa continua, posteriormente se dicotomizará	Años cumplidos <65 años=0 ≥65 años=1
IMC	El índice de masa corporal (IMC) es un número que se calcula con base en el peso y la estatura de la persona.	Cuantitativa continua	kg/m ²
Glucosa	Es el azúcar principal que se encuentra en su sangre. Esta proviene de los alimentos que usted consume y es su principal fuente de energía. Su sangre lleva la glucosa a todas las células de su cuerpo para ser usada como energía.	Cuantitativa continua	mg/dl
Urea	Es el principal residuo de la descomposición de las proteínas. Está directamente relacionada con la cantidad de proteínas que comemos y con las que el propio cuerpo descompone, lo que depende de la masa muscular.	Cuantitativa continua	mg/dl
Creatinina	Es un producto de desecho generado por los músculos	Cuantitativa continua	mg/dl

	<p>como parte de la actividad diaria. Normalmente, los riñones filtran la creatinina de la sangre y la expulsan del cuerpo por la orina. Cuando hay un problema con los riñones, la creatinina se puede acumular en la sangre y sale menos por la orina.</p>		
Colesterol	<p>Es una sustancia cerosa y parecida a la grasa que se encuentra en todas las células de su cuerpo. Su cuerpo necesita algo de colesterol para producir hormonas, vitamina D y sustancias que le ayuden a digerir los alimentos.</p>	Cuantitativa continua	mg/dl
HDL	<p>Significa lipoproteínas de alta densidad en inglés. A veces se le llama colesterol "bueno" porque transporta el colesterol de otras partes de su cuerpo a su hígado. Su hígado luego elimina el colesterol de su cuerpo.</p>	Cuantitativa continua	mg/dl
LDL	<p>Significa lipoproteínas de baja densidad en inglés. En ocasiones se le llama colesterol "malo" porque un nivel alto de LDL lleva a una</p>	Cuantitativa continua	mg/dl

	acumulación de colesterol en las arterias.		
Triglicéridos	Son un tipo de grasa. Son el tipo más común de grasa en su cuerpo. Proviene de alimentos, especialmente mantequilla, aceites y otras grasas que usted come. Los triglicéridos también provienen de calorías adicionales.	Cuantitativa continua	mg/dl
Presión sistólica	Es la presión causada cuando el corazón se contrae y empuja la sangre hacia afuera.	Cuantitativa continua	mm Hg
Presión diastólica	Es la presión que ocurre cuando el corazón se relaja y se llena de sangre.	Cuantitativa continua	mm Hg
Haplogrupos	Variantes en el mtDNA que influyen en la función mitocondrial, eventos metabólicos y que aumentan la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades.	Cuantitativa discreta	A,B,C,D

Extracción y cuantificación de DNA total

Se obtuvo DNA total de las muestras utilizando el protocolo de extracción “DNeasy Blood & Tissue Kit” (Qiagen Núm. Cat. 69506, EUA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se diluyeron en 50 µl y un espectrofotómetro (NanoDrop 2000) se determinó la concentración de DNA de cada muestra. El DNA estuvo almacenado a -70°C hasta su uso.

Amplificación y secuenciación de la región hipervariable del mtDNA

Se amplificó la región D-loop del mtDNA mediante PCR en un volumen final de 30 µl como se describe a continuación: un µl de buffer 10X, una unidad de polimerasa de alta fidelidad (Jena Bioscience, Núm. Cat. PCR-2014L, Alemania), 0.5 µl (20 pmoles/µl) del primer L15811 (5´TCATTGGACAAGTAGCATCC-3´), 0.5 µl (20 pmoles/µl) del primer H775 (5´AGGCTAAGCGTTTTGAGCTG-3), 0.5 µl de la mezcla de dNTP (solución equimolar ultrapura 10 mM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP; Jena Bioscience, Núm. Cat UN-1006, Alemania), 40ng de DNA molde. Entonces el termociclador se programó de la siguiente manera: tres minutos de activación térmica de la polimerasa de alta fidelidad a 95°C, posteriormente 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 40 s, seguido de 58°C de alineamiento durante 40 s, 68°C de extensión durante 90 s y, por último, un ciclo por 7 min. Los productos de PCR amplificados fueron purificados, mediante el kit Sap-Exo (Jena Bioscience, Núm. Cat. PP-218L, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los productos purificados se secuenciaron de manera automática en un equipo ABI PRISM 3100, incluyendo el kit de secuenciación BigDye Terminator v3.1 (Applied Núm. Cat 4337458 Biosystems, EUA y los primers específicos L15811, H775, L16420 (5´- CACCATTAGCACCCAAAGCT-3´; 20 pmoles/µl), y H5 (5´- GAGTGGTTAATAGGGTGATAG-3´; 20 pmoles/µl). Las secuencias obtenidas se analizaron para determinar las variantes mitocondriales de cada una de las muestras.

Determinación de los haplogrupos mtDNA.

La determinación de los diferentes haplogrupos del mtDNA, se llevó a cabo mediante secuenciación de la región D-loop y la determinación de variantes específicas. Cada una de las secuencias obtenidas, fue comparada con la secuencia de referencia de Cambridge (CRS), las variantes identificadas se clasificaron siguiendo el criterio descrito por (Kumar *et al.*, 2011), y se confirmaron mediante Mitomaster, para determinar el Hg y SubHg de cada una de las muestras. Para determinar las variantes específicas en la región codificante para los Hg A, C y D, mediante PCR tiempo real, usando sondas TaqMan específicas para cada uno de los haplogrupos (cada una de las sondas y variantes se describen en la Tabla 5), el equipo StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) y el reactivo qPCR GreenMaster highROX (Jena Bioscience Núm. Cat PCR-368L, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante. En el caso del Hg B se determinó la delección de 9 pb en la región codificante (Δ mtDNA8281-8289) con ayuda de los primers L8200 (5´-ATGCTAAGTTAGCTTTACAGTG-3´; 20 pmoles/ μ l) H8300 (5´-ACAGTTTCATGCCCATCGTC-3´; 20 pmoles/ μ l), todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de reacción final de 30 μ l, que contenía una unidad de polimerasa de alta fidelidad (Jena Bioscience, Núm Cat. PCR-2014L, Alemania), 0.5 μ l del primer L8200 (20 pmoles/ μ l), 0.5 μ l del primer H8300 (20 pmoles/ μ l), 0.5 μ l de la mezcla dNTP (Jena Bioscience Núm. Cat UN-1006, Alemania; mezcla equimolar 10 mM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), y 40 ng de DNA molde, se siguió el protocolo del termociclador: 3 minutos de activación térmica de la enzima a 95°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 40 s, 56°C de alineamiento por 40 s, 68°C de extensión por 40 s, por último, un ciclo a 68°C, 5 min. Una vez amplificado se analizó mediante una electroforesis en geles de acrilamida al 15% (UltraPure Acrylamide, Invitrogen, Núm. Cat. 15512023, EE. UU), en donde se observó un retiro de banda menor a 100 pb nos indicó que la muestra tiene la delección de 9 pb característica del HgB.

Tabla 2. Secuencia de las sondas TacMan usadas para identificar los Hg A, C y D.

Variantes	HG	Secuencia de la sonda 5´-3´	Reportero
A663G	A	TGTTAGTCATGTTA G CCTTGTT TGTTAGTCATGTTA T CCTTGTT	VIC FAM
A13263G	C	CACTTCAAGTCA A CTAGGAC ACTTCAAGTCA G CTAGGAC	VIC FAM
C5178A	D	TGTTAGTCATGTTA G CCTTGTT TGTTAGTCATGTTA T CCTTGTT	VIC FAM

Después de obtener los electroferogramas de la secuencia de la región hipervariable I y II, se analizan y se determinan los cambios de bases de las secuencias en estudio con respecto a la Secuencia de Referencia de Cambridge (NC_012920.1) mediante el software Sequencher 4.1.4 y se comparan estos cambios (polimorfismos) con la tabla de Kumar para asignar el haplogrupo y subhaplogrupo correspondiente. Posteriormente, para comprobar la asignación del haplogrupo, las secuencias se suben en el analizador de secuencias en la página web Mitomap (<https://mitomap.org/foswiki/bin/view/MITOMASTER/WebHome>), el cual proporciona el haplogrupo correspondiente a la secuencia problema de acuerdo con la base de datos de genomas mitocondriales.

Análisis estadísticos

Los datos de las variables clínicas, metabólicas y genotípicas se capturaron en una base de datos de Excel provenientes del Hospital General Regional No. 1 Carlos MacGregor Sánchez Navarro, del IMSS, ubicado en Ciudad de México, por el personal de salud capacitado en investigación nos serán proporcionados.

