

00544



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA
ESPECIALIDAD EN BIOQUÍMICA CLÍNICA**

**FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN IMPLICADOS EN
LA DIABETES MELLITUS TIPO 2
DE INICIO TEMPRANO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN BIOQUÍMICA CLÍNICA**

P R E S E N T A :

ISELA MONTUFAR ROBLES

ASESOR: DRA. MARTA MENJIVAR IRAHETA



MÉXICO, D.F.

FEBRERO, 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA
DIRECCIÓN

FQUI/CP/339/03

BIOL. FRANCISCO J. INCERA UGALDE.

Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado.

Presente.

Me es grato informarle que la alumna **ISELA MONTUFAR ROBLES** presentará próximamente su examen para obtener el diploma de Especialización en Bioquímica Clínica (Clave 341), ante el siguiente jurado:

Presidente: Dra. María Guadalupe Ortiz López (Hospital Juárez)
Vocal: Dra. Marta Menjivar Iraheta (FQ)
Secretario: EBC. Romelia Velasco Ortiz (IN Ped.)
Primer Suplente: M. en C. Ma. de los Ángeles Granados S. (FQ)
Segundo Suplente: Dr. Aquiles Ayala Ruiz (Hospital Juárez)

Sin otro particular de momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D. F., 4 de septiembre de 2003.

El Director


M. en C. Santiago Capella Vizcaino

C.c.p. Integrantes del Jurado
C.c.p. Coordinador de Área
C.c.p. Departamento de Control Escolar
C.c.p. Interesado
*ggm.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Isela Montufar Robles

FECHA: 2-Feb-2004

FIRMA: 

AGRADECIMIENTOS

Al **Hospital Juárez de México**, laboratorio de Endocrinología Molecular de la Unidad de Investigación por el apoyo facilitado para la realización de este trabajo.

A la **U.N.A.M.** departamento de Biología de la Facultad de Química por el apoyo recibido para la realización de este trabajo.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo recibido para la realización de este trabajo. Proyecto número 40518.

Al **Departamento de Becas de Intercambio Académico** de la U.N.A.M.

Agradezco profundamente a la **Dra. Marta Menjívar** por el tiempo dedicado a la realización de esta tesis, por el apoyo que me ha brindado y por sus valiosos consejos.

Con un agradecimiento muy especial a la **Dra. Lupita Ortíz** por toda la ayuda y el gran apoyo que me ha brindado en todo momento.

Con cariño a mis Padres
y a mis hermanas.

I N D I C E

RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	7
Antecedentes	7
Diabetes mellitus tipo 2 de inicio temprano	9
Prevalencia	10
2. METABOLISMO DE LA GLUCOSA	13
Concentración de glucosa en sangre	13
Origen de la glucosa	13
Destino de la glucosa	14
Regulación de la glucosa sanguínea	15
Glucocinasa	16
Insulina	16
Glucágon	16
Hormona de Crecimiento	16
Glucocorticoides	17
Adrenalina	17
Hormona tiroidea	17
3. BIOLOGIA MOLECULAR DE LOS GENES	18
Genes y transcripción	18
Iniciadores de la transcripción	19
Factores de transcripción	20
Promotores	21
Intensificadores	21
Estructura de los factores de transcripción	21
Motivos de unión al DNA de los factores de transcripción	22
Motivo hélice-giro-hélice	22
Motivo hélice-bucle-hélice	23
Motivo homeodominio	23
Motivo dedo de zinc	23
Motivo cremallera de leucina	23
Diferentes promotores regulan diferentes genes	24
Promotores de los genes de clase II	25
Secuencias o elementos basales del promotor	25
Secuencias o elementos proximales	25

Secuencias o elementos distales	26
Factores de transcripción de clase II	27
Factores de transcripción generales	27
Formación del complejo de inicio de la transcripción	30
Modelo de ensamblaje consecutivo de los factores generales	30
Modelo de la holoenzima o de pre-ensamblaje	31
Organización del núcleo: implicaciones para la realización transcripcional	33
4. LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Y SU RELACIÓN CON LA DIABETES	35
Historia de la diabetes mellitus de inicio temprano	35
Genes y diabetes	36
Genes determinados como causantes de diabetes de inicio temprano	37
Diabetes tipo MODY	37
HNF-4 α (MODY 1)	38
HNF-1 α (MODY 3)	39
IPF-1 (MODY 4)	41
HNF-1 β (MODY 5)	42
BETA2/NEUROD1 (MODY 6)	43
Variabilidad genética en genes MODY	44
Factores de transcripción candidato para la diabetes de inicio temprano	44
HNF-3 α	46
Pax 4	46
Pax 6	47
Nkx2.2	47
Nkx6.1	48
Isl-1	48
Hlhx-9	49
Neurogenina 3	49
Genes candidato para la diabetes de inicio temprano	51
Receptor de proliferación γ del peroxisoma	51
Gen de la Calpaína-10	51
Gen de la insulina	52
Gen del receptor de glucágon	53
Gen de la proteína de unión a ácidos grasos intestinales	53
Gen de la subunidad reguladora de la proteína fosfatasa 1	54
Gen de la fosfatidil-inositol-3-cinasa	55
Gen del polipéptido amiloide de los islotes	55
Gen del receptor del péptido 1 parecido al glucágon	56
Gen del receptor de la vitamina D	56
Otros genes	56
5. PERSPECTIVAS FUTURAS	58
Terapia génica para la diabetes	58
6. BIBLIOGRAFÍA	61

La diabetes mellitus es una de las enfermedades endocrinas más frecuentes en todo el mundo, su prevalencia en México (10.9 %), así como en los países en desarrollo es muy alta. De acuerdo con informes de la Asociación Americana de Diabetes (ADA), el costo directo de la diabetes en México en 1991 ascendió a 330 millones de dólares y su costo indirecto fue de 100 millones de dólares, estos costos económicos asociados al tratamiento y sus complicaciones representan una grave carga tanto para los servicios de salud pública en México como para los pacientes.

La asociación de la diabetes mellitus con 5 factores de transcripción y con el gen de la glucocinasa ha permitido el estudio genético-molecular de un subtipo de diabetes denominada MODY por sus siglas en inglés (Maturity Onset Diabetes on the young). La diabetes MODY se caracteriza por aparecer en etapas tempranas de la vida (usualmente antes de los 30 años), por tener un patrón de herencia autosómico dominante, por presentar antecedentes heredofamiliares de diabetes y por exhibir un defecto secretorio de la insulina por parte de las células beta pancreáticas. A la fecha se conocen 5 tipos diferentes de factores de transcripción relacionados a diabetes tipo MODY (HNF-4 α , HNF-1 α , IPF-1, HNF-1 β y BETA2/NeuroD1). Sin embargo, estos no explican la gran mayoría de la diabetes de inicio temprano, sugiriendo la existencia de otros factores de transcripción y/o genes que pudieran estar implicados en la formación de las células beta pancreáticas, de la funcionalidad de éstas o bien dentro del metabolismo de la glucosa. Así, mutaciones en estos factores de transcripción (incluyendo los aún no conocidos) y/o genes relacionados, podrían ser responsables de alteraciones en las proteínas o productos que regulan, esto aunado a un mal estilo de vida (obesidad y sedentarismo), da lugar a un aumento en la susceptibilidad a desarrollar diabetes. El reconocimiento de la participación de estos 5 factores de transcripción como causantes de diabetes tipo MODY y de otros factores transcripcionales pancreáticos como posibles diabetógenos, se basa en que si un factor transcripcional es afectado en su función por una mutación, la expresión de los genes que regula también será afectada, creándose condiciones favorables para la aparición de hiperglucemia.

