



## **Determinación del polimorfismo *pro12ala* en el receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma-2 en pacientes que padecen diabetes mellitus tipo 2**

### **Determination of the *pro12ala* polymorphism in peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2 in patients with type 2 diabetes mellitus.**

#### **Evelyn Visuete**

Universidad de Panamá, Panamá.

[evelyn.visuete@up.ac.pa](mailto:evelyn.visuete@up.ac.pa)

<https://orcid.org/0009-0005-0388-9145>

#### **Tomás A. Díez**

Universidad de Panamá, Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica, Panamá.

[tomas.diez@up.ac.pa](mailto:tomas.diez@up.ac.pa)

<https://orcid.org/0009-0003-9846-0952>

#### **Edgardo Castro-Pérez**

Universidad de Panamá, Facultad de Ciencias Naturales Exactas y Tecnología, Panamá.

INDICASAT-AIP, Centro de Biología Celular y Molecular de las Enfermedades, Panamá.

[hdnacastro@gmail.com](mailto:hdnacastro@gmail.com)

<https://orcid.org/0000-0003-4884-9479>

#### **Magaly de Chial**

Universidad de Panamá, Facultad de Ciencias Naturales Exactas y Tecnología, Departamento de Genética y Biología Molecular, Panamá.

[magaly.dechial@up.ac.pa](mailto:magaly.dechial@up.ac.pa)

<https://orcid.org/0000-0002-6393-9299>

#### **Ana E. Tejada**

Universidad de Panamá, Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica, Panamá.

[anatejadapa19@gmail.com](mailto:anatejadapa19@gmail.com)

8378

<https://orcid.org/0009-0001-2599-8378>

#### **Carlos W. Ramos D.**

Universidad de Panamá, Facultad de Ciencias Naturales Exactas y Tecnología, Departamento de Genética y Biología Molecular, Panamá.

[laito52@yahoo.com](mailto:laito52@yahoo.com)

<https://orcid.org/0000-0003-2344-9241>

**Fecha de recepción:** 7 de octubre de 2024

**Fecha de aceptación:** 12 de noviembre de 2024

## RESUMEN

La diabetes mellitus es un grupo de trastornos metabólicos comunes que comparten el fenotipo de hiperglucemia. El polimorfismo Pro12Ala en el exón B del gen que codifica para PPAR $\gamma$ 2 ha sido asociado en algunas poblaciones con diabetes tipo 2. El objetivo de este estudio fue determinar si existe asociación del polimorfismo Pro12Ala de PPAR $\gamma$ 2 y la diabetes mellitus tipo 2 en una muestra de la población panameña. Se evaluó la posible asociación del polimorfismo Pro12Ala en una muestra de 195 individuos (99 controles y 96 experimentales) de la población panameña. El polimorfismo Pro12Ala se detectó mediante análisis de reacción en cadena de la polimerasa y polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP). Se observó una mayor frecuencia del genotipo Pro12Ala en el grupo experimental (DM2) con respecto al grupo control (0.114 vs 0.010). La frecuencia del alelo Ala12 (alelo de menor frecuencia) en nuestro estudio fue de 2.8%. Este trabajo representa el primer estudio sobre asociación entre diabetes mellitus tipo 2 y el polimorfismo Pro12Ala (rs18012829) en una muestra de casos y controles. La razón de momios (OR) evidenció asociación con un riesgo relativo de 1.9735 en aquellos con genotipo Pro12Ala. La frecuencia del genotipo Pro12Ala fue mayor en mujeres lo cual sugiere que éstas pueden estar más predisuestas a desarrollar esta condición.

## PALABRAS CLAVES

PPAR $\gamma$ 2, polimorfismo, diabetes mellitus, población panameña

## ABSTRACT

Diabetes mellitus is a group of common metabolic disorders that share the phenotype of hyperglycemia. The Pro12Ala polymorphism in exon B of the gene that codes for PPAR $\gamma$ 2 has been associated, in some populations, with type 2 diabetes. The objective of this study was to determine if there is an association between the Pro12Ala polymorphism of PPAR $\gamma$ 2 and type 2 diabetes mellitus in a sample of the Panamanian population. The possible association of the Pro12Ala polymorphism was evaluated in a sample of 195 individuals (99 controls and 96 experimental). The Pro12Ala polymorphism was detected by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis. A higher frequency of the Pro12Ala genotype was observed in the experimental group (DM2) compared to the control group (0.114 vs 0.010). The frequency of the Ala12 allele (lowest frequency allele) in our study was 2.8%. This work represents the first study on the association between type 2 diabetes mellitus and the Pro12Ala polymorphism (rs18012829) in a sample of cases and controls in Panama. The odds ratio (OR) showed an association with a relative risk of 1.9735 in those with the Pro12Ala genotype. The frequency of the Pro12Ala genotype was higher in women, suggesting that they may be more predisposed to developing this condition.

## KEYWORDS

PPAR $\gamma$ 2, polymorphism, diabetes mellitus, panamanian population

## INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus es un grupo de trastornos metabólicos comunes que comparten el fenotipo de hiperglucemia. Existen varios tipos de diabetes mellitus y son causados por una

interacción compleja de factores genéticos y ambientales. Los factores que contribuyen a la hiperglucemia incluyen la reducción de la secreción de insulina, la disminución de la utilización de glucosa y el aumento o la producción de glucosa (Janani & Ranjitha, 2014). La ausencia o poca producción de insulina se correlaciona con la presencia de pocos transportadores de glucosa (GLUTs) en la membrana y por ende una reducción en el transporte de glucosa hacia el interior de la célula (AsocMexDiabetes, 2021).

Los dos tipos principales de diabetes mellitus son el tipo 1 y el tipo 2. La diabetes mellitus tipo 1 se caracteriza principalmente por ser autoinmune, ya que el propio sistema inmunológico ataca y destruye las células beta que se encuentran en el páncreas, que son las encargadas de producir la insulina y, por lo tanto, se produce poca o ninguna insulina. Además, suele desarrollarse en la infancia o durante la adolescencia, pero puede presentarse a cualquier edad (Lucier & Weinstock, 2023).