Se realizó una prueba de normalización para las variables continuas de acuerdo con el número de variables y datos obtenidos entre las pruebas a considerar se encuentran Kolmogorov-Smirnov y Kolmogorov-Smirnov Lilliefors. Las variables que no presenten una distribución normal se transformaron de acuerdo con sus características de distribución, entre las transformaciones potencialmente a utilizar

se encuentran la transformación logarítmica y prueba de Kruskal-Wallis. Posteriormente realizaron análisis univariados comparando distribuciones entre grupos, para variables cuantitativas se utilizarán las pruebas ANOVA, ANCOVAS, t-student y para variables categóricas prueba de Chi (X²) y Odds Ratio (OR). Para analizar la asociación con la enfermedad se realizó una regresión logística ajustando a covariables y correlacionando los valores de significancia estadística de acuerdo con el número de variantes analizadas considerando la prueba de bondad de ajuste de Bonferroni, teniendo con $p < 0.05$ como valor inicial.

Posteriormente se analizaron los datos de las variantes candidatas por medio de estudios *in silico* permitiendo anticipar la magnitud de la respuesta del sistema en estudio con las diferenciaciones de las variables intervinientes o *in vitro* aproximándonos a los mecanismos subyacentes.

Resultados

Características de las muestras recolectadas

Los datos que se muestran en la tabla 3 corresponden a una población total de 927 muestras, 448 controles y 479 casos divididos en dos grupos de 288 pacientes con diabetes y 191 pacientes con diabetes e hipertensión, siendo un estudio por conveniencia, provenientes del hospital No.1 “Dr. Calos MacGregor Sánchez Navarro” perteneciente al Instituto Mexicano del Seguro Social. Los promedios de edad, índice de masa corporal (IMC), glucosa, urea, creatinina, colesterol, triglicéridos, presión sistólica y presión diastólica fueron distintas, presentándose las cifras más altas en todos los parámetros mencionados en el grupo de DM con hipertensión (HTA) que en el grupo que solo presenta diabetes. No se observan diferencias en los promedios de colesterol de alta densidad (HDL) y colesterol de baja densidad (LDL).

Tabla 3. Datos descriptivos metabólicos y antropométricos.

POBLACION TOTAL		GRUPO DE CONTROL	GRUPO DM	DM COMBINADO CON HTA	
INDICADORES	media ± DE	media ± DE	media ± DE	media ± DE	P
NO. DE CASOS	927	448	288	191	
EDAD	52.19 ± 10.21	47.46 ± 8.17	55.67 ± 10.7	58.05 ± 9.59	1.70E-47*
IMC	28.43 ± 4.71	27.43 ± 3.88	28.46 ± 5.03	30.70 ± 5.17	3.49E-15*
GLUCOSA	123.11 ± 62.82	85.99 ± 9.78	155.82 ± 72.79	160.87 ± 68.56	2.03E-80*
UREA	31.65 ± 14.09	27.61 ± 8.16	35.17 ± 17.57	35.31 ± 16.10	1.60E-15*
CREATININA	0.85 ± 0.30	0.82 ± 0.17	0.85 ± 0.30	0.92 ± 0.47	0.0003*
COLESTEROL	194.42 ± 43.71	190.86 ± 39.79	194.27 ± 44.72	202.96 ± 49.60	0.006*
HDL	45.55 ± 14.08	46.19 ± 14.77	45.42 ± 13.17	44.26 ± 13.74	0.281
LDL	132.35 ± 34.99	131.04 ± 33.75	130.80 ± 35.62	137.77 ± 36.50	0.055
TRIGLICERIDOS	180.35 ± 114.65	153.65 ± 77.42	193.35 ± 130.46	223.39 ± 142.99	5.38E-13*
PRESION SISTOLICA	119.06 ± 13.99	115.76 ± 10.37	113.87 ± 11.62	134.63 ± 13.67	2.73E-62*
PRESION DIASTOLICA	76.34 ± 10.07	71.09 ± 7.22	75.63 ± 6.38	89.75 ± 7.94	3.09E-108*

Pruebas realizadas: ANOVA para media y desviación estándar.

*Muestra los valores estadísticamente significativos ($P < 0.05$) entre grupo control, grupo con DM y grupo con DM e HTA por prueba ANOVA.

Se trabajo en la optimización de la técnica para la amplificación de la región control por PCR para la identificación de las variantes en las muestras, lográndose una técnica correcta al posterior tratamiento con la obtención del amplificado correcto, como se observa en el ejemplo de la figura 5.

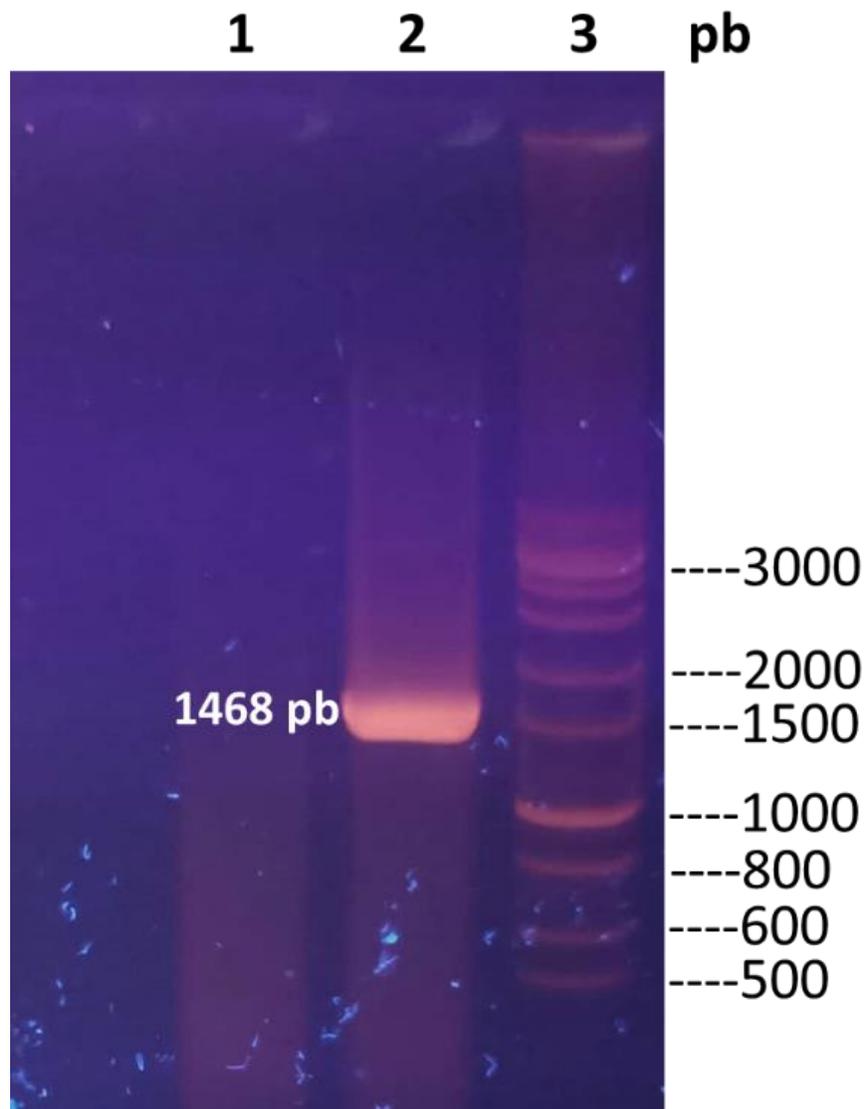


Figura 5. Amplificación de la región control en agarosa 1%, aplicando 110V por 30 min, en el pocillo 1 se tiene control negativo, en el pocillo 2 muestra tratada de mtDNA y en el pocillo 3 marcador de 1 Kbp.

A continuación, se realizó la secuenciación de muestras para la obtención de electroferogramas (Figura 6) y su posterior alineamiento con la secuencia de referencia de Cambridge.

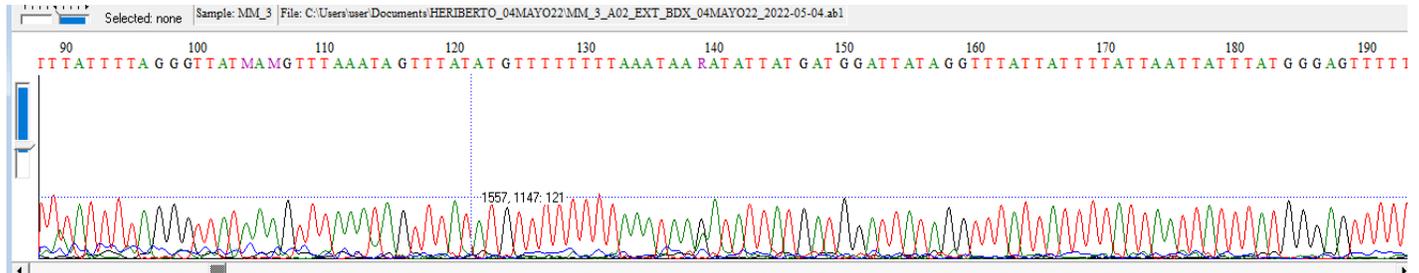


Figura 6. Electroferograma de muestra tratada de la región control del mtDNA.