Entre los genes de factores transcripcionales propuestos como causantes de diabetes mellitus de aparición temprana, están aquellos que participan en la morfogénesis y mantenimiento de la célula beta, como HNF-3 α , Pax-4, Pax-6, NKx2.2, Nkx6.1, Islet-1, Neurogenina-3, y Hlxb-9. Así mismo hay otros genes relacionados a diabetes de inicio temprano entre los que se encuentran el gen de PPAR- γ , gen de la calpaína-10, el gen del receptor al glucagón y el gen de la proteína-fosfatasa tipo 1 entre otros. Tanto factores de transcripción como genes relacionados a diabetes deberán ser más ampliamente evaluados en cuanto a funcionalidad, frecuencia en diferentes poblaciones y relación existente entre ellos con factores ambientales y nutricionales para determinar su grado de participación como causantes de diabetes de inicio temprano, esta búsqueda deberá encaminarse a interpretar la relación que existe entre el polimorfismo de los factores transcripcionales y/o genes con las señales para el control de la glucosa. En fechas recientes se ha estudiado la expresión diferencial de los genes que participan en la secreción, glucosilación, síntesis de proteínas y señalización del metabolismo de la glucosa mediante análisis de microarreglos, que junto con estudios fisiológicos y de biología molecular nos ayudarán a identificar todos aquellos genes responsables de la diabetes de inicio temprano, así como entender mejor la participación de estos genes y su involucramiento en el desarrollo de la diabetes, de tal forma que podamos entender completamente las bases genéticas y patofisiológicas de esta enfermedad.

La importancia de los factores de transcripción implicados como causantes de diabetes mellitus de aparición temprana ha tomado un gran auge en los últimos veinte años. El conocimiento de la estructura y función de los factores de transcripción nos ha permitido en parte, conocer y entender la forma en que se relacionan con el DNA, así como identificar las alteraciones que surgen en los órganos donde ellos actúan y se expresan. Cuando estos factores transcripcionales presentan mutaciones en su estructura generan como consecuencia la aparición de enfermedades como la diabetes. Es por ello que en este trabajo se hace un estudio bibliográfico sobre la estructura, función y relación de los factores transcripcionales, con el desarrollo de diabetes mellitus de inicio temprano.

Antecedentes.- La Diabetes mellitus es una enfermedad en la que se presentan alteraciones del metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, junto con una relativa o absoluta deficiencia en la secreción de insulina y con grados variables de resistencia a ésta. Cuando la enfermedad se establece como tal, se caracteriza por hiperglucemia en ayuno y, en la mayoría de los pacientes con larga evolución de la enfermedad se presentan alteraciones microangiopáticas, en especial retinopatías y nefropatías, así como alteraciones macroangiopáticas como aterosclerosis y alteraciones neurológicas (1-6). La diabetes no es solo la elevación de glucosa en sangre, sino un trastorno muy heterogéneo que implica varias anormalidades. Esta heterogeneidad significa que hay diferencias congénitas, ambientales e inmunológicas entre grupos de pacientes en cuanto a etiología y patogénia, así como en la historia natural y en la respuesta al tratamiento, de tal forma que la diabetes no es una simple enfermedad sino un síndrome que debe enfocarse desde el punto de vista integral (7).

La diabetes constituye un problema sanitario de indudable importancia debido a diferentes causas (8):

- ❖ Elevada prevalencia
- ❖ Cronicidad.
- ❖ Repercusión en múltiples órganos o sistemas.
- ❖ Discapacidad frecuente.
- ❖ Costos económicos.

La diabetes mellitus es una enfermedad multifactorial (9), desórdenes como intolerancia a la glucosa o glucosa en ayuno alterada son factores de riesgo para una diabetes mellitus

futura, además sugieren que el riesgo de las complicaciones diabéticas comienza muchos años antes del inicio clínico de la diabetes (10,11).

Recientemente, tanto la intolerancia a la glucosa como la glucosa en ayuno alterada, se han catalogado como "prediabetes" (12), diversos estudios han mostrado que una modesta pérdida de peso y una actividad física regular pueden reducir la rápida progresión de intolerancia a la glucosa a diabetes tipo 2 (13,14). El tratamiento con metformina (15), acarbosa (16) orlistat (17) y troglitazona (no disponible comercialmente) han mostrado ser efectivas en disminuir la progresión a la diabetes (18).

Anteriormente la diabetes tipo 2 se catalogó como una enfermedad relativamente sola, pero en realidad la diabetes tipo 2 es frecuentemente una manifestación de muchos desórdenes a la vez (19,20), estos están incluidos en el denominado síndrome metabólico (21), el cual conjunta un grupo de factores de riesgo cardiovasculares (22,23), que sumándose a la intolerancia a la glucosa incluyen hiperinsulinemia, dislipidemia (24), hipertensión (25), obesidad visceral (26), hipercoagulabilidad y microalbuminuria (27,28).

La homeostasia en ayunas es el balance entre la producción de glucosa por el hígado y la utilización de la glucosa por el músculo y la grasa. Aunque el metabolismo de la glucosa esta influenciado por muchas hormonas e intermediarios metabólicos, el transporte normal de la glucosa depende principalmente de solo 4 factores (29,30):

1. La propiedad del cuerpo para segregar insulina en forma precisa.
2. La propiedad de la insulina para inhibir la salida de glucosa hepática.
3. La propiedad de la insulina para promover el transporte de la glucosa, es decir la sensibilidad de la insulina
4. La propiedad de la glucosa para ingresar en las células en ausencia de insulina, también llamada sensibilidad de la glucosa o efectividad de la glucosa.

La patogénia de la diabetes tipo 2 involucra por lo menos 2 defectos en este sistema de regulación (31):

1. La lesión que se detecta en forma más precoz es la resistencia a la insulina en los tejidos periféricos, las células beta del páncreas detectan la resistencia a la insulina y responden aumentando la secreción de insulina, a medida que progresa el estado prediabético, la resistencia a la insulina aumenta y los niveles de insulina suben gradualmente (32).
2. El páncreas pierde su propiedad para satisfacer esta demanda, los niveles de insulina comienzan a disminuir y se desarrolla la diabetes no insulino dependiente. En esta etapa la célula beta esta desensibilizada a la estimulación por la glucosa pero todavía responde a otros secretagogos de insulina (33).