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es la más común y representa la mayoría de los casos, generalmente, suele aparecer en personas mayores de 40 años, aunque podría presentarse en diferentes rangos de edades. Se caracteriza por niveles elevados de glucosa en sangre, provocado por la resistencia a la insulina. Las células no responden normalmente a la insulina y, por lo tanto, el cuerpo necesita cada vez más insulina para que la glucosa ingrese a las células y pueda ser utilizada como fuente de energía. Esto causa que la glucosa se acumule en la sangre, generando niveles de glucosa mayores de 125 mg/dl (Westman, 2021).

Los Receptores Activados por Proliferadores de Peroxisomas son factores de transcripción activados por ligandos. Existen tres isoformas en las que se incluye el Receptor Activado por Proliferadores de Peroxisomas Gamma-2 (PPAR $\gamma$ 2) (Zárate et al, 2006). Las variaciones o polimorfismos de un nucleótido (SNPs) son responsables de más del 80 por ciento de la variación entre individuos (Sarhangi et al. 2020). Estas variaciones en uno o más genes, conjuntamente con variaciones en el ambiente y el estilo de vida, han sido asociadas en diversas poblaciones a la susceptibilidad a ciertas enfermedades (Kirk et al. 2002).

Existen polimorfismos de un nucleótido (SNPs) en el gen que codifica para PPAR $\gamma$ 2 que han sido asociados con el riesgo de padecer de DM2 (Sarhangi et al. 2020) o con un efecto protector hacia el desarrollo de la enfermedad (Hara et al., 2000). El polimorfismo Pro12Ala en el exón B del gen que codifica para PPAR $\gamma$ 2 (rs1801282) ha sido asociado en algunas poblaciones con el riesgo o susceptibilidad de padecer de diabetes mellitus tipo 2, mientras que en otras ha sido asociado con un efecto protector o incluso no se ha evidenciado asociación con la enfermedad.

Según el Ministerio de Salud de Panamá, el 14% de la población panameña padece DM2, lo que representa una alta incidencia. Además, de acuerdo con la OMS, alrededor de 450 mil personas en Panamá se encuentran en prediabetes, por lo que es importante evaluar si el polimorfismo Pro12Ala en nuestra población está asociado a DM2 y si constituye un factor protector o de riesgo de la enfermedad.

En esta investigación se evaluó la posible asociación del polimorfismo Pro12Ala en una muestra de 195 individuos (99 controles y 96 experimentales) de la población panameña. No existen estudios previos de asociación de este polimorfismo con DM2 en nuestra población y, por lo tanto, nuestro trabajo generará información básica sobre asociación o no de esta variante con una de las condiciones de mayor morbimortalidad en nuestro país.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Sitio de estudio**

La investigación se realizó en el Laboratorio de Genética y Biología Molecular, ubicado dentro de la Universidad de Panamá, Campus Central Octavio Méndez Pereira (8°59'09" N, 79°31'57" W).

### **Grupos de estudio**

Noventa y seis (96) individuos con diabetes mellitus tipo 2, mayores de 40 años, previamente diagnosticados conformaron el grupo experimental y noventa y nueve (99) individuos sanos, también mayores de 40 años, conformaron el grupo control. Se registraron, cuando fue posible, datos básicos como nombre, apellido, sexo, edad, medidas de altura, peso e índice de masa corporal (IMC). En ningún momento estos datos fueron compartidos o comprometidos con personas que no estaban involucradas en la investigación. La participación en el estudio fue voluntaria con consentimiento informado por parte de los participantes, principalmente personal docente y administrativo de la Universidad de Panamá.

### **Obtención de la muestra de sangre**

Las muestras de sangre fueron extraídas por personal técnico (técnicos de laboratorio y tecnólogos médicos). La mayoría de las muestras fueron colectadas en la Universidad de Panamá (Oficina de Salud Ocupacional, Campus Harmodio Arias Madrid y Laboratorio de Biología Molecular); el resto de las muestras fueron obtenidas en el sitio de residencia de los voluntarios. El estudio fue aprobado por el comité de bioética de la Universidad de Panamá. Para la obtención de la muestra de sangre, se seleccionó el dedo medio, al cual se le aplicó presión desde la falange media hacia la distal, con el propósito de concentrar la sangre en esta región. Manteniendo la presión, se procedió a limpiar la región con alcohol al 70% y,

posteriormente, se realizó una punción con una lanceta estéril. La sangre fue colectada en una tarjeta FTA la cual fue identificada con el código correspondiente (C control y E

experimental-padece DM2) seguido del número que identifica la muestra. Una vez colectada la muestra, se presionó el dedo con algodón impregnado en alcohol 70% hasta detener el sangrado. Las muestras obtenidas fueron almacenadas a 4° C para su posterior utilización en la extracción de ADN.

### **Extracción de ADN**

Se recortaron de la tarjeta FTA pequeños pedazos de aproximadamente 0.5 mm, conteniendo sangre. Los pedazos fueron colocados en un tubo Eppendorf de 1.5 ml conteniendo 200 microlitros de buffer de extracción (TL Buffer de Omega BIO-TEK) e incubados durante 1 hora a 55 °C. Una vez lograda la lisis de los glóbulos blancos, la extracción del ADN se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito en el manual E.Z.N.A. Tissue DNA Kit (Omega BIO-TEK). El ADN extraído fue almacenado a -20°C para luego ser utilizado en la reacción de amplificación.

### **Determinación de la concentración y calidad del ADN**

La concentración de ADN fue determinada mediante espectrofotetría utilizando el Espectrofotómetro de micromuestra Nanodrop™ 2000 de ThermoScientific, el cual posee un rango de espectral (190-840nm) para medir diferentes tipos de muestra. La concentración de ADN se determinó mediante la lectura de la absorbancia a 260 nm y la calidad mediante el cociente de las lecturas a 260 y 280 nm.

### **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 30 µL conteniendo 2 µL (~6.0 ng) de ADN, 12.5 µL de Mastermix 2X (abm MegaFi™ Pro Fidelity), 1 µL de cada primer (10 µM) y 11 µL de agua libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación fueron de 94°C durante 8 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 50 segundos, 59°C por 50 segundos, 72°C por 1 minuto y una extensión final de 5 min a 72°C. Se utilizó un termociclador T100 Thermal Cycler de BIO-RAD.