Posteriormente se realizó el análisis de los haplogrupos en las muestras, enfocándonos en los subhaplogrupos, en los tres grupos de estudio, controles, casos que presentan diabetes y de casos que presentan diabetes e hipertensión.

En la figura 7 se muestran los subhaplogrupos A, donde se observan frecuencia de importancia en A4, A2 y A2e. En el subhaplogrupo A4 se observa una frecuencia ascendente en relación con el grupo control (7.4%), seguido del grupo que presenta diabetes (8.7%) y posteriormente el grupo que presenta diabetes e hipertensión (11%). En el subhaplogrupo A2 sucede lo contrario al subhaplogrupo A4 teniendo una frecuencia descendente en relación con el grupo control (23%), seguido del grupo que padece diabetes (18.1%) seguido del que padece diabetes e hipertensión (11.5%). El subhaplogrupo A2e presenta una diferencia entre el grupo control (11.6%), pero no entre los grupos que tienen diabetes (6.9%) y el grupo que presentan tanto diabetes como hipertensión (7.3%), tendiendo entre estos dos grupos frecuencias muy similares, siendo todos estos resultados significativos con una $p= 3.5 \times 10^{-8}$.

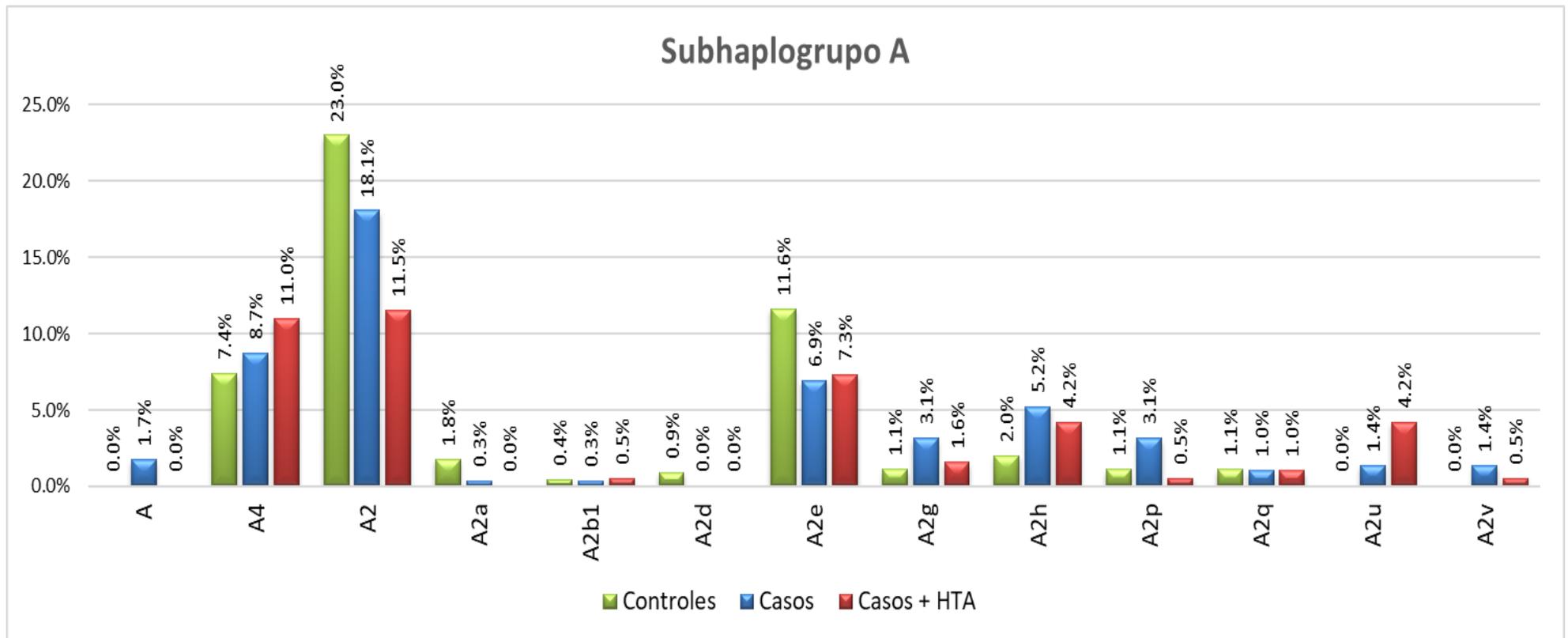


Figura 7. Distribución de frecuencias por subhaplogrupos del haplogrupo A en grafica de barras. La diferente coloración representa el grupo de estudio al que pertenece ya sea control (verde), casos con DMT2 (azul) o casos DMT2+HTA (rojo). Valores estadísticamente significativos ($P < 0.05$).

Del haplogrupo B, que se muestra en la figura 8, destaca el subhaplogrupo B2, donde como se observa en la figura 8 el grupo control presenta una mayor frecuencia (23.9%) que el grupo con diabetes (22.2%) y el grupo con diabetes e hipertensión (20.4%), tendiendo a ser descendiente la frecuencia que presentan, aunque la frecuencia entre uno y otro grupo no es elevada se puede observar esa tendencia.

En el caso del subhaplogrupo B, las frecuencias no son elevadas, con porcentajes menores al 5%, sin embargo, el grupo que presenta diabetes e hipertensión tiene una frecuencia mayor (4.7%) a los otros dos grupos (grupo control 1.6%, grupo con diabetes 1.4%), los cuales presentan frecuencias muy bajas y similares.

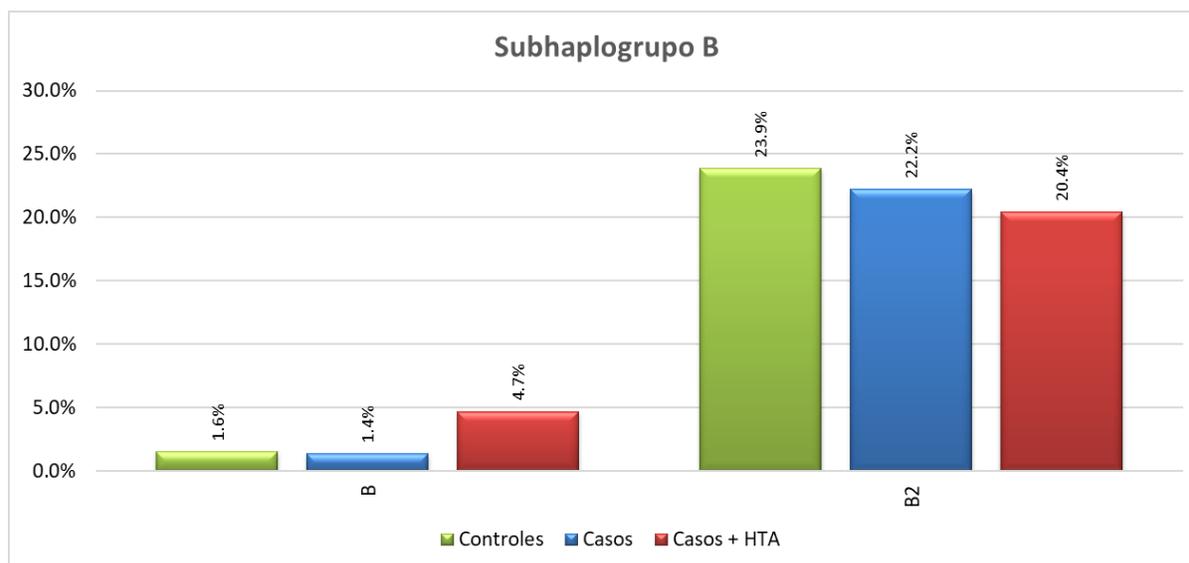


Figura 8. Distribución de frecuencias por subhaplogrupos del haplogrupo B en grafica de barra. La diferente coloración representa el grupo de estudio al que pertenece ya sea control (verde), casos con DMT2 (azul) o casos con DMT2+HTA (rojo). Valores estadísticamente significativos ($P < 0.05$).

En la figura 9, el haplogrupo C destacan los subhaplogrupos C1, C1b, C1c y C1d. El subhaplogrupo C1 presenta las frecuencias más elevadas, viendo una ascendencia en comparación con el grupo control (8%) que el grupo con diabetes (8.7%) y el grupo con diabetes e hipertensión (9.4%). En el subhaplogrupo C1b se puede ver una gran diferencia de frecuencia entre el grupo control (1.8%) y los otros

dos grupos, presentando una mayor frecuencia aquel grupo que solo presenta diabetes (5.2%), el grupo que presenta tanto diabetes como hipertensión no se observa gran diferencia (4.7%), es algo menor al que presenta solo diabetes. En el subhaplogrupo C1c, el grupo control (3.6%) es el que presenta una frecuencia mayor en comparación a los otros dos grupos, pero el grupo que presenta solo diabetes (0.7%) disminuye considerablemente esa frecuencia, volviendo a ver un incremento cuando el grupo tiene tanto diabetes como hipertensión (1.6%), pero no mayor al grupo control. En el subhaplogrupo C1d se ve una frecuencia descendiente en comparación al grupo control (2.5%) que el grupo con diabetes (1.4%) y el grupo con diabetes e hipertensión (0.5%), aunque todos presentan frecuencias bajas, menores al 10% pero con resultados estadísticamente significativos ($p = 3.5 \times 10^{-8}$).