Una significativa evidencia indica que la diabetes tipo 2 y los principales defectos que la acompañan son el resultado de la interacción entre los genes del individuo y el medio ambiente (34). Los estudios en poblaciones con alto riesgo de desarrollar diabetes tipo 2, como los indios Pima, o los hijos de padres diabéticos, han demostrado que la resistencia a la insulina precede y predice el desarrollo de diabetes tipo 2 (35). En estas poblaciones la baja sensibilidad de la insulina puede detectarse en las personas normoglucémicas en etapas como la adolescencia o al principio de la segunda década de la vida. La presencia de familias completas con sensibilidad a la insulina alterada, nos indica que la sensibilidad a la insulina se hereda, los estudios longitudinales han demostrado que los descendientes con una baja sensibilidad de la insulina tienen muchas más probabilidades de desarrollar diabetes tipo 2 que aquellos con sensibilidad de insulina normal o elevada (36,37).

Mientras que los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 pueden tener niveles de insulina normales o altos, los niveles de glucosa en sangre son más altos aún, por lo que se esperarían niveles de insulina igualmente altos, pero con una función normal por parte de las

células beta, lo cual no sucede (38), por tanto la secreción de insulina es defectuosa e insuficiente para compensar la resistencia a la insulina en estos pacientes (39). Se ha notado que la resistencia a la insulina puede mejorar con la reducción del peso corporal y/o con tratamiento farmacológico para la hiperglucemia, pero raramente esta resistencia a la insulina es restaurada a valores normales (40).

La gravedad de la diabetes mellitus tipo 2 radica en el gran número de personas que la padece, y en que ésta enfermedad está apareciendo a edades más tempranas de la vida, como en niños y adolescentes, lo que representa un problema de salud pública de grandes proporciones (41,42). La diabetes tipo 2 también ocurre frecuentemente en mujeres que han tenido diabetes mellitus gestacional y en personas con hipertensión y/o dislipidemias, su frecuencia varía en diferentes subgrupos étnicos o raciales (43).

De manera general la diabetes tipo 2 es una enfermedad poligénica y heterogénea, pero las formas monogénicas de diabetes, se desarrollan en pacientes jóvenes, mientras que las formas poligénicas se presentan en una etapa más avanzada de la vida. Estudios realizados en las dos últimas décadas señalan la participación de genes específicos en el desarrollo de un subtipo de diabetes denominada diabetes tipo MODY (maturity onset diabetes of the young), estos genes son responsables de los fenotipos diabéticos de inicio temprano, y en su mayoría son genes que codifican para factores de transcripción pancreáticos, por lo que estos genes son de gran importancia por participar en la formación de otras proteínas implicadas en la regulación del metabolismo de la glucosa, y por estar involucrados en la susceptibilidad a desarrollar diabetes, cuando surgen alteraciones en ellos (44).

Diabetes mellitus tipo 2 de inicio temprano

En 1960, se dio a conocer el primer reporte basado en estudios prospectivos de los familiares en primer grado de pacientes con diabetes mellitus tipo 2, cuya diabetes era moderadamente asintomática y que se presentaba en niños, adolescentes y adultos jóvenes. La intolerancia a la glucosa y la hiperglucemia en ayunas, podían ser mejoradas o normalizadas con terapia de sulfonilurea (45). En 1965 se usó el término de diabetes de inicio temprano para este tipo de diabetes, enfatizándose su fuerte naturaleza genética (46). En 1974 Tattersall (47), reportó una forma leve de diabetes en tres familias de un hospital de Inglaterra, reconociéndose que la diabetes en estas familias tenía un modo de herencia autosómico dominante. En 1975, Tattersall y Fajans (48) diferenciaron el modo de herencia entre 35 familias con diabetes mellitus tipo 1 y 24 familias de Michigan con diabetes de inicio temprano, confirmando su herencia autosómico dominante. Varios años antes (1928), Cammidge había sugerido la existencia de una forma moderada de diabetes con una herencia dominante basada en el descubrimiento de glucosuria, aunque los niveles de glucosa sanguínea no fueron reportados (49).

La diabetes de inicio temprano fue definida como un subtipo de la diabetes mellitus tipo 2, caracterizada por aparecer en jóvenes usualmente menores de 25 años, además de tener una herencia autosómico dominante. Actualmente la diabetes mellitus tipo 2 de inicio temprano es un grupo de desordenes, caracterizado por ser una diabetes no cetónica, de herencia autosómica dominante, que se presenta usualmente antes de los 30 años de edad, y por tener un defecto primario en la función de la célula beta-pancreática. El defecto primario en la secreción de insulina, se refiere a una producción de insulina disminuida por parte de la célula beta, en respuesta a la administración de glucosa por vía oral o intravenosa, o bien lo que es lo mismo, una defectuosa secreción de insulina presente en sujetos prediabéticos con mutaciones en dichos genes (50).

La clasificación de diabetes hecha por la Asociación Americana de Diabetes (ADA), categorizó a la diabetes mellitus tipo 2 de inicio temprano como una "diabetes debida a

defectos genéticos en la función de la célula beta-pancreática" (51,52). A la fecha este tipo de diabetes puede ser el resultado de mutaciones heterocigotas en 6 genes, 5 de estos genes codifican para factores de transcripción: HNF-4 α , HNF-1 α , IPF-1, HNF-1 β y BETA2/NeuroD1 (53,54) y uno de ellos codifica para la glucocinasa (GCK), una enzima muy importante que interviene en la vía glucolítica (55).

Sin embargo, hay un gran número de familias, que no presentan mutaciones en ninguno de estos genes, indicando que hay otros genes que pueden causar esta forma de diabetes (56). Aproximadamente del 15 – 20% de familias caucásicas y un 80% de familias japonesas caen dentro de este grupo, la edad de aparición de la enfermedad en este grupo parece ser más elevada que en las otras formas de diabetes de inicio temprano, por tanto mutaciones en otros factores de transcripción expresados en la célula beta-pancreática pueden generar la aparición de diabetes de inicio temprano en algunas de estas familias (57).

Prevalencia.- Varios cambios en el comportamiento y en el estilo de vida en el siglo pasado han tenido por resultado un dramático incremento en la incidencia de la diabetes mellitus en todo el mundo, este incremento se da principalmente en la diabetes tipo 2 debido a su asociación con la obesidad y con el síndrome metabólico (58,59). La diabetes mellitus, considerada por largo tiempo como una enfermedad de importancia menor en el mundo de la salud, ha tomado su lugar como una de las principales amenazas para el bienestar y salud humana en el siglo XXI. En las dos décadas pasadas se ha observado un gran incremento en el número de personas diagnosticadas con diabetes mellitus en todo el mundo (60).

Como ya se ha dicho grandes cambios en el entorno, en la conducta y en el estilo de vida de las personas han generado altos rangos de obesidad y diabetes. De ahí la reciente adopción del término "diabesidad", sugerido primeramente por Shafrir hace varias décadas (61).

La diabetes mellitus tipo 2 representa del 90-95% de la población diabética, como se ha mencionado, el porcentaje de personas con diabetes va en aumento, actualmente se estima que habrá de 150 a 220 millones en el año 2010, y 300 millones en año 2025 (Fig. 1). La mayoría de los casos son y serán de diabetes tipo 2, la cual esta fuertemente asociada con un estilo de vida sedentario y con obesidad (62) además se espera que su frecuencia en el todo mundo siga aumentando un 6% por año, y que la mayoría de este aumento se de en países en desarrollo (63).