Los cebadores utilizados en la PCR fueron 5'-GCCAATTCAAGCCCAGTC-3' y 5'-GATATGTTTGCAGACAGTGTATCAGTGAAGGAATCGCTTTCCG-3' (Priya et al. 2016). Estos cebadores amplifican una región de 270 bp del exón B del gen PPARγ2.

### **Electroforesis del producto de PCR**

Con la finalidad de determinar la efectividad de la amplificación, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE IX. Para tal propósito, se cargaron 5 µL de la reacción de amplificación y la electroforesis se realizó a 60 voltios durante 1 hora. En el primer carril se

cargaron los marcadores de peso molecular 100 bp (Bioline) para verificar la generación de un producto de amplificación correspondiente al tamaño esperado (270 bp).

### **Digestión del producto de PCR**

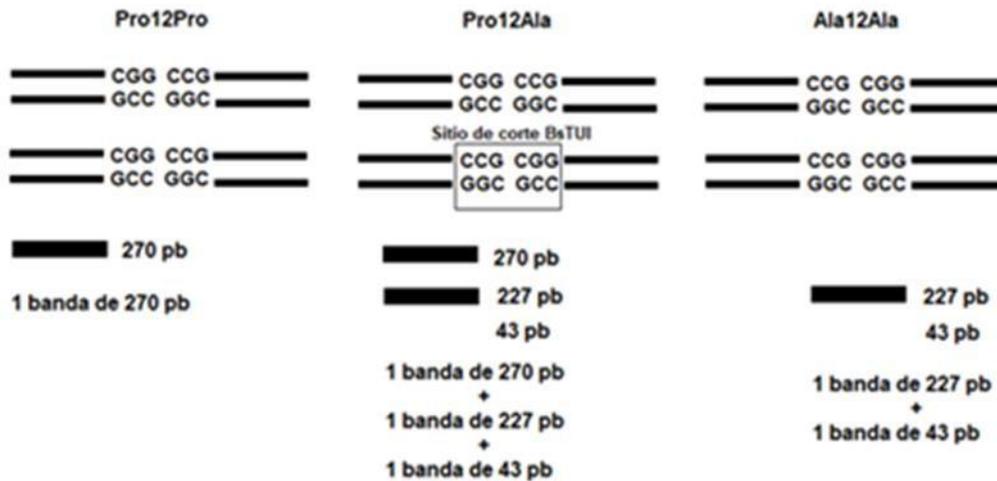
Una vez verificada la amplificación de la región esperada, se procedió a digerir 10  $\mu\text{L}$  (~30 ng) del producto de amplificación con la enzima de restricción BstU1 (New England Biolabs). La digestión se realizó a 60° C durante 3 horas. La reacción de digestión se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  y 0.5  $\mu\text{L}$  de la enzima (5 U/  $\mu\text{L}$ ).

### **Determinación del genotipo**

El patrón de digestión generado a partir de cada muestra indica el genotipo presente en cada individuo. Debido a que el polimorfismo Pro12Ala resulta del cambio de un nucleótido (C→G) que genera un sitio de restricción que reconoce la enzima BstU1; los individuos que poseen un alelo Ala (heterocigotos) generarán un patrón de restricción de dos bandas: una banda de 270 bp correspondiente al alelo Prolina que no posee un sitio de digestión para la enzima BstU1 y otra banda de 227 bp correspondiente al alelo Alanina, el cual es digerido por la enzima generando dos bandas, una de 227 bp y otra de 43 bp; esta última no se observa en el gel. De esta manera, los individuos heterocigotos (Pro/Ala) presentan una banda de 270 y otra de 227 bp, mientras que los individuos homocigotos Pro/Pro presentan un patrón de una sola banda de 270 bp. El genotipo homocigoto Ala12Ala estaría presentando una banda de 227 bp ya que, como se mencionó con anterioridad, la banda de 43 pb no se observa en la electroforesis.

### **Figura 1.**

*Productos de la digestión, sitios de restricción.*



### Electroforesis de los productos de digestión

El patrón de digestión fue evidenciado mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% en TAE IX conteniendo 2  $\mu$ L de GelRed (Biotium). Diez microlitros (10  $\mu$ L) del producto de digestión de cada muestra fueron cargados en el gel. En cada gel se cargaron, además, 0.5  $\mu$ L de marcador de peso molecular 100 bp Ladder (Bioland). La electroforesis se realizó a 45 voltios durante 2 horas. El patrón de digestión fue visualizado en un fotodocumentador UV Gel Doc EZ BioRad.

### Frecuencias Genotípicas y Alélicas

Las frecuencias genotípicas y alélicas fueron calculadas tanto en la muestra total como en cada grupo (control y experimental). La frecuencia de cada genotipo fue calculada utilizando la siguiente relación:

$f(\text{ProPro}) = \text{cantidad de individuos con genotipo ProPro} / \text{Total de individuos}$

$f(\text{Pro12Ala}) = \text{cantidad de individuos con genotipo Pro12Ala} / \text{Total de individuos}$

$f(\text{AlaAla}) = \text{cantidad de individuos con genotipo AlaAla} / \text{Total de individuos}$

La frecuencia de cada alelo fue calculada utilizando la siguiente relación:

$$f(\text{Pro}) = \frac{2(\text{cantidad individuos con genotipo ProPro} + \text{cantidad de individuos Pro12Ala})}{2(\text{total de individuos})}$$

$$f(\text{Ala}) = \frac{2(\text{cantidad individuos con genotipo AlaAla} + \text{cantidad de individuos Pro12Ala})}{2(\text{total de individuos})}$$

### **Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE)**

Una vez determinadas las frecuencias alélicas y genotípicas totales, se procedió a determinar si las mismas se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg, en donde las frecuencias genotípicas esperadas están dadas por la siguiente ecuación:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

El HWE también fue determinado en cada grupo por separado (casos y experimentales). Se utilizó el calculador en línea ([wpcalc.com/en/equilibrium-hardy-weinberg/](http://wpcalc.com/en/equilibrium-hardy-weinberg/)) para determinar si las frecuencias observadas se ajustaban o no al HWE.