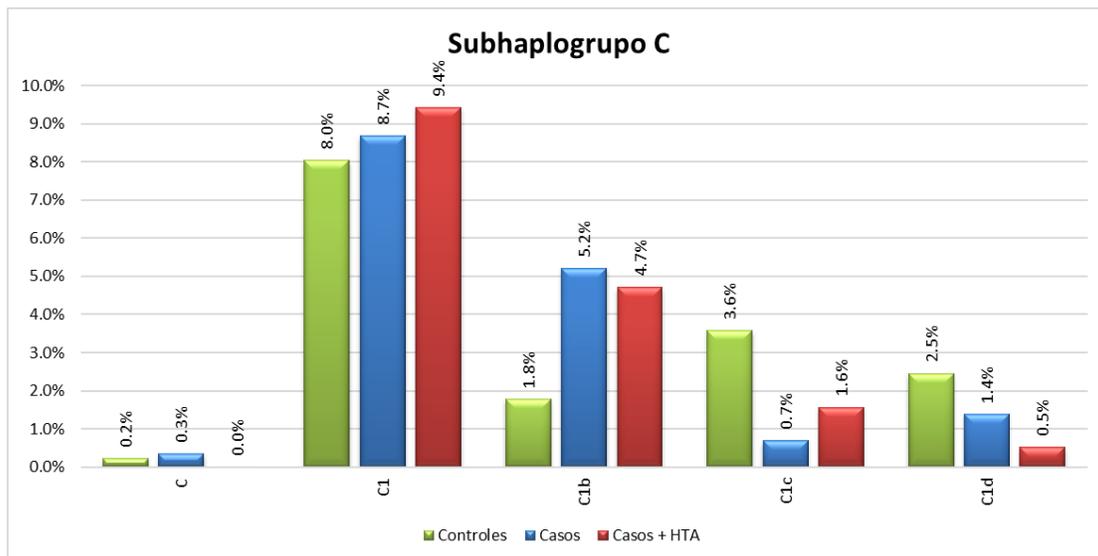


Figura 9. Distribución de frecuencias por subhaplogrupos del haplogrupo C en grafica de barras. La diferente coloración representa el grupo de estudio al que pertenece ya sea control (verde), casos con DMT2 (azul) o casos con DMT2+HTA (rojo). Valores estadísticamente significativos ($P < 0.05$).

La figura 10 se observa la distribución del haplogrupo D donde destaca el subhaplogrupo D1, en el cual tanto el grupo control (6.3%) como el grupo que padece diabetes (6.6%), presentan frecuencias similares, sin embargo, el grupo que padece tanto, diabetes como hipertensión (13.6%) presenta una frecuencia casi del doble en comparación con los grupos anteriormente mencionados.

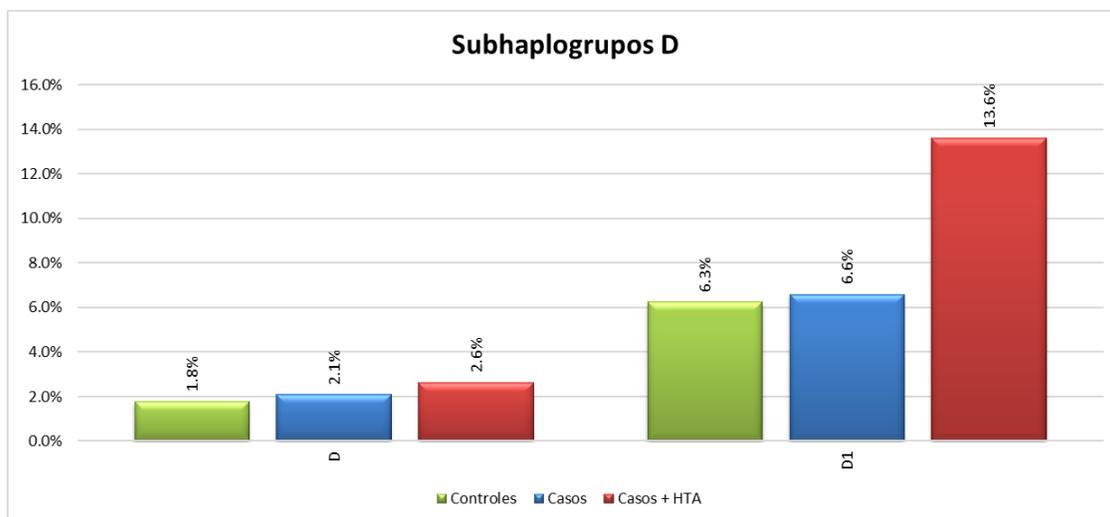


Figura 10. Distribución de frecuencias por subhaplogrupos del haplogrupo D en grafica de barras. La diferente coloración representa el grupo de estudio al que pertenece ya sea control (verde), casos con DMT2 (azul) o casos con DMT2+HTA (rojo). Valores estadísticamente significativos ($P < 0.05$).

En la figura 11 A y B se observa una comparativa dividida entre los haplogrupos A, B, C y D, por grupos de estudio como son controles, pacientes con diabetes (casos) y pacientes con diabetes e hipertensión (casos+HTA), donde podemos observar del haplogrupo A que resaltan por su mayor frecuencia en relación a la población total por cada grupo de estudio, los subhaplogrupos A2, A4 y A2e, siendo el subhaplogrupo A2 el que se ve con una mayor presencia en los gráficos de pastel, notando una similitud en proporciones en cada grupo de estudio, con una frecuencia en el grupo de controles de 21.2%, en pacientes con diabetes de 17.4% y en pacientes con diabetes e hipertensión 11.5%.

En el haplogrupo B se puede ver que el subhaplogrupo B2 tiene una prevalencia mayor en los gráficos de pastel, presentándose con un 16.5% de frecuencia el grupo de controles, en pacientes con diabetes de 19.8% y en pacientes con diabetes e hipertensión un 19.4%.

En el caso del haplogrupo C resaltan los subhaplogrupos C1 y C1b, quienes en los gráficos de pastel de los grupos de pacientes con diabetes y el grupo de pacientes con diabetes e hipertensión son los que se observan en mayor proporción; C1 se

ve aun con mayor proporción en estos grupos, teniendo una frecuencia en pacientes con diabetes de 6.9% y en pacientes con diabetes e hipertensión 8.4%. Cabe destacar que, en el grupo de controles, en el gráfico de pastel, los subhaplogrupos C, C1, C1b, C1b7 y C1d se observan con una distribución más uniforme.

El haplogrupo D resalta por los subhaplogrupos D, D1 y D1h, los cuales presentan una relación similar en los 3 grupos de estudio según el grafico de pastel, donde D1 es el que se encuentra con mayor proporción, presentando una frecuencia de 3.6% en el grupo de controles, en pacientes con diabetes un 4.2% y en pacientes con diabetes e hipertensión 8.9%.