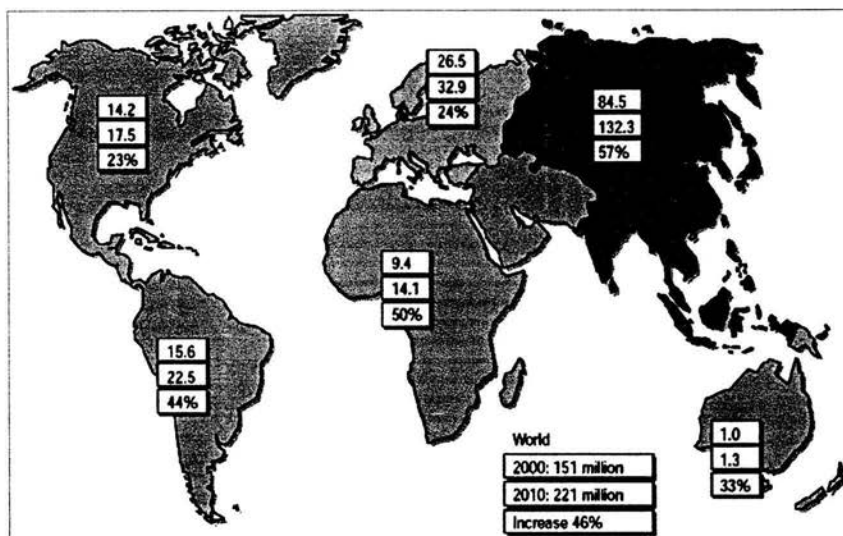


Fig. 1 Número de personas con diabetes mellitus en todo el mundo¹

La prevalencia de la diabetes mellitus tipo 2 varía enormemente de población a población y a través de todo el mundo, así por ejemplo se observan altos rangos en afro-americanos, México-americanos y americanos nativos (64). En los indios Pima de Arizona 50% de los adultos mayores de 35 años presentan la enfermedad y un 66% está presente en indios Pima ancianos (65), un 40% en los habitantes de Nauru en el Pacífico central, y entre 10-15% en distintos grupos asiáticos. En todas las poblaciones la prevalencia aumenta con la edad, en personas blancas la prevalencia de diabetes alcanza 17% hacia los 80 años (66).

El rango de diabetes en diferentes grupos étnicos que viven en el mismo país varía considerablemente, se ha observado que hay diferencias significativas en el porcentaje de diabetes entre personas migrantes y aquellas que permanecen en su propio país. En la mayoría de los casos, los porcentajes en los migrantes son más altos que en las poblaciones indígenas, estos incrementos reflejan el efecto de los cambios en el ambiente sobre la enfermedad. En algunas poblaciones dramáticos aumentos en la prevalencia de diabetes se han observado en cortos períodos de tiempo, estos incrementos en la prevalencia parecen estar relacionados a cambios en el estilo de vida que adopta la población cuando se traslada a otro lugar de residencia (67).

En países como México donde la diabetes mellitus es común, la prevalencia de la enfermedad está aumentando en adultos jóvenes, así las consecuencias de la diabetes tales como exposición prolongada a hiperglucemia y daño vascular, incrementan la posibilidad de que el paciente pueda desarrollar complicaciones crónicas como retinopatía, nefropatía, y neuropatía entre otras (68). Las personas con diabetes de aparición temprana generan una forma más severa de diabetes y requieren tratamiento con insulina tan pronto como se realiza el diagnóstico (69).

¹ Zimmet et al. Global and social implications of the diabetes epidemic. Nature 414 (6865): 782-787.2001

En nuestro país los estudios realizados sobre características y consecuencias de la diabetes diagnosticada entre los 20 y 40 años de edad han sido en casos particulares que han sido captados en los hospitales. En 1993 se realizó un estudio en el cual se analizaron 14,069 pacientes de 417 ciudades diferentes de toda la república, 993 (7%) personas de los 14,069 fueron diagnosticados con diabetes tipo 2, incluyendo 143 personas menores de 40 años (14% de las personas diabéticas). Dentro de los 143 pacientes con diabetes de inicio temprano, 83 (58%) habían sido diagnosticados anteriormente y 60 fueron diagnosticados en ese momento. Se observó que las personas con diabetes mellitus de inicio temprano tenían una prevalencia más alta de presentar obesidad, resistencia a la insulina, alta presión sanguínea, alteraciones en el metabolismo de los lípidos y mayor tendencia a padecer un infarto al miocardio, en comparación con aquellas personas tomadas como control, además aquellas personas con diabetes tenían menos educación, ingerían más alcohol, fumaban más y permanecían desempleados mucho más tiempo que las personas tomadas como control. Una gran proporción de las personas con diabetes provenía del norte de México, mientras que en el sur del país se capturaron menor número de casos debido en gran parte a que en esa zona la vida es más tranquila y no tan occidentalizada como sucede en el norte de nuestro país (70). En ese estudio, la diabetes de inicio temprano estuvo presente en el 14% de los mexicanos con diabetes tipo 2, lo que indica una prevalencia tan alta como la reportada en países desarrollados como los que se encuentran en Europa (<9.4%) (71), pero menor que en la India (25%) (72), el medio oriente (aproximadamente 36%), y los americanos nativos en los Estados Unidos (aprox. 26%) (73,74).

Otro reporte indica que la diabetes de inicio temprano afecta arriba del 1.8% de los mexicanos entre 20-40 años de edad, un porcentaje menor que el presentado por los México-americanos (2.3%) en los Estados Unidos (75). Si los resultados de este estudio en población mexicana se aplican al censo efectuado en 1995, entonces cerca de 318 mil pacientes con diabetes tipo 2 de inicio temprano vivían en la zona urbana de México. Este número de casos muy probablemente creció en los siguientes años, pues la mitad de los mexicanos son menores de 20 años y por la gran influencia del estilo de vida de países occidentalizados donde la diabetes es más frecuente (76).

Según información de la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas (ENEC 1993) se estimó una prevalencia de diabetes de 8.2% en la población mexicana de 20 a 69 años y para el año 2000 la Encuesta Nacional de Salud (ENSA 2000) estimó la prevalencia en 10.9%. (77).

En nuestra población así como entre la población México-Americana más de la mitad de las personas con diabetes desconocen su condición. Esta situación aunada al desempleo y a un estado socioeconómico bajo contribuye a altos índices de complicaciones crónicas, las cuales pueden ser prevenidas con un diagnóstico y tratamiento certero, apropiado y a tiempo (78).

Nuevos y recientes estudios basados en diferentes poblaciones de toda la nación, son necesarios para describir la prevalencia y las características de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 de inicio temprano. Esta información será de suma importancia para desarrollar medidas preventivas en un país como el nuestro, donde el 79% de la población es menor de 40 años (79).