### **Determinación de asociación entre el polimorfismo Pro12Ala y DM2**

La asociación del genotipo Pro12Ala fue evaluada mediante una prueba de chi cuadrado ( $\chi^2$ ). Para comprobar la asociación entre el genotipo Pro/Ala y DM2, se realizó una prueba de Razón de Momios (odds ratio) para determinar el grado de asociación entre estas variables.

### **Razón de Momios**

La razón de momios fue calculada utilizando el programa Epi Info 7.2. (<https://www.cdc.gov/epiinfo/index.html>).

## **RESULTADOS**

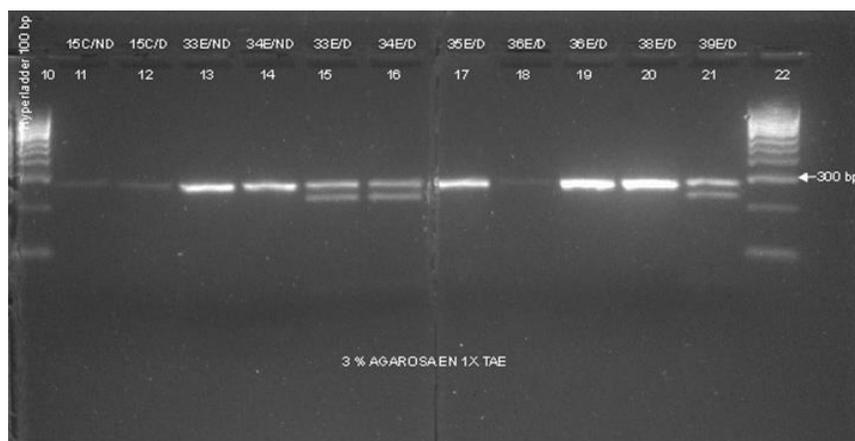
Se analizaron 195 muestras de las cuales 96 corresponden a pacientes con diagnóstico certero de DM2 (experimentales) y 99 individuos sanos (controles).

El genotipo presente en cada individuo se obtuvo mediante PCR-RFLP, observando el tamaño de las bandas generadas después de cortar los fragmentos amplificados con la enzima BstUI. En la figura 2 se observan los genotipos identificados en la muestra control 15C y las experimentales 33E, 34E, 35E, 36E, 38E y 39E. En los carriles 11 y 12 se observan los productos de PCR de la muestra 15C sin digerir y digerida, respectivamente, correspondientes a un individuo de género femenino con genotipo Pro/Pro.

Los carriles 13, 14 15 y 16 corresponden a las muestras 33 y 34 no digeridas y digeridas las cuales corresponden a individuos con genotipo Pro/Ala. Los carriles 17 18 19 y 20 corresponden a las muestras digeridas 35, 36 y 38 con genotipo Pro/Pro. El carril 21 representa el genotipo Pro/Ala de la muestra 39 luego de la digestión.

### **Figura 2.**

*Detección del polimorfismo Pro12Ala mediante PCR. Carril 10 y 22 muestran los marcadores de peso molecular. Los carriles 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20 muestran el genotipo Pro12Pro (un solo fragmento de 270 pb). Los carriles 15, 16 y 21 muestran el genotipo Pro12Ala con los dos fragmentos de 270 pb y 227 pb que resultan del sitio de restricción adicional en estos individuos. El fragmento de 43 pb no se observa.*



El genotipo homocigoto (Ala/Ala) no se observó en los individuos en estudio, ya que ninguna de las muestras digeridas presentó una banda única de 227 pb.

Las frecuencias alélicas y genotípicas de ambas poblaciones (experimental y control) se muestran en la tabla 1. Se observa la ausencia de individuos con genotipo (Ala/Ala) dentro de nuestra muestra.

El alelo Pro se presentó con una frecuencia total de 0.969, mientras que la frecuencia total del alelo Ala fue de 0.030. La frecuencia del alelo Pro en individuos que no padecen DM2 (controles) fue de 0.995, mientras que en individuos con DM2 fue de 0.943. La frecuencia del alelo Ala fue mayor en individuos con DM2 que en aquellos que no padecen la condición. El genotipo con mayor frecuencia fue Pro/Pro en la muestra total y en ambos grupos (control y experimental). Por otro lado, los heterocigotos Pro/Ala se observaron con mayor frecuencia en individuos con DM2 que en individuos sanos.

**Tabla 1.**

*Frecuencias alélicas y genotípicas. N, cantidad de individuos; Cont., controles; Exp., experimentales; f, frecuencia.*

<b>N (195)</b>	<b>f(Pro)</b>	<b>f(Ala)</b>	<b>f(ProPro)</b>	<b>f(Pro12Ala)</b>	<b>f(AlaAla)</b>
----------------	---------------	---------------	------------------	--------------------	------------------

<b>Cont.</b>	99	0.995	0.005	0.989	0.011	0
<b>Exp.</b>	96	0.943	0.057	0.885	0.114	0
<b>Total</b>	195	0.969	0.030	0.938	0.061	0

**Tabla 2.**

*Distribución de los individuos por género según su genotipo. F (femenino), M (masculino) y SD (sin determinar).*

	<b>Controles</b>			<b>Experimentales</b>		
	Pro/Pro	Pro/Ala	Ala/Ala	Pro/Pro	Pro/Ala	Ala/Ala
<b>Sexo</b>						
<b>F</b>	51	1	0	42	6	0
<b>M</b>	42	0	0	43	3	0
<b>SD</b>	5	0	0	0	2	0
<b>Total</b>	98	1	0	85	11	0

En ambos grupos (control y experimental) el genotipo Pro12Ala fue observado mayormente en mujeres (Tabla 2). En las muestras experimentales, de los 11 individuos heterocigotos, 6 corresponden al género femenino, 3 al masculino y en los 2 heterocigotos restantes no se registró la información del género.