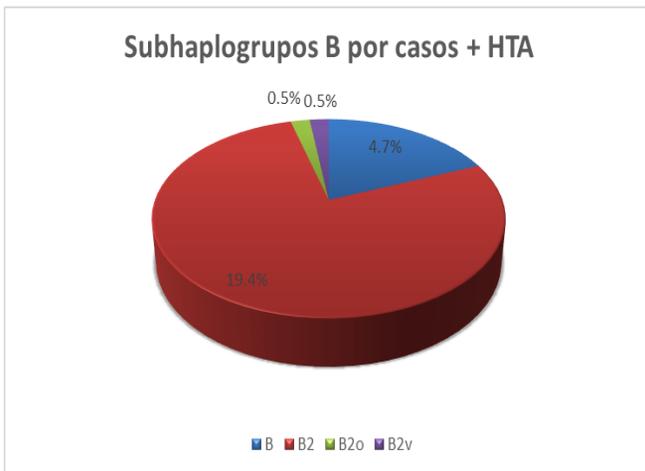
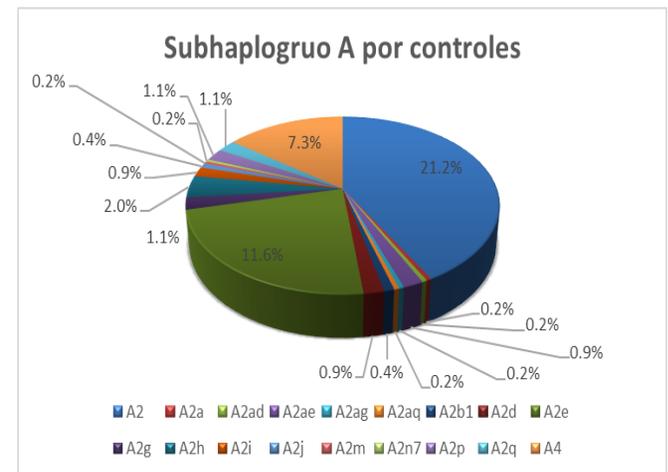
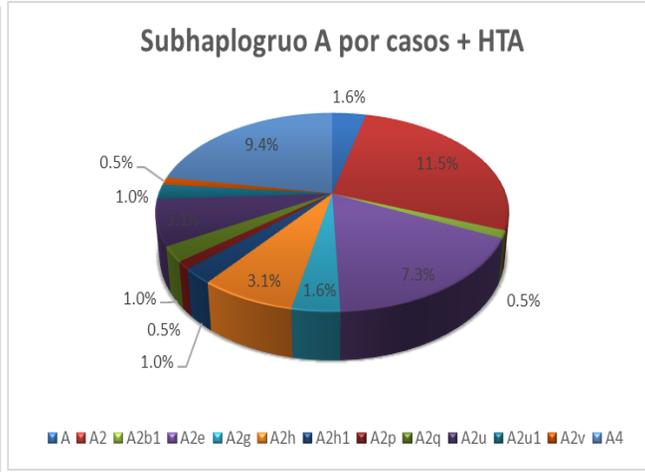
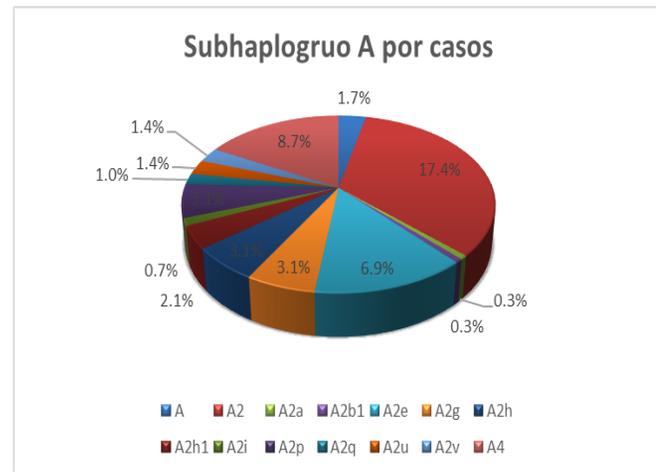


Figura 11 A. Comparación de frecuencias de subhaplogrupos A y B por grupos de controles, casos con diabetes (casos) y caso con diabetes e hipertensión (casos+HTA) en graficas de pastel. Valores estadísticamente significativos ($P < 0.05$).

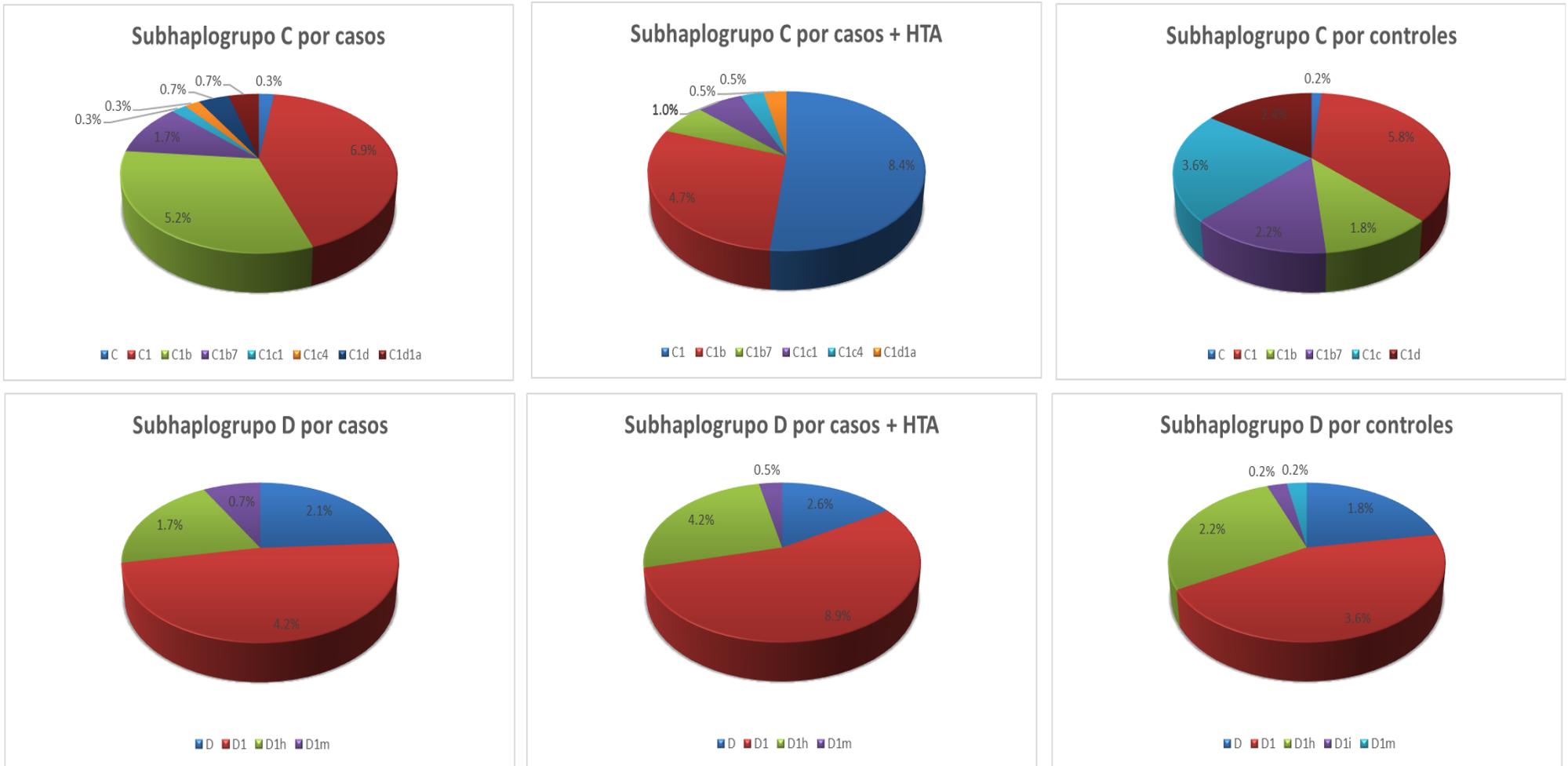


Figura 1 1 B. Comparación de frecuencias de subgrupos C y D por grupos de controles, casos con diabetes (casos) y caso con diabetes e hipertensión (casos+HTA) en graficas de pastel. Valores estadísticamente significativos ($P < 0.05$).

Posterior a el análisis de haplogrupos se buscaron aquellas variantes de riesgo en los grupos de controles y casos generales (Figura 12), tomándose en cuenta aquellas posiciones que tuvieran una frecuencia del 15% o superior en cualquiera de los dos grupos de estudio, como un valor acordado, encontrándose un total de 14 variantes de importancia, teniendo diferencias mayores al 2% entre casos y controles las variantes de la posición 73, 263, 663, 16111, 16189, 16223, 16362 y 16519, mientras que las posiciones 64, 146, 153, 235, 16290 y 16319 no tiene una diferencia mayor al 2% en ambos grupos, aunque cabe resaltar que todas estas posiciones de variantes de riesgo son importantes, en el simple hecho de pertenecer a variantes con un porcentaje mayor al valor acordado en la variante de riesgo en grupos de casos o controles.

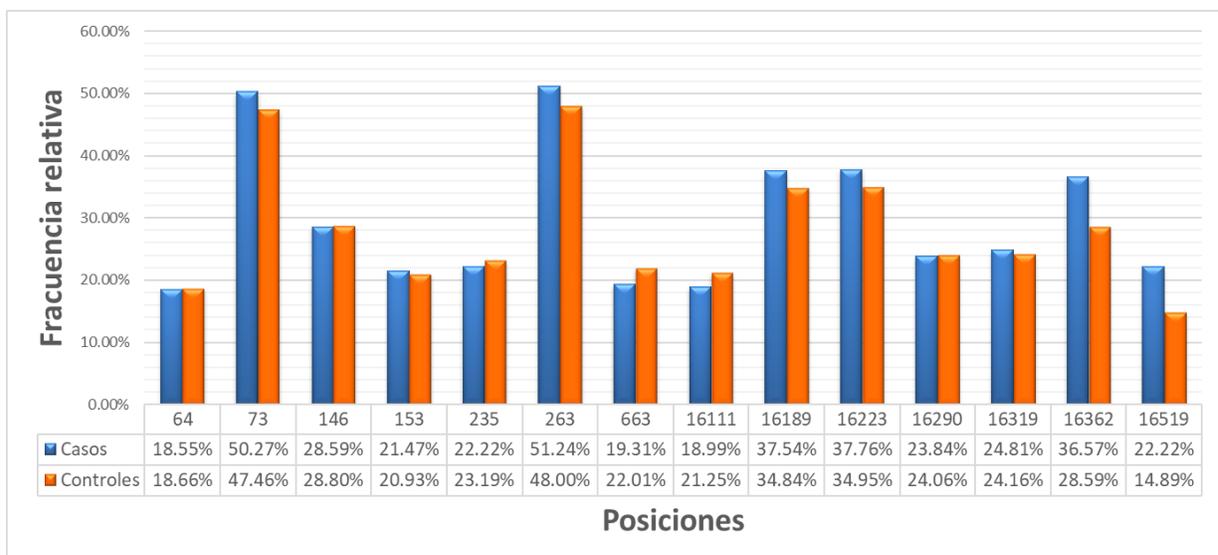


Figura 12. Frecuencias relativas de variantes de riesgo, con un porcentaje arriba del 15%, en la región D-loop del DNA mitocondrial en grupo de controles (naranja) y pacientes generales que padecen diabetes (azules).