Metabolismo de la glucosa

La naturaleza de la dieta establece los patrones básicos del metabolismo en los tejidos, los mamíferos como los humanos, necesitan procesar los productos absorbidos resultantes de la digestión de los carbohidratos, lípidos y proteínas de la alimentación. Estos productos son principalmente la glucosa, ácidos grasos, glicerol y aminoácidos respectivamente, todos los productos de la digestión se procesan en su respectiva vía metabólica hasta un producto común: la acetil-CoA, que posteriormente se oxida por completo a través del ciclo del ácido cítrico (80).

La mayor parte de los carbohidratos de la dieta se absorbe como glucosa al torrente sanguíneo o se convierte en ésta en el hígado y es a partir de la glucosa que se pueden formar otros carbohidratos en el cuerpo. La glucosa constituye un combustible tisular importante de los mamíferos y un combustible universal para el feto. La glucosa se convierte a otros carbohidratos que desempeñan funciones específicas como glucógeno para almacenamiento, ribosa en los ácidos nucleicos, galactosa en la lactosa de la leche, en ciertos lípidos complejos, y en combinación con las proteínas en las glucoproteínas y los proteoglicanos (81).

Concentración de glucosa en sangre.- En el estado de posabsorción, la concentración de la glucosa sanguínea en los humanos y en muchos mamíferos, se encuentra en el intervalo de 4.5-5.5 mmol/L. Después de una ingestión de una comida rica en carbohidratos puede aumentar de 6.5-7.2 mmol/L. Durante el ayuno las concentraciones disminuyen a valores entre 3.3-3.9 mmol/L. La disminución súbita de la glucosa sanguínea produce convulsiones, lo mismo que la sobredosis de insulina, debido a la dependencia inmediata del encéfalo del suministro de glucosa (82).

Origen de la glucosa.- La mayor parte de los carbohidratos digeribles de la dieta forman glucosa, los carbohidratos de la dieta digeridos activamente contienen residuos de glucosa, galactosa y fructosa que se liberan en el intestino, estos residuos se transportan al hígado a través de la vena porta hepática, la galactosa y la fructosa se convierten fácilmente a glucosa en el hígado (83).

La glucosa se forma a partir de compuestos gluconeogénicos que alimentan la gluconeogénesis, estos compuestos están incluidos en dos categorías (84,85):

1) los que son objeto de una conversión directa neta a la glucosa sin un proceso de reciclaje significativo como algunos aminoácidos y el propionato.

2) los productos del metabolismo parcial de la glucosa en ciertos tejidos y que se transportan al hígado y al riñón para la síntesis de la glucosa.

Así, el lactato formado por la oxidación de la glucosa en el músculo esquelético y en los eritrocitos se transporta al hígado y al riñón donde se reconstituye en glucosa y esta de nuevo queda disponible por medio de la circulación para su oxidación tisular. Este proceso se conoce como el Ciclo del ácido láctico. El glicerol 3-fosfato para la síntesis de los triacilglicéridos en el tejido adiposo proviene de la glucosa sanguínea, los acilgliceroles del tejido adiposo continuamente son objeto de hidrólisis para formar glicerol, el cual no puede utilizarse por el tejido adiposo, y en consecuencia difunde hacia la sangre. En hígado y riñón, el glicerol se convierte en glucosa mediante mecanismos gluconeogénicos (86).

Entre los aminoácidos transportados desde el músculo hasta el hígado durante el ayuno predomina la alanina, lo que ha dado lugar a proponer la existencia de un ciclo glucosa-alanina con el propósito de recircular la glucosa desde el hígado hasta el músculo, con formación de piruvato seguida por transaminación a alanina, y después el transporte al hígado para regresar como glucosa mediante gluconeogénesis. La energía necesaria para la síntesis hepática de la glucosa a partir del piruvato se obtiene de la oxidación de los ácidos grasos, la glucosa también se forma mediante la glucogenólisis a partir del glucógeno hepático (87).

Destino de la glucosa.- La glucosa se metaboliza a piruvato y lactato por la vía de la glucólisis, la glucosa es un sustrato único, ya que la glucólisis puede proceder en ausencia de oxígeno (anaerobia) y en este caso el producto final es el lactato. Sin embargo, los tejidos capaces de utilizar el oxígeno (aerobios) pueden metabolizar el piruvato a acetilCoA, la cual ingresa al ciclo del ácido tricarboxílico para su oxidación completa hasta CO_2 y H_2O , con liberación de mucha energía libre como ATP en el proceso de la fosforilación oxidativa, por tanto la glucosa constituye un combustible importante para muchos tejidos (88,89). Sin embargo la glucosa (y ciertos metabolitos de esta) también participa en otros procesos, por ejemplo (90,91):

1. Conversión a glucógeno, particularmente en músculo esquelético e hígado.
2. La vía de los fosfatos pentosa, que se inicia con los intermediarios de la glucólisis. Esta vía constituye una fuente de equivalentes reductores para la biosíntesis (por ejemplo de ácidos grasos) y también la ribosa importante para la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos.
3. El Fosfato de triosa da origen a la porción glicerol de los acilgliceroles (grasas).
4. El piruvato y los intermediarios del ciclo del ácido cítrico proporcionan los esqueletos de carbono para la síntesis de los aminoácidos, y la acetil-CoA constituye el bloque estructural para los ácidos grasos de cadena larga y el colesterol, este último precursor de todos los esteroides sintetizados en el cuerpo. La gluconeogénesis es el proceso por el cual se produce la glucosa a partir de precursores no carbohidratos, por ejemplo, del lactato, de los aminoácidos y del glicerol.

La glucosa resultante de la digestión de los carbohidratos y los aminoácidos resultantes de la digestión de las proteínas, comparten una ruta común de absorción por la vena porta hepática, por lo que estos metabolitos se dirigen al hígado. El hígado regula la concentración sanguínea de estos metabolitos y de otros más, en el caso de la glucosa esto se logra mediante la captura de exceso de dicha glucosa y su conversión en glucógeno (glucogénesis) o en grasa (lipogénesis). Entre comidas el hígado puede hacer uso de sus reservas de glucógeno para reponer la glucosa en la sangre (glucogenólisis) y obtener glucosa a partir de metabolitos no carbohidratos como lactato, glicerol y aminoácidos (gluconeogénesis). El

mantenimiento de una concentración adecuada de glucosa sanguínea es vital para ciertos tejidos en los cuales constituye un combustible obligado como lo es el encéfalo y los eritrocitos (92,93).

El músculo esquelético utiliza la glucosa como combustible y forma lactato y CO_2 . Almacena glucógeno como el combustible para la contracción muscular, y sintetiza proteínas musculares a partir de los aminoácidos plasmáticos, el esquema siguiente muestra las rutas y destinos de la glucosa (94).