Razón de momios (odds ratio)

La RM fue de 12.6824 con un Riesgo Relativo (RR) estimado de 1.9735 (Tabla 3). En nuestro estudio, el Riesgo Relativo de desarrollar DM2 es mayor en individuos heterocigotos Pro/Ala comparado con aquellos que no poseen este genotipo. Un valor RM mayor de 1 indica que el genotipo Pro12Ala se comporta como un factor de riesgo.

**Tabla 3.**

*Análisis mediante Epi info 7.2*

<b>Parámetros basados en posibilidad</b>			
	<b>Estimado</b>	<b>Inferior</b>	<b>Superior</b>
<b>Odds Ratio</b>	12.6824	1.6041	100.2708
<b>MLE Odds Ratio</b>	12.5599	2.0797	278.0071

<b>Fisher Exact</b>	1.7599	551.3208	
<b>Parámetros basados en riesgo</b>			
	<b>Estimado</b>	<b>Inferior</b>	<b>Superior</b>
<b>Riesgo relativo</b>	1.9735	1.5667	2.4861
<b>Diferencia de riesgo</b>	45.2186	27.9918	62.4454
<b>Pruebas estadísticas</b>			
	<b>Chi cuadrado</b>	<b>2-tailed p</b>	
<b>No corregido</b>	9.2129	0.00240438	

## DISCUSIÓN

La variación de un sólo nucleótido en el exón B del gen que codifica para PPAR $\gamma$ 2 (Pro12Ala) ha sido estudiada en varias poblaciones como una variante genética asociada a DM2. El alelo Ala12 ha sido asociado a reducción del riesgo o protección de padecer diabetes mellitus tipo 2 (Altshuler et al. 2000; Hara et al. 2000; Frederiksen et al. 2002; Evans et al. 2001; Memisoglu, et al. 2003; Andrulionyté et al. 2004; Doney, et al. 2004; Pinteróvá et al. 2004; Moon et al. 2005; Jaziri, et al. 2006; Soriguer, et al. 2006; Meshkani et al. 2007). Por el contrario, en otras poblaciones, la presencia de este alelo ha sido asociada con predisposición o riesgo de desarrollar DM2 (Evans et al. 2001; Kilpelainen et al. 2008; Florez et al. 2007; Gouda et al. 2010; Ghousaini et al.2005; Zeggini et al. 2005; Chistiakov et al. 2010; Vergotine et al. 2014; Majid et al. 2017). En otros estudios no se observó asociación entre este alelo y la diabetes mellitus tipo 2 (Mancini et al 1999; Bouassida et al. 2005; Badii et al. 2008; Malecki et al. 2003; Moffett et al. 2005).

Independientemente de los resultados contradictorios en cuanto a asociación o no de Ala12 con DM2, el alelo de menor frecuencia (poco común) el que codifica para alanina en la posición 12 (Ala12), en todas las poblaciones estudiadas. La frecuencia de este alelo varía entre 2% a 23% en diferentes grupos étnicos (Stumvoll & Haring, 2002). En individuos sanos, la frecuencia de este alelo es de 1.7 a 21.6%; en caucásicos varía entre 5.9% y 21.6% y en individuos de ascendencia asiática entre 1.7% y 9.3% (Gouda et al., 2010).

En nuestro estudio, la frecuencia del alelo Ala12 fue de 2.8%, frecuencia que se ubica en el rango de los valores de las frecuencias reportadas para este alelo a nivel mundial. No obstante, la frecuencia fue mucho menor que la observada en niños mexicanos (Stryjecki et al. 2015), Amerindios (Cañizales-Quintero et al. 2007) y niños españoles (Vales-Villamarín et al. 2021). La frecuencia del alelo Ala12 observada en nuestro estudio se aproxima más al 2.1 % observada en negros americanos (fornage et al. 2005) y al 2.2 % reportada en algunas poblaciones asiáticas (Namvaran et al. 2010).

Las frecuencias genotípicas en la muestra total, como también en ambos grupos control y el experimental, se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg. Las frecuencias genotípicas en la muestra total fueron 93.8 %, 6.1% y 0 % para los genotipos Pro12Pro, Pro12Ala y Ala12Ala, respectivamente. La ausencia de homocigotos Ala12Ala ha sido reportada en otros estudios (Namvaran et al. 2010; Stryjecki et al. 2015). Frecuencias genotípicas de 97.4 % (Pro/Pro), 2.5% (Pro/Ala) y 0 % (Ala/Ala) un tanto similares a las nuestras fueron observadas en un estudio con 540 nativos de la isla de Java (Danawati et al. 2005).

Las frecuencias genotípicas por grupo fueron significativamente diferentes, como muestra el valor de chi cuadrado. Así, una mayor frecuencia del genotipo Pro12Ala se observó en el grupo experimental (DM2) con respecto al grupo control (0.114 vs 0.010). Interesantemente, la frecuencia de este genotipo en mujeres con DM2 fue mayor que en hombres con esta condición. Resultados similares se reportaron en nativos americanos de la etnia Oji-Cree (Hegele et al. 2000).

En nuestro trabajo, el polimorfismo Pro12Ala muestra asociación con DM2 como un factor de riesgo, como ha sido reportado en varias investigaciones y contrario a otros en los que se asocia como un factor protector. En cuanto a la asociación o no como factor protector o de riesgo, las diferencias pueden ser atribuidas al hecho que la DM2 es una enfermedad multifactorial en la cual intervienen tanto componentes genéticos como ambientales (Christiansen et al. 2023). La mezcla racial es un factor genético que juega un papel importante ya que se ha demostrado que el riesgo de padecer diabetes mellitus tipo 2 varía entre grupos raciales o étnicos (Weiss et al. 1984). Se ha demostrado que los Indios Americanos poseen una de las tasas más altas de diabetes en el mundo (West 1978; Bennett 1983).

Estudios de prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 en poblaciones producto de la mezcla entre indios y caucásicos, como por ejemplo las poblaciones de hispanos del suroeste de Estados Unidos, muestran una prevalencia intermedia a la observada en indios y caucásicos (Gardner et al. 1984; Iyengar et al 1991).