Discusión

En el presente trabajo de investigación se realizó la identificación de las variantes y haplogrupos en la región D-Loop del mtDNA asociados a la hipertensión en pacientes de una población mestizo-mexicana con DMT2 a partir de la estimación de sus frecuencias en pacientes del hospital No.1 “Dr. Calos MacGregor Sánchez Navarro”.

Se observó que las frecuencias del haplogrupo A son estadísticamente significativas ($p= 3.5 \times 10^{-8}$), específicamente de los subhaplogrupos A4, A2 y A2e fueron diferentes de sus grupos controles. El haplogrupo A4 presentó en el grupo control una frecuencia de 7.4%, mientras que cuando en el grupo de pacientes con diabetes esta frecuencia fue de 8.7% y cuando los pacientes presentaban diabetes e hipertensión la frecuencia se incrementó hasta 11%. Caso contrario sucedió en el subhaplogrupo A2 donde el grupo control presentó una frecuencia del 23% pero en cuanto los pacientes con diabetes esta frecuencia disminuyó hasta el 18.1% y se redujo aún más cuando se mostró en el grupo tanto diabetes e hipertensión, con una frecuencia del 11.5%. Mientras que en el subhaplogrupo A2e el grupo control presentó una frecuencia del 11.6%, tanto el grupo de diabetes como el de diabetes e hipertensión presentaron frecuencias muy similares, de 6.9% y 7.3% respectivamente. Estos datos encontrados son importantes ya que en otras poblaciones como la japonesa, donde se ha encontrado que aquellas mujeres con el haplogrupo A confieren 2.09% mayor riesgo de padecer DMT2 (Nishigaki *et al.*, 2010). A la actualidad de tiene poca información sobre este haplogrupo en diferentes poblaciones por lo que es necesario aumentar el número de muestras de nuestra población para aumentar el poder estadístico.

Las frecuencias presentadas por el haplogrupo B, presentan significancia igual al haplogrupo A con una p de 3.5×10^{-8} , específicamente el subhaplogrupo B2, en grupo de caso es de 23.9%, mientras que esta frecuencia disminuye progresivamente cuando se presenta la diabetes o el grupo de diabetes e hipertensión, siendo de 22.2% y 20.4% respectivamente. Esto es un tanto diferente

de lo reportado ya que en población Taiwanesa se ha observado que el haplogrupo B está asociado con 1.52 veces mayor riesgo de sufrir diabetes. Esta tendencia se veía en los subhaplogrupos como B4 y B5 de esta población (Liou *et al.*, 2012), sin embargo, no se ha reportado algo en relación con el subhaplogrupo B2 en población mexicana o alguna otra, por lo que podría ser que este subhaplogrupo confiere una protección a estas dos enfermedades, sugiriendo un estudio más amplio.

La presencia del haplogrupo C ($p= 3.5 \times 10^{-8}$) y sus subhaplogrupos C1, C1b, C1c y C1d son las frecuencias con una mayor diferencia entre unos y otros, el subhaplogrupo C1 presenta el grupo control una frecuencia de 8% que a diferencia del grupo con diabetes su frecuencia es de 8.7% y el grupo con diabetes e hipertensión presenta un 9.4%. En el subhaplogrupo C1b, el grupo control muestra una frecuencia de 1.8% mientras que en el grupo que solo presenta un 5.2% y en el grupo que presenta tanto diabetes como hipertensión presenta un 4.7%, siendo algo menor al que presenta solo diabetes. En el subhaplogrupo C1c, en el grupo control se observa una frecuencia de 3.6%, mientras que el grupo que presenta solo diabetes observamos un 0.7%, disminuye considerablemente esa frecuencia y viéndose un incremento cuando el grupo tiene tanto diabetes como hipertensión a 1.6%. En el subhaplogrupo C1d el grupo control presenta una frecuencia de 2.5%, el grupo con diabetes el 1.4% y el grupo con diabetes e hipertensión 0.5%, presentando todas frecuencias bajas. Actualmente no se han encontrado reportes de la relación del haplogrupo C, ni sus subhaplogrupos, con diabetes e hipertensión, sin embargo, una de sus variantes con el cual se identifica este haplogrupo como es la variante en la posición 3552A (Tamm *et al.*, 2007), se ha correlacionado con susceptibilidad a edema pulmonar, diabetes e hipertensión, esto debido a múltiples factores que incluyen razones ambientales y genéticas, como respuesta ventilatoria hipóxica, ascenso rápido, gran altitud, cansancio, falta de sueño, tabaquismo, bebida, herencia, etc. Resaltando que las diferentes muestras clínicas podrían dar lugar a resultados diferentes (Wang *et al.*, 2022).

El haplogrupo D ($p= 3.5 \times 10^{-8}$), del cual el subhaplogrupo más representativo es el haplogrupo D1, que presenta frecuencias interesantes ya que el grupo control

presenta una frecuencia de 6.3% muy similar al grupo con diabetes, con una frecuencia del 6.6%, sin embargo, cuando el grupo presenta pacientes con diabetes e hipertensión, esta frecuencia se dispara a casi el doble con un 13.6%, siendo un referente a una posible relación entre el haplogrupo y la hipertensión. Esto concuerda con un estudio en población de Han, China, donde pacientes portadores del haplogrupo D presentaban un mayor porcentaje de hipertensión arterial, con un 76.7% de pacientes que no tenían la enfermedad frente a 86.5% de los que la presentaba; este estudio igual presentó otros factores importantes como un menor nivel de colesterol total con un 4.17 ± 0.72 mmol/L frente a 3.98 ± 0.49 mmol/L en comparación con los no portadores del haplogrupo. Los pacientes jóvenes del haplogrupo D también exhibieron un nivel reducido de colesterol total, 3.78 ± 0.51 mmol/L, en comparación con los participantes que no eran del haplogrupo D con 4.36 ± 0.44 mmol/L (Zhang *et al.*, 2017).

De las variantes de riesgo que presentan una diferencia mayor a 2% entre grupos de estudio son A73G (Controles:47.46%, Casos:50.27%), A263G (Controles: 48.00%, Casos:51.24%), A663G (Controles: 22.01%, Casos:19.31%), C16111T (Controles: 21.25%, Casos:18.99), T16189C (Controles:34.84%, Casos:37.54%), C16223T (Controles:34.95%, Casos:37.76%), T16362C (Controles: 28.59%, Casos:36.57%) y T16519C (Controles:14.89%, Casos: 22.22%), la importancia de estas variantes radica en los efectos en la salud que se han visto en otros estudios, donde la variante A73G, T16189C y T16519C se ha visto con frecuencia en cáncer de páncreas, el caso del alelo T de la posición 16519 se correlacionó con DM al igual que con una esperanza de vida más corta, de igual manera la supervivencia de los pacientes con cáncer de páncreas se ha correlacionado con el estadio y grado del tumor y con la DM al momento del diagnóstico, pareciendo ser un factor genético que predisponente para la DM (Navaglia *et al.*, 2006). En el caso de la variante T16189C es un factor de riesgo para síndrome metabólico en la población mexicana, se ha informado que esta variante provoca una unión proteica alterada a la región de DNA afectada, lo que posteriormente conduce a una alteración de la replicación del mtDNA, probablemente implica la defensa antioxidante, debido al aumento del estrés oxidativo en pacientes diabéticos. Además, se ha demostrado

que sujetos que albergan esta variante, han alterado el número de copias de mtDNA en las células sanguíneas (Saldaña-Rivera *et al.*, 2018). Las variantes A263G, A73G y T16519C se han encontrado con frecuencias altas de 98.54%, 75.15% y 57,31% respectivamente en pacientes árabes con obesidad o sobrepeso a diferencia de personas delgadas (Eaaswarkhanth *et al.*, 2019). La variante A663G se ha visto relacionada con la una enfermedad denominada como aterosclerosis coronaria la cual hace que se estrechen las arterias cercanas al corazón, lo cual puede producir dolor de pecho, ataque o insuficiencia cardíacas, relacionándose la enfermedad así con DM (M. Li *et al.*, 2022).