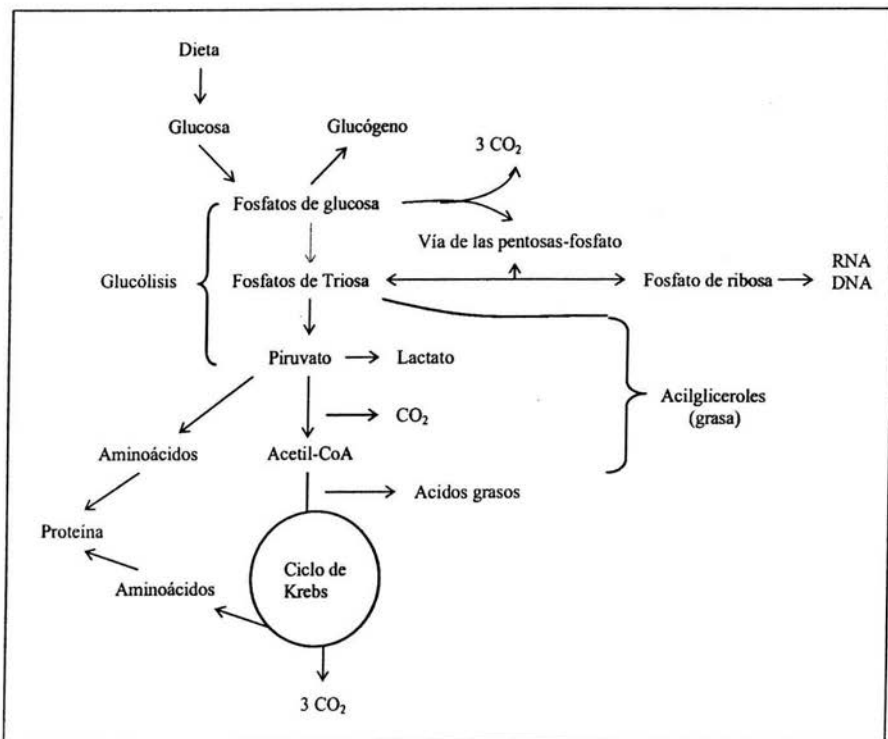


Fig. 2. Vías metabólicas de la glucosa ²

Regulación de la glucosa sanguínea.- La conservación de concentraciones estables de glucosa en la sangre es uno de los mecanismos homeostáticos regulados más finamente y en el cual participan hígado, tejidos extrahepáticos y varias hormonas. Las células hepáticas parecen ser libremente permeables a la glucosa (vía el transportador GLUT2), en tanto que las células de los tejidos extrahepáticos (excepto islotes pancreáticos) son relativamente impermeables. Como resultado, el paso a través de la membrana celular es el paso limitante de la velocidad en la captura de la glucosa por los tejidos extrahepáticos, y una vez que la

² Bioquímica de Harper. Murria y Granner. Ed. Manual Moderno. 2001

glucosa ingresa a las células la hexocinasa cataliza su fosforilación rápida. Por otra parte es probable que la actividad de ciertas enzimas y la concentración de intermediarios importantes ejerzan un efecto mucho más directo sobre la captura o expulsión de la glucosa por el hígado (95,96).

Glucocinasa.- La hexocinasa se inhibe por la glucosa-6-fosfato lo cual constituye el control por retroalimentación sobre la captura de la glucosa en los tejidos extrahepáticos que dependen de la hexocinasa para la fosforilación de la glucosa. El hígado no presenta dicha restricción debido a que la glucosa-6-fosfato no afecta a la glucocinasa. La glucocinasa tiene menor afinidad por la glucosa que la hexocinasa, por lo que incrementa su actividad cuando se sobrepasa el intervalo fisiológico de las concentraciones de glucosa. Esto se relaciona específicamente con la captura hepática de glucosa, cuando existen grandes concentraciones de ésta en la vena porta hepática después de la ingestión de carbohidratos (97).

Insulina.- Es secretada en respuesta directa al grado de hiperglucemia, la célula beta es permeable a la glucosa mediante el transportador GLUT2 y la glucosa se fosforila por medio de la glucocinasa, una vez dentro y fosforilada la glucosa desencadena una serie de eventos que permiten la salida de la insulina por medio de la exocitosis (98,99). Otras sustancias inductoras de la salida de insulina en el páncreas son aminoácidos, ácidos grasos libres, cuerpos cetónicos, glucagón, secretina y drogas que contienen sulfonilurea. La adrenalina y noradrenalina impiden la liberación de la insulina. La insulina tiene el efecto inmediato de incrementar la captura de la glucosa en los tejidos como el adiposo y el muscular, esta acción se debe al aumento del transporte de la glucosa a través de la membrana celular mediante el reclutamiento de los transportadores de glucosa (GLUT4) desde el interior de las células hasta la membrana plasmática (100). En contraste la insulina no tiene efecto directo sobre la penetración de la glucosa en las células hepáticas, lo que concuerda con el hecho de que el metabolismo de la glucosa en las células hepáticas no está limitado por su permeabilidad a la glucosa. Sin embargo, la insulina aumenta a largo plazo la captura de la glucosa por el hígado como resultado de su influencia sobre la síntesis de las enzimas controladas de la glucólisis, glucogénesis y gluconeogénesis. La insulina tiene un efecto activador inmediato sobre la glucógeno sintetasa (101,102).

Glucagón.- El glucagón es una hormona producida por las células α de los islotes pancreáticos, su secreción es estimulada por la hipoglucemia. Una vez que la hormona llega al hígado a través de la vena porta produce glucogenólisis mediante la activación de la fosforilasa. La mayor parte del glucagón endógeno (y de insulina) se elimina de la circulación en el hígado, a diferencia de la adrenalina, el glucagón no tiene efecto sobre la fosforilasa muscular, asimismo, el glucagón estimula la gluconeogénesis a partir de los aminoácidos y del lactato. En todas estas acciones el glucagón actúa a través de la generación de AMPc. La glucogenólisis y la gluconeogénesis hepáticas contribuyen al efecto hiperglucemiante del glucagón, cuyas acciones se oponen a las de la insulina (103).

La hipófisis anterior secreta hormonas que tienden a incrementar la glucosa sanguínea, y por tanto antagonizan la acción de la insulina (104), éstas hormonas son:

Hormona del Crecimiento (GH).- La hipoglucemia estimula la secreción de la hormona del crecimiento, esta disminuye la captura de la glucosa en ciertos tejidos como el músculo, parte de este efecto podría ser indirecto ya que la hormona moviliza los ácidos grasos libres a partir del tejido adiposo, los que, por sí mismos, inhiben la utilización de la

glucosa. El suministro crónico de la hormona del crecimiento conduce a la diabetes, al producir hiperglucemia, la hormona estimula la secreción de insulina y finalmente el agotamiento de las células beta (105,106).

Glucocorticoides (11-oxiesteroides).- Los Glucocorticoides se secretan por la corteza suprarrenal y son importantes en el metabolismo de los carbohidratos, su administración incrementa la gluconeogénesis, este incremento resulta del aumento del catabolismo proteínico en los tejidos, del incremento de la captura hepática de aminoácidos y del aumento de la actividad de las aminotransferasas y otras enzimas relacionadas con la gluconeogénesis en el hígado, además los glucocorticoides inhiben la utilización de la glucosa en los tejidos extrahepáticos. En todas estas acciones los Glucocorticoides actúan como antagonistas de la insulina (107,108).