La obesidad, el aumento en el consumo de calorías y grasas, la reducción en el consumo de carbohidratos complejos y la poca actividad física son factores ambientales asociados a un incremento en la incidencia y prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 (Hamman, 1992; Torun et al., 2002; Klimentidis et al., 2009). A pesar de que se ha cuestionado el rol de los factores ambientales, debido a la carencia de este tipo específico de estudio, es importante mencionar que, en investigaciones en Hawainos que migraron a Japón (Kawate et al., 1979; ) y en Yemenies que migraron a Israel (Cohen et al., 1961), se observó un incremento de esta patología en los migrantes con relación a individuos del mismo acervo genético que no migraron, lo cual indica que el medio es un factor que se relaciona con el desarrollo de la condición. Esta interacción entre genes y genes y ambiente podría explicar la inconsistencia en los resultados de estudios de asociación genética con la DM2. Estudios de análisis de interacción logística de parejas de SNPs evidenciaron que la presencia de ciertas parejas de SNPs se asocian significativamente como factor de riesgo de padecer DM2 a pesar de que, individualmente, no mostraron asociación (Irgam et al. 2021). La interacción entre el estilo de vida (dieta, actividad física) y las variantes genéticas relacionadas con DM2 deben ser estudiadas en cada grupo étnico (Hur et al. 2022).

Un aspecto adicional a considerar son las modificaciones epigenéticas en la patogénesis de DM2 (Ahmed et al. 2020). Estudios realizados hace algunas décadas han demostrado la relación entre epigenética y diabetes mellitus tipo 2. Se han identificado alteraciones en el patrón de metilación del ADN en los islotes pancreáticos, tejido adiposo, músculo esquelético e hígado en individuos con DM2. De hecho, factores no genéticos asociados al riesgo de padecer de DM2, como la obesidad, la dieta, inactividad física, envejecimiento y entorno intrauterino, han sido asociados con modificaciones epigenéticas (Ling et al. 2022).

En nuestro país, la mezcla racial responde a un modelo trihíbrido complejo con contribuciones de africanos, europeos y amerindios (Castro et al. 2016). Esta compleja mezcla racial podría aportar componentes genéticos característicos que, aunados a los factores ambientales propios de nuestra sociedad y estilo de vida, respondan de manera muy particular al desarrollo o no de la DM2. Por lo tanto, algunos componentes genéticos presentes en nuestra población podrían no considerarse como factores de riesgo frente a ciertos factores ambientales o estilos de vida o bien ser considerados factores de riesgo, dependiendo del género.

En resumen, este es el primer estudio sobre el polimorfismo Pro12Ala en el gen PPAR $\gamma$ 2 en la población panameña, encontrando una posible asociación de riesgo de entre este polimorfismo y la DM2.

## **CONCLUSIONES**

Este trabajo representa el primer estudio sobre asociación entre diabetes mellitus tipo 2 y el polimorfismo Pro12Ala (rs18012829) en una muestra de casos y controles de la población panameña. La razón de momios (OR) evidenció asociación con un riesgo relativo de 1.9735 en aquellos con genotipo Pro12Ala. La frecuencia del genotipo Pro12Ala fue mayor en mujeres lo cual sugiere que éstas pueden estar más predispuestas a desarrollar esta condición. Los resultados observados en este trabajo no necesariamente son aplicables a otras poblaciones ya que el acervo genético de la población panameña, el estilo de vida y las condiciones medio ambientales son muy particulares en nuestra población.

Consideramos necesario realizar estudios de asociación de genoma completo (GWAS) en los cuales se consideren varios marcadores de manera simultánea y se correlacionen estos con patrones epigenéticos y estilos de vida mediante un análisis de metadatos en una muestra mayor de la población panameña considerando un diseño de casos y controles.

### **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos el apoyo de la oficina de Salud ocupacional de la Universidad de Panamá por coordinar la logística para la toma de las muestras de los colaboradores de la institución que participaron en este estudio y a todos los voluntarios que no laboran en la institución. A los estudiantes de Tecnología Médica de la Facultad de Medicina por permitirnos obtener el resto de las muestras utilizadas en este estudio. Agradecemos al personal técnico del Laboratorio de Genética y Biología Molecular por el tiempo y orientación proporcionada.

Agradecemos al Sistema Nacional de Investigación (SNI), SENACYT, Clayton, por el apoyo en la realización de esta investigación.

### **REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

- Ahmed, S. A. H., Ansari, S. A., Mensah-Brown, E. P. K. & Emerald, B. S. (2020). Clinical Epigenetics. 12:104 <https://doi.org/10.1186/s13148-020-00896-4>
- Altshuler, D., Hirschhorn, J., Klannemark, M. et al. (2000). The common PPAR $\gamma$  Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 26, 76–80. <https://doi.org/10.1038/79216>
- Andrulionytė, L., Zacharova, J., Chiasson, J. et al. (2004). Common polymorphisms of the PPAR- $\gamma$ 2 (Pro12Ala) and PGC-1 $\alpha$  (Gly482Ser) genes are associated with the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes in the STOP-NIDDM trial. *Diabetologia*, 47(12), 2176–2184. <https://doi.org/10.1007/s00125-004-1577-2>