Conclusión

Se encontraron a los subhaplogrupos A4, A2e, C1, y C1c como posible factor de riesgo en pacientes con diabetes e hipertensión y como subhaplogrupos de protección A2, B2, C1b y C1d. Mientras que se encontraron 14 posibles variantes de riesgo con frecuencias igual o superiores al 15% en los grupos de controles y casos con diabetes e hipertensión. Este análisis es preliminar ya que se requiere incrementar la “n” para tener un mayor poder estadístico que confirmen cuales de los haplogrupos/variables están asociados con el riesgo o protección a los casos de pacientes con diabetes e hipertensión.

Perspectiva

Incrementar la n para obtener un mayor poder estadístico y un mejor análisis de los subhaplogrupos y las variantes reportados en el presente trabajo.

Referencias

- Abellán Alemán, J., Díaz, M. Á. P., Hernández, M. L., Galindo, S. B., Iserte, A. D. L. S., Claros, N. M., & Romanos, F. G. (2011). Evaluación y control de los hipertensos diabéticos atendidos en centros de Atención Primaria de España. Estudio BRAND II. *Atención Primaria*, 43(6), 297–304. <https://doi.org/10.1016/j.aprim.2010.05.016>
- Aka, T. das, Saha, U., Shati, S. A., Aziz, Md. A., Begum, M., Hussain, Md. S., Millat, Md. S., Uddin, M. S., & Islam, M. S. (2021). Risk of type 2 diabetes mellitus and cardiovascular complications in KCNJ11, HHEX and SLC30A8 genetic polymorphisms carriers: A case-control study. *Heliyon*, 7(11), e08376. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08376>
- American Diabetes Association. (2020). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2020. *Diabetes Care*, 43(Supplement 1), S14–S31. <https://doi.org/10.2337/dc20-S002>
- Bao, A., Nashine, S., Atilano, S., Chwa, M., Federoff, H., & Kenney, M. C. (2021). Differential responses of AMD mitochondrial DNA haplogroups to PU-91, a mitochondria-targeting drug. *Mitochondrion*, 60, 189–200. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2021.08.010>
- Barakat, B., & Almeida, M. E. F. (2021). Biochemical and immunological changes in obesity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 108951. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108951>
- Beevers, G. (2001). ABC of hypertension: The pathophysiology of hypertension. *BMJ*, 322(7291), 912–916. <https://doi.org/10.1136/bmj.322.7291.912>
- Bodner, M., Perego, U. A., Gomez, J. E., Cerda-Flores, R. M., Rambaldi Migliore, N., Woodward, S. R., Parson, W., & Achilli, A. (2021a). The Mitochondrial DNA Landscape of Modern Mexico. *Genes*, 12(9), 1453. <https://doi.org/10.3390/genes12091453>
- Bodner, M., Perego, U. A., Gomez, J. E., Cerda-Flores, R. M., Rambaldi Migliore, N., Woodward, S. R., Parson, W., & Achilli, A. (2021b). The Mitochondrial DNA Landscape of Modern Mexico. *Genes*, 12(9), 1453. <https://doi.org/10.3390/genes12091453>
- Chande, A. T., Rishishwar, L., Conley, A. B., Valderrama-Aguirre, A., Medina-Rivas, M. A., & Jordan, I. K. (2020). Ancestry effects on type 2 diabetes genetic risk inference in Hispanic/Latino populations. *BMC Medical Genetics*, 21(S2), 132. <https://doi.org/10.1186/s12881-020-01068-0>
- Çubuk, H., & Yalçın Çapan, Ö. (2021). A Review of Functional Characterization of Single Amino Acid Change Mutations in HNF Transcription Factors in MODY

Pathogenesis. *The Protein Journal*. <https://doi.org/10.1007/s10930-021-09991-8>

Dirección General de Epidemiología, S. de S. (2020). *Diabetes Mellitus Tipo 2 Hospitalaria Informe Trimestral de Vigilancia Epidemiológica Sistema de Vigilancia Epidemiológica Hospitalaria de Diabetes Mellitus Tipo 2*. 1–22.

Dixon, E. D., Nardo, A. D., Claudel, T., & Trauner, M. (2021). The Role of Lipid Sensing Nuclear Receptors (PPARs and LXR) and Metabolic Lipases in Obesity, Diabetes and NAFLD. *Genes*, *12*(5), 645. <https://doi.org/10.3390/genes12050645>

Domínguez-Cruz, M. G., Muñoz, M. de L., Totomoch-Serra, A., García-Escalante, M. G., Burgueño, J., Valadez-González, N., Pinto-Escalante, D., & Díaz-Badillo, A. (2020). Maya gene variants related to the risk of type 2 diabetes in a family-based association study. *Gene*, *730*, 144259. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.144259>

Donlon, T. A., Chen, R., Masaki, K. H., Willcox, D. C., Allsopp, R. C., Willcox, B. J., & Morris, B. J. (2021). Association of growth hormone receptor gene variant with longevity in men is due to amelioration of increased mortality risk from hypertension. *Aging*. <https://doi.org/10.18632/aging.203133>

Eaaswarkhanth, M., Melhem, M., Sharma, P., Nizam, R., al Madhoun, A., Chaubey, G., Alsmadi, O., Al-Ozairi, E., & Al-Mulla, F. (2019). Mitochondrial DNA D-loop sequencing reveals obesity variants in an Arab population. *The Application of Clinical Genetics, Volume 12*, 63–70. <https://doi.org/10.2147/TACG.S198593>

Fazzini, F., Lamina, C., Raftopoulou, A., Koller, A., Fuchsberger, C., Pattaro, C., Del Greco, F. M., Döttelmayer, P., Fendt, L., Fritz, J., Meiselbach, H., Schönherr, S., Forer, L., Weissensteiner, H., Pramstaller, P. P., Eckardt, K. - U., Hicks, A. A., & Kronenberg, F. (2021). Association of mitochondrial DNA copy number with metabolic syndrome and type 2 diabetes in 14 176 individuals. *Journal of Internal Medicine*, *jaim.13242*. <https://doi.org/10.1111/jaim.13242>

Flack, J. M., & Adekola, B. (2020). Blood pressure and the new ACC/AHA hypertension guidelines. *Trends in Cardiovascular Medicine*, *30*(3), 160–164. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2019.05.003>

Foëx, P., & Sear, J. W. (2004). Hypertension: Pathophysiology and treatment. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care and Pain*, *4*(3), 71–75. <https://doi.org/10.1093/bjaceaccp/mkh020>

- Friedrich, V. K., Rubel, M. A., & Schurr, T. G. (2021). Mitochondrial genetic variation in human bioenergetics, adaptation, and adult disease. *American Journal of Human Biology*. <https://doi.org/10.1002/ajhb.23629>
- Galicia-García, U., Benito-Vicente, A., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Siddiqi, H., Uribe, K. B., Ostolaza, H., & Martín, C. (2020). Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(17), 1–34. <https://doi.org/10.3390/ijms21176275>
- Guthrie, R. A., & Guthrie, D. W. (2004). Pathophysiology of Diabetes Mellitus. *Critical Care Nursing Quarterly*, *27*(2), 113–125. <https://doi.org/10.1097/00002727-200404000-00003>
- Harrison, D. G., Coffman, T. M., & Wilcox, C. S. (2021). Pathophysiology of Hypertension: The Mosaic Theory and beyond. *Circulation Research*, 847–863. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.318082>
- Hernández, C. E., & Carpio, N. (2019). Introducción a los tipos de muestreo. *ALERTA Revista Científica Del Instituto Nacional de Salud*, *2*(1), 75–79. <https://doi.org/10.5377/alerta.v2i1.7535>
- Himanshu, D., Ali, W., & Wamique, M. (2020). Type 2 diabetes mellitus: pathogenesis and genetic diagnosis. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, *19*(2), 1959–1966. <https://doi.org/10.1007/s40200-020-00641-x>
- Huerta-Chagoya, A., Moreno-Macías, H., Sevilla-González, M., Rodríguez-Guillén, R., Ordóñez-Sánchez, M. L., Gómez-Velasco, D., Muñoz-Hernández, L., Segura-Kato, Y., Arellano-Campos, O., Cruz-Bautista, I., Aguilar-Salinas, C. A., & Tusié-Luna, T. (2020). Contribution of Known Genetic Risk Variants to Dyslipidemias and Type 2 Diabetes in Mexico: A Population-Based Nationwide Study. *Genes*, *11*(1), 114. <https://doi.org/10.3390/genes11010114>
- Instituto Nacional de Salud Publica. (2021a). *Diabetes en México*. <https://www.insp.mx/avisos/3652-diabetes-en-mexico.html>
- Instituto Nacional de Salud Publica. (2021b). *Hipertensión arterial un problema de salud pública en México*. Gobierno de México. <https://www.insp.mx/avisos/5398-hipertension-arterial-problema-salud-publica.html>
- International Diabetes Federation. (2019). IDF Diabetes Atlas, 9th edn. Brussels, Belgium. En *Atlas de la Diabetes de la FID*.
- Jankovic, M., Novakovic, I., Nikolic, D., Maksic, J. M., Brankovic, S., Petronic, I., Cirovic, D., Ducic, S., Grajic, M., & Bogicevic, D. (2021). Genetic and epigenomic modifiers of diabetic neuropathy. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(9), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms22094887>