Adrenalina.- La adrenalina se secreta en la médula suprarrenal como respuesta a estímulos estresantes (miedo, excitación, hemorragia, hipoxia, hipoglucemia, etc.) y da lugar a la glucogenólisis en el hígado y en el músculo debida a la estimulación de la fosforilasa por medio de la generación de AMPc (109).

Hormona Tiroidea.- La hormona tiroidea también modifica la glucosa sanguínea, hay evidencia de la acción diabetogénica de la tiroxina así como de la inhibición del desarrollo de la diabetes como consecuencia de la tiroidectomía (110), también se ha observado la ausencia total de glucógeno en el hígado de los animales tirotóxicos. Los pacientes hipertiroideos presentan aumento de la glucosa sanguínea en ayunas, y esta disminuye en los pacientes hipotiroideos. Sin embargo, al parecer, los pacientes hipertiroideos utilizan la glucosa con una velocidad normal o mayor, en tanto que los pacientes hipotiroideos presentan una disminución de la capacidad para utilizar la glucosa y son mucho menos sensibles a la insulina que las personas sanas o hipertiroideas (111,112).

Biología Molecular de los Genes

Genes y transcripción.- Como es bien sabido, los genes contienen la información básica sobre como los seres vivos portan su identidad que va desde la concepción hasta su muerte, grandes esfuerzos y prolongadas horas de trabajo en las 3 décadas pasadas han puesto de manifiesto que la transcripción de los genes eucarióticos es un importante proceso bioquímico que esta cuidadosamente regulado a través de varios pasos. Análisis genéticos y bioquímicos de modelos orgánicos han identificado un gran número de factores protéicos responsables del control de la transcripción (113).

Las células eucarióticas portan una gran cantidad de información genética comparada con los 35 mil genes que aproximadamente contienen y, con las 6 mil a un millón de proteínas necesarias para perpetuar la vida desde las levaduras hasta los animales. Algunos de estos genes se expresan en todas las células a toda hora, y son responsables del campo común metabólico rutinario de las funciones de toda la célula, otros se expresan solo en determinadas células que se distinguen de una manera particular y otros más se expresan solamente mientras que las condiciones alrededor y en la célula cambian, como lo es la llegada de una hormona que puede dar vuelta encendiendo (o apagando) a ciertos genes de esa célula (114).

Además de todo esto, el genoma debe contener también gran cantidad de DNA cis-regulador responsable de dirigir el patrón de la expresión génica en respuesta a requerimientos metabólicos, desarrollo y estímulos externos. Para mantener dicho control, las células eucarióticas tienen una organización de DNA dentro de discretos cromosomas, cada uno empaquetado dentro de la cromatina, la unidad mínima la cual ha sido definida como el nucleosoma. Varios grados de accesibilidad a la secuencia de DNA existen dentro de la cromatina a través del ciclo celular para llevar a cabo procesos biológicos esenciales tales como la replicación del DNA, expresión génica y división celular (115). Sin embargo, la cromatina como vehículo de empaquetamiento del DNA, y como represor global de la transcripción, no es suficiente ni adecuada para explicar su papel en la expresión génica, de hecho esta claro que la cromatina es un participante activo y dinámico en la regulación de la transcripción del genoma eucariótico. Así la pregunta de cómo se regula la expresión génica en el complejo genoma eucariótico ha sido re-enfocada sobre mecanismos moleculares que han involucrado el estudio de la cromatina a través del control transcripcional (116).

Una característica definitiva que discrimina entre diferentes genes en un genoma son los sitios únicos cis-reguladores reconocidos por factores que se unen al DNA en secuencias específicas, estos reguladores deben ser capaces de dirigir la transcripción para iniciar la síntesis de RNA así como de identificar los promotores centrales específicos (117).

Iniciadores de la transcripción .- Aparte de las propiedades físicas únicas, dadas por la cromatina al templado de DNA, la primera indicación de que los mecanismos de la transcripción eucariótica podría tener divergencias significativas comparadas con los procariotes, surgió hace décadas al descubrir que las células animales empleaban 3 enzimas separadas y distintas para síntesis de RNA (118). Los análisis de genes expresados altamente y otras unidades de transcripción contenidos en tumores víricos con DNA que utilizaban la maquinaria de la célula huésped, permitieron el descubrimiento de elementos de control-cis responsables de dirigir la transcripción de genes codificadores de proteínas por medio de la RNA polimerasa II (119). Pronto se apreció que los genes eucariotes contenían un complejo de secuencias específicas de DNA que unían más comúnmente a elementos promotores centrales con diversos elementos potenciadores específicos para los genes y que juntos cooperaban en la definición específica del patrón de expresión génica (120). Debido a que la polimerasa de RNA de procariotas requería subunidades adicionales llamadas factores sigma (σ) para el reconocimiento de DNA (121), no fue sorprendente encontrar que la RNA polimerasa animal requería un gran número de accesorios para reconocer el promotor y llevar a cabo el inicio de la transcripción (122).

Las investigaciones moleculares en levaduras y *Drosophila* (mosca de la fruta) y la purificación de factores de transcripción de células de mamífero durante 10 años (1980-1990) revelaron la existencia de una gran familia de activadores específicos de secuencia (Sp1, AP-1, C/EBP, NF- κ B, GR, etc.), así como factores que servían como accesorios (TFIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF y TFIIH) necesarios para programar un complejo RNA polimerasa II funcional (123,124). La capacidad de realizar reacciones de transcripción *in vitro* puso de manifiesto múltiples pasos bioquímicos y ayudaron a establecer un orden general del ensamble de estos factores, para la formación de complejos activos de pre-iniciación *in vitro*. El desarrollo de métodos cromatográficos de afinidad al DNA y varias estrategias de clonación molecular para aislar los factores de transcripción permitieron identificar muchas secuencias de proteínas unidas a potenciadores específicos y por tanto a entender mejor la naturaleza de los mecanismos de transcripción (125). Estos estudios permitieron también la caracterización del primer factor general eucariótico: TFIID el cual se pensó que era equivalente al polipéptido identificado como una proteína de unión a la caja TATA: TBP (126,127). Sin embargo, pronto se puso de manifiesto que el TBP recombinante podía reemplazar la fracción TFIID para iniciar la transcripción basal, TBP no podía llevar a cabo la transcripción activada en respuesta a reguladores que se unían a los potenciadores (128). Subsecuentemente se purificó TFIID y se determinó que era un complejo con multi-subunidades que contenía TBP y varios otros factores o TAFs asociados a él (129). Se encontró que las subunidades TAFs de TFIID eran responsables de la transcripción basal. Estos experimentos permitieron generar una hipótesis sobre co-activadores la cual proponía que una nueva clase de moléculas, llamada co-activadores o adaptadores, eran necesarias para pasar la información conferida por los activadores unidos al DNA a la maquinaria de la RNA polimerasa II (130).