- AsocMexDiabetes. (2021, 30 junio). TRANSPORTADORES DE GLUCOSA (GLUTS). Asociación Mexicana. <https://www.amdiabetes.org/post/transportadores-de-glucosa-gluts>
- Badii, R., Bener, A., Zirie, M. et al. (2008). Lack of association between the Pro12ALA polymorphism of the PPAR- $\Gamma$ 2 gene and Type 2 diabetes mellitus in the Qatari consanguineous population. *Acta Diabetologica*, 45(1), 15-21. <https://doi.org/10.1007/s00592-007-0013-8>
- Bouassida, K., Chouchane, L., Jellouli, K. et al. (2005). The peroxisome proliferator activated receptor gamma2 (PPARgamma2) Pro12Ala variant: lack of association with type 2 diabetes in obese and non obese Tunisian patients. *Diabetes Metab*; 31(2):119-23. doi: 10.1016/s1262-3636(07)70177-5.
- Cañizales-Quinteros, Aguilar-Salinas, C., Ortiz-López, M G. et al. (2007). Association of PPARG2 Pro12Ala variant with larger body mass index in Mestizo and Amerindian populations of Mexico. *Hum Biol*. 79(1):111-9. doi: 10.1353/hub.2007.0022.
- Castro, E., Trejos, D., Hrbek, T. et al. (2016). Genetic Ancestry of the Panamanian Population: Polymorphic Structure, Chibchan Amerindian Genes; and Biological Perspectives on Diseases. *The Internet Journal of Biological Anthropology*. Volume 9 Number 1. Doi: 10.5580/IJBA.44045
- Chistiakov, D. A., Potapov, V. A., Nosikov, V. V. et al. (2010) The PPARgamma Pro12Ala variant is associated with insulin sensitivity in Russian normoglycaemic and type 2 diabetic subjects. *Diab. Vasc. Dis. Res.* 7, 56–62. <https://doi.org/10.1177/1479164109347689>
- Christiansen, C., Arathimos, R., Pain, O. et al. (2023). Stratified genome-wide association analysis of type2 diabetes reveals subgroups with genetic and environmental heterogeneity. *Human Molecular Genetics* 32 (16): 2638-2645.
- Cohen, A. M., Bavly, S. & Poznanski, R. (1961). Change of diet of Yemenite Jews in relation to diabetes and ischemic heart disease. *Lancet* 21399-1401.
- Danawati, C. W., Nagata, M., Moriyama, H. et al. (2005). A possible association of Pro12ALA polymorphism in peroxisome proliferator-activated receptor  $\Gamma$ 2 gene with obesity in native Javanese in Indonesia. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 21(5), 465-469. <https://doi.org/10.1002/dmrr.543>

Doney, A., Fischer, B., Cecil, J. et al. (2004). Association of the Pro12Ala and C1431T variants of PPARG and their haplotypes with susceptibility to Type 2 diabetes. *Diabetologia* 47, 555–558.

EpI InfoTM | CDC. (s. f.). <https://www.cdc.gov/epiinfo/index.html>

Evans, D. et al. (2001). Association between the P12A and c1431t polymorphisms in the peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR gamma) gene and type 2 diabetes. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 109, 151–154, 10.1055/s-2001-14838.

Florez, J. et al. (2007). Diabetes Prevention Program Research Group. Effects of the type 2 diabetes-associated PPARG P12A polymorphism on progression to diabetes and response to troglitazone. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Apr;92(4):1502-9. doi: 10.1210/jc.2006-2275.

Fornage, M. et al. (2005). Inverse effects of the PPARc2 Pro12Ala polymorphism on measures of adiposity over 15 years in African Americans and whites The CARDIA study. *Metabolism Clinical and Experimental*, 54, 910 – 917

Frederiksen, L. et al. (2002). Comentario: estudios del polimorfismo Pro12Ala del gen PPAR-gamma en la cohorte danesa MONICA: la homocigosidad del alelo Ala confiere un menor riesgo de síndrome de resistencia a la insulina. *J Clin Endocrinol Metab.* 87: 3989–3992.

Gardner, L. I. et al. (1984). Prevalence of diabetes in Mexican Americans: relationship to percent of gene pool derived from Native American genetic admixture. *Diabetes* 33:36-92.

Ghoussaini, M. et al. (2005). Implication of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma 2 gene in type 2 diabetes and obesity in the French population. *BMC Med Genet.* 22;6:11.doi:10.1186/1471-2350-6-11.

Gouda, H. et al. (2010). The Association Between the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-g2 (PPARG2) Pro12Ala Gene Variant and Type 2 Diabetes Mellitus: A HuGE Review and Meta-Analysis. *Am. J. Epidemiol* 171:645-655. doi: 10.1093/aje/kwp450

Hara, K. et al. (2000). The Pro12Ala polymorphism in PPAR gamma2 may confer resistance to type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* 29;271(1):212-6 doi: 10.1006/bbrc.2000.2605.

- Hamman, R. (1992). Genetics and environmental determinants of Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus (NIDDM). *Diabetes Metabolism Reviews*, Vol. 8, No. 4, 287-338
- Hegele, R. A. et al. (2000). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  P12A and Type 2 diabetes in Canadian Oji-Cree. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(5), 2014-2019. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.5.6610>
- Hur, H. et al. (2022). Association of Polygenic Variants with Type 2 Diabetes Risk and Their Interaction with Lifestyles in Asians. *Nutrients*, 14, 3222. <https://doi.org/10.3390/nu14153222>
- Irgam, K. et al. (2021). The genetic susceptibility profile of type 2 diabetes and reflection of its possible role related to reproductive dysfunctions in the southern Indian population of Hyderabad. *BMC Medical Genomics*. 14:272
- Iyengar, S. et al. (1991). Amerindian admixture among the Anglo and Hispanic ethnic groups in the San Luis Valley, Colorado. *Am J Phys Anthropol Suppl*. 12:97-98.
- Janani, C., & Ranjitha Kumari, B. (2014). PPAR gamma gene – A review. *Diab Met Syndr: Clin Res Rev*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsx.2014.09.015>
- Jaziri, R. et al. (2006). The *PPARG* Pro12Ala polymorphism is associated with a decreased risk of developing hyperglycemia over 6 years and combines with the effect of the APM1 G-11391A single nucleotide polymorphism: the Data From an Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syndrome (DESIR) study. *Diabetes* 55 1157–1162
- Kawate, R. et al. (1979) Diabetes mellitus and its vascular complications in Japanese migrants and on the island of Hawaii. *Diabetes Care* 2:161-170.
- Kilpelainen, T. et al. (2008). SNPs in *PPARG* associate with type 2 diabetes and interact with physical activity. *Med Sci Sports Exerc*. 40(1):25-33. doi: 10.1249/mss.0b013e318159d1cd.
- Kirk, B. et al. (2002). Single Nucleotide Polymorphism seeking long term association with complex disease. *Nucleic Acid Research*. Vol 30 No 15 3295-3311
- Klimentidis, Y., Miller, G., & Shriver, M. (2009). The Relationship Between European Genetic Admixture and Body Composition Among Hispanics and Native Americans. *Am. J. Hum. Biol.* 21:377–382.