- Kerner, W., & Brückel, J. (2014). *Definition , Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus*. 384–386.
- Kumar, S., Bellis, C., Zlojutro, M., Melton, P. E., Blangero, J., & Curran, J. E. (2011). Large scale mitochondrial sequencing in Mexican Americans suggests a reappraisal of Native American origins. *BMC Evolutionary Biology*, *11*(1), 293. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-293>
- Li, H., Slone, J., Fei, L., & Huang, T. (2019). Mitochondrial DNA Variants and Common Diseases: A Mathematical Model for the Diversity of Age-Related mtDNA Mutations. *Cells*, *8*(6), 608. <https://doi.org/10.3390/cells8060608>
- Li, M., Gong, S., Han, X., Zhou, L., Zhang, S., Ren, Q., Cai, X., Luo, Y., Liu, W., Zhu, Y., Zhou, X., Li, Y., & Ji, L. (2022). Contribution of mitochondrial gene variants in diabetes and diabetic kidney disease. *Frontiers in Endocrinology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.953631>
- Liou, C.-W., Chen, J.-B., Tiao, M.-M., Weng, S.-W., Huang, T.-L., Chuang, J.-H., Chen, S.-D., Chuang, Y.-C., Lee, W.-C., Lin, T.-K., & Wang, P.-W. (2012). Mitochondrial DNA Coding and Control Region Variants as Genetic Risk Factors for Type 2 Diabetes. *Diabetes*, *61*(10), 2642–2651. <https://doi.org/10.2337/db11-1369>
- Lip, S., & Padmanabhan, S. (2020). Genomics of Blood Pressure and Hypertension : Extending the Mosaic Theory Toward Stratification. *Canadian Journal of Cardiology*, *36*(5), 694–705. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cjca.2020.03.001>
- Manolis, A. S., Manolis, A. A., Manolis, T. A., Apostolaki, N. E., Apostolopoulos, E. J., Melita, H., & Katsiki, N. (2021). Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease: Current status of translational research/clinical and therapeutic implications. *Medicinal Research Reviews*, *41*(1), 275–313. <https://doi.org/10.1002/med.21732>
- Navaglia, F., Basso, D., Fogar, P., Sperti, C., Greco, E., Zambon, C.-F., Stranges, A., Falda, A., Pizzi, S., Parenti, A., Pedrazzoli, S., & Plebani, M. (2006). Mitochondrial DNA D-Loop in Pancreatic Cancer. *American Journal of Clinical Pathology*, *126*(4), 593–601. <https://doi.org/10.1309/GQFCCJMH5KHNvX73>
- Nishigaki, Y., Fuku, N., & Tanaka, M. (2010). Mitochondrial haplogroups associated with lifestyle-related diseases and longevity in the Japanese population. *Geriatrics & Gerontology International*, *10*, S221–S235. <https://doi.org/10.1111/j.1447-0594.2010.00599.x>
- Organización Mundial de la Salud. (2013). Información general sobre la hipertension en el mundo. *Oms*. <https://doi.org/WHO/DCO/WHD/2013.2>

- Organización Panamericana de la Salud. (2021). *Diabetes*.
<https://www.paho.org/es/temas/diabetes>
- Redondo, M. J., Hagopian, W. A., Oram, R., Steck, A. K., Vehik, K., Weedon, M., Balasubramanyam, A., & Dabelea, D. (2020). The clinical consequences of heterogeneity within and between different diabetes types. *Diabetologia*, 63(10), 2040–2048. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05211-7>
- Rozzo, N. (2020). An Effective Model of Diabetes Care and Education: Revising the AADE7 Self-Care Behaviors ®. *The Diabetes Educator*, 46(2), 139–160. <https://doi.org/10.1177/0145721719894903>
- Saldaña-Rivera, E., Careaga-Castilla, M. J., Olvera-Cárdenas, G. D., Pérez-Soto, E., & Sánchez-Monroy, V. (2018). Mitochondrial T16189C Polymorphism Is Associated with Metabolic Syndrome in the Mexican Population. *Disease Markers*, 2018, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2018/3981315>
- Shoily, S. S., Ahsan, T., Fatema, K., & Sajib, A. A. (2021). Common genetic variants and pathways in diabetes and associated complications and vulnerability of populations with different ethnic origins. *Scientific Reports*, 11(1), 7504. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86801-2>
- Stoccoro, A., & Coppedè, F. (2021). Mitochondrial DNA methylation and human diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 1–27. <https://doi.org/10.3390/ijms22094594>
- Tamm, E., Kivisild, T., Reidla, M., Metspalu, M., Smith, D. G., Mulligan, C. J., Bravi, C. M., Rickards, O., Martinez-Labarga, C., Khusnutdinova, E. K., Fedorova, S. A., Golubenko, M. v., Stepanov, V. A., Gubina, M. A., Zhadanov, S. I., Ossipova, L. P., Damba, L., Voevoda, M. I., Dipierri, J. E., ... Malhi, R. S. (2007). Beringian Standstill and Spread of Native American Founders. *PLoS ONE*, 2(9), e829. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000829>
- Totomoch-Serra, A., Muñoz, M. de L., Burgueño, J., Revilla-Monsalve, M. C., & Diaz-Badillo, A. (2018). Association of common polymorphisms in the VEGFA and SIRT1 genes with type 2 diabetes-related traits in Mexicans. *Archives of Medical Science*, 14(6), 1361–1373. <https://doi.org/10.5114/aoms.2018.74757>
- Wang, P.-W., Lin, T.-K., Weng, S.-W., & Liou, C.-W. (2009). Mitochondrial DNA Variants in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes - Relevance of Asian Population Studies. *The Review of Diabetic Studies*, 6(4), 237–246. <https://doi.org/10.1900/RDS.2009.6.237>
- Wang, Y., Huang, X., Peng, F., Han, H., Gu, Y., Liu, X., & Feng, Z. (2022). Association of variants m.T16172C and m.T16519C in whole mtDNA sequences with high altitude pulmonary edema in Han Chinese lowlanders.

BMC Pulmonary Medicine, 22(1), 72. <https://doi.org/10.1186/s12890-021-01791-1>

Wang, Z., Chen, H., Qin, M., Liu, C., Ma, Q., Chen, X., Zhang, Y., Lai, W., Zhang, X., & Zhong, S. (2021). Associations of Mitochondrial Variants With Lipidomic Traits in a Chinese Cohort With Coronary Artery Disease. *Frontiers in Genetics*, 12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.630359>

World Health Organization. (2021). *Hypertension*. https://www.who.int/health-topics/hypertension/#tab=tab_1

Yaghootkar, H., Witcher, B., Bell, J. D., & Thomas, E. L. (2020). Ethnic differences in adiposity and diabetes risk – insights from genetic studies. *Journal of Internal Medicine*, 288(3), 271–283. <https://doi.org/10.1111/joim.13082>

Yermolenko, S., Chumachenko, Y., Orlovskiy, V., Moiseyenko, I., & Orlovskiy, O. (2021). The Association between Gly460Trp-Polymorphism of Alpha-Adducin 1 Gene (ADD1) and Arterial Hypertension Development in Ukrainian Population. *International Journal of Hypertension*, 2021, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2021/5596974>

Yue, W., Tran, H. T., Wang, J., Schiermeyer, K., Gildea, J. J., Xu, P., & Felder, R. A. (2021). The Hypertension Related Gene G-Protein Coupled Receptor Kinase 4 Contributes to Breast Cancer Proliferation. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 15, 117822342110157. <https://doi.org/10.1177/11782234211015753>

Zempo, H., Kim, S. J., Fuku, N., Nishida, Y., Higaki, Y., Wan, J., Yen, K., Miller, B., Vicinanza, R., Miyamoto-Mikami, E., Kumagai, H., Naito, H., Xiao, J., Mehta, H. H., Lee, C., Hara, M., Pate, Y. M., Setiawan, V. W., Moore, T. M., ... Cohen, P. (2021). A pro-diabetogenic mtDNA polymorphism in the mitochondrial-derived peptide, MOTS-c. *Aging*, 13(2), 1692–1715. <https://doi.org/10.18632/aging.202529>

Zhang, Y., Zhao, Y., Wen, S., Yan, R., Yang, Q., & Chen, H. (2017). Associations of mitochondrial haplogroups and mitochondrial DNA copy numbers with end-stage renal disease in a Han population. *Mitochondrial DNA Part A*, 28(5), 725–731. <https://doi.org/10.1080/24701394.2016.1177038>

Zhou, B., Perel, P., Mensah, G. A., & Ezzati, M. (2021). Global epidemiology, health burden and effective interventions for elevated blood pressure and hypertension. *Nature Reviews Cardiology*, 0123456789. <https://doi.org/10.1038/s41569-021-00559-8>