- Ling, C., Bacos, K. & Rönn, T. (2022). Epigenetics of type 2 diabetes mellitus and weight change — a tool for precision medicine?. *Nat Rev Endocrinol* 18, 433–448. <https://doi.org/10.1038/s41574-022-00671-w>
- Lucier, J., Weinstock RS. Type 1 Diabetes. (2023) Mar 3. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–. PMID: 29939535.
- Majid, M. et al. (2017) Association of Pro12Ala polymorphism of peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 (PPARgamma2) gene with type 2 diabetes mellitus in ethnic Kashmiri population. *Biochem Genet.* 55, 10–21, <https://doi.org/10.1007/s10528-016-9765-6>
- Malecki, M. et al. (2003). The Pro12Ala polymorphism of PPARgamma2 gene and susceptibility to type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *Diabetes Res Clin Pract* 62(2):105-11. doi: 10.1016/s0168-8227(03)00164-5.
- Mancini, F. et al. (1999). Pro12Ala substitution in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 is not associated with type 2 diabetes. *Diabetes*;48(7):1466-8. doi: 10.2337/diabetes.48.7.1466.
- Memisoglu, A. et al. (2003). Interaction between a peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene polymorphism and dietary fat intake in relation to body mass. *Hum Mol Genet.* 12(22):2923-9. doi: 10.1093/hmg/ddg318. Epub 2003 Sep 23. PMID: 14506127.
- Meshkani, R. et al. (2007). Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 (PPARgamma-2) gene is associated with greater insulin sensitivity and decreased risk of type 2 diabetes in an Iranian population. *Clin Chem Lab Med.* 45(4):477-82. doi: 10.1515/CCLM.2007.095.
- Moffett, S. et al. (2005). The C161 → T polymorphism in peroxisome proliferator-activated receptor gamma, but not P12A, is associated with insulin resistance in Hispanic and non-Hispanic white women: evidence for another functional variant in peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Metabolism* 54:1552–1556
- Moon, M. et al. (2005). Genetic polymorphisms in peroxisome proliferator-activated receptor gamma are associated with Type 2 diabetes mellitus and obesity in the Korean population. *Diabet. Med.* 22, 1161–1166, doi:10.1111/j.1464-5491.2005.01599.x

- Namvaran, F., Rahimi-Moghaddam, P. & Azarpira, N. (2010). Genotyping of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- $\gamma$ ) polymorphism (Pro12Ala) in Iranian population. *JRMS*; 16(3): 291-296
- Organización Mundial de la Salud, Informe Mundial sobre la Diabetes, noviembre de 2021.
- Pintérová, D. et al. (2004). The frequency of alleles of the Pro12Ala polymorphism in PPAR $\gamma$ 2 is different between healthy controls and patients with type 2 diabetes. *Folia Biologica (Praha)*, 50: 153-156.
- Poulsen, P. et al. (2003). Impact of two common polymorphisms in the PPAR $\gamma$  gene on glucose tolerance and plasma insulin profiles in monozygotic and dizygotic twins: thrifty genotype, thrifty phenotype, or both? *Diabetes*. 52(1):194–198.
- Priya S.S. et al. (2016). Genotype Phenotype Correlation of Genetic Polymorphism of PPAR Gamma Gene and Therapeutic Response to Pioglitazone in Type 2 Diabetes Mellitus- A Pilot Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. Vol-10(2): FC11-FC14
- Sarhangi, N. et al. (2020). PPARG (Pro12Ala) genetic variant and risk of T2DM: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 10, 12764. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69363-7>
- Soriguer, F. et al. (2006). Pro12Ala polymorphism of the PPARG2 gene is associated with type 2 diabetes mellitus and peripheral insulin sensitivity in a population with a high intake of oleic acid. *J Nutr*. 136(9):2325-30. doi: 10.1093/jn/136.9.2325.
- Stryjecki, C. et al. (2015). Association between PPAR- $\gamma$ 2 Pro12Ala genotype and insulin resistance is modified by circulating lipids in Mexican children. *Scientific Reports* | 6:24472 DOI: 10.1038/srep24472
- Stumvoll, M. & Haring, H., (2002). The peroxisome proliferator-activated receptorgamma2 Pro12Ala polymorphism. *Diabetes*. 51(8):2341-7. doi: 10.2337/diabetes.51.8.2341.
- Torun, B. et al. (2002). Rural-tourban migration and cardiovascular disease risk factors in young Guatemalan adults. *International Journal of Epidemiology*. 31: 218-226
- Vales-Villamarín, C. et al. (2021). PPARc2 Pro12Ala Polymorphism is Associated in Children With Traits Related to Susceptibility to Type 2 Diabetes. *Front. Pharmacol*. 12:763853. doi: 10.3389/fphar.2021.763853

- Vergotine, Z. et al. (2014). Proliferator-activated receptor gamma Pro12Ala interacts with the insulin receptor substrate 1 Gly972Arg and increase the risk of insulin resistance and diabetes in the mixed ancestry population from South Africa. *BMC Genet.* 15, 10, <https://doi.org/10.1186/1471-2156-15-10>
- Weiss, K., Ferrell, R., & Hanis, C. (1984). A New World syndrome of metabolic disease with a genetic and evolutionary basis. *Yearbook Phys Anthropol* 27:153-178.
- West, K. (1978). *Epidemiology of Diabetes and its Vascular Lesions*. Elsevier Biomedical Press, New York.
- Westman E. (2021). Type 2 Diabetes Mellitus: A Pathophysiologic Perspective. *Front Nutr.* 10;8:707371. doi: 10.3389/fnut.707371.
- Zárate, A., Saucedo, R., & Hernández, M. (2005) El receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma (PPAR $\gamma$ ) es un factor de transcripción multigénico de versatilidad metabólica. *Acta Med.* 3(1):53-54.
- Zeggini, E. et al. (2005). Examining the relationships between the Pro12Ala variant in PPARG and Type 2 diabetes-related traits in UK samples. *Diabet Med.* 22(12):1696-700. doi: 10.1111/j.1464-5491.2005.01717. x.