En la década pasada los análisis genéticos y bioquímicos desde la levadura hasta el hombre ayudaron a identificar la mayoría de los componentes de la maquinaria de iniciación general así como el ordenamiento continuo de co-activadores y co-represores. Estos estudios no solo han descubierto la complicada naturaleza de la transcripción eucariótica sino

que han establecido firmemente la importancia de los co-activadores como mediadores del control de la transcripción (131).

Dado que las células animales probablemente utilicen de mil a diez mil reguladores transcripcionales diferentes, no es difícil imaginar la necesidad de emplear adaptadores especializados para diferentes clases de activadores y represores que interfieran con un número limitado de blancos dentro de la transcripción general. Algunos de estos reguladores pueden tener tipos similares de dominios de activación o represión lo que muy probablemente contribuye a su alto orden de complejidad. Considerando la gran diversidad de señales moleculares que deben ser interpretadas por el aparato transcripcional parecería imposible que cada regulador sea selectivo para cada gen y que tenga un blanco diseñado único para él dentro del limitado repertorio de la transcripción general. De hecho ahora es evidente que un regulador dado pueda participar y funcionar con múltiples tipos de co-activadores o co-represores y viceversa (132).

La mayoría de los genes están regulados por una mezcla de diferentes tipos de coactivadores y represores de una forma coordinada, muchos cofactores transcripcionales son miembros de complejos con múltiples subunidades como TFIID. Estudios del complejo TFIID, incluyendo extensos análisis bioquímicos del activador TAF y de interacciones del factor TAF-basal, revelaron que diferentes clases de activadores pueden disparar distintos TAFs para efectuar la transcripción (133). Muchos reguladores de unión al DNA en secuencias específicas exhiben un patrón de expresión específico para cada tipo de célula, esto ha dado evidencia de que algunos co-reguladores transcripcionales puedan tener una expresión tejido-específica (134).

Factores de transcripción.- Hay un gran número de procesos biológicos en los que la función del DNA depende de su interacción específica con proteínas, por ejemplo el inicio y control de la expresión génica ejercidos por proteínas llamadas factores de inicio de la transcripción, o comúnmente factores de transcripción. Los factores de transcripción también son llamados "factores que actúan en trans" o "factores trans", pues sus genes están en posición alejada y no relacionada con aquella región génica cuya expresión regulan. Los factores de transcripción reconocen e interactúan con secuencias concretas del DNA, los numerosos contactos establecidos entre la proteína y el DNA son de tipo iónico, hidrofóbico y enlaces de hidrógeno, aunque todos ellos individualmente son enlaces débiles, juntos dan una interacción específica y muy fuerte entre dichas proteínas y el DNA (135).

Para obtener un máximo nivel de transcripción, la polimerasa precisa de dos secuencias básicas de control en *cis*: llamadas promotores, y de unas secuencias adicionales denominadas intensificadores, tanto las secuencias básicas como las adicionales son reconocidas por factores *trans*, que actúan como elementos de control positivo. Para que la transcripción se inicie es necesario contar con promotores adecuados, los intensificadores sirven para potenciar la tasa de transcripción producida normalmente a partir de los promotores. Promotores e intensificadores se distinguen principalmente por la distancia a la que actúan (136), los promotores funcionan junto al sitio de iniciación, mientras que los intensificadores usualmente lo pueden hacer a grandes distancias de ese punto. Se sabe que a cada promotor se puede unir un número variable de factores de transcripción, que actúan favoreciendo o dificultando la unión y actividad de la RNA polimerasa, o de otros factores de transcripción, y en consecuencia determinando la posición y eficacia del inicio de la transcripción, por lo tanto, los factores de transcripción tienen gran responsabilidad en la regulación de la transcripción al permitir que la RNA polimerasa actúe. La diversidad de los factores de transcripción es mayor que la de los promotores, lo que permite la gran flexibilidad existente en el control de la expresión de los genes, la expresión de la mayoría de los genes

eucarióticos se controla en el inicio de la transcripción, esta regulación se centra en la interacción de los promotores con los factores de transcripción (137).

Promotores.- Un promotor o secuencia promotora es una región del DNA que regula el inicio de la transcripción de un gen, y corresponde a lo que se ha denominado región reguladora del gen. Las secuencias promotoras también son llamadas "factores que actúan en cis" o "factores cis", simplemente por encontrarse en la misma molécula de DNA cuya expresión regulan. Uno de los elementos identificados como parte de los promotores eucarióticos es la secuencia o caja TATA que indica a la polimerasa de RNA que la transcripción comienza aproximadamente 30 pares de bases (pb) río abajo en los mamíferos. La secuencia TATA funciona mejor si hay dos secuencias, localizadas a unos 40 y 110 pb río arriba, respectivamente del sitio de inicio de la transcripción. La secuencia CCAAT es una de ellas, y un segmento rico en GC puede ser la otra secuencia. La secuencia TATA y las situadas río arriba de ella deben ser reconocidas por proteínas reguladoras que se unen a esos sitios y activan la transcripción, permitiendo quizás que la polimerasa de RNA se una y la inicie correctamente (138).

Intensificadores.- Los intensificadores son secuencias cis, que potencian la tasa de transcripción a partir de promotores situados en la misma molécula de DNA. Los intensificadores llevan a cabo sus efectos a distancias de hasta varios miles de pares de bases, además pueden funcionar en cualquier orientación río arriba o río abajo del promotor que potencian. En algunos aspectos, los intensificadores son similares a los promotores, ya que están organizados como una serie de secuencias cis que son reconocidos por factores trans, sin embargo, los intensificadores pueden actuar a mayores distancias que los promotores, y se sabe que los intensificadores son específicos de tejido, operando en algunos tipos celulares pero no en otros (139).

Estructura de los factores de transcripción.- Se ha descrito tanto para los factores de transcripción como para los receptores de hormonas 3 dominios principales en su estructura, Fig. 3 (140):

1. Dominio de unión al DNA.- que reconoce y se une a las secuencias de DNA que actúan en cis.
2. Dominio de transactivación.- que se encarga de activar la transcripción.
3. Dominio de unión al ligando.- dicho ligando aún no se conoce en muchos factores de transcripción, de ahí que se les llame receptores huérfanos.
4. Dominio de dimerización.- que permite a los factores transcripcionales agruparse en dímeros, sin embargo, no todos los factores lo presentan.

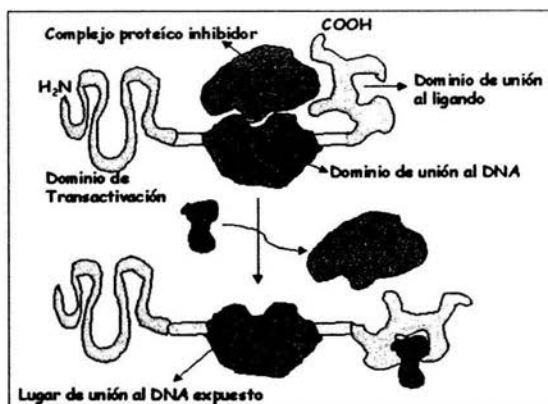


Fig. 3. Estructura de los factores de transcripción³

Motivos de unión al DNA de los factores de transcripción.- La interacción entre los dominios de unión al DNA y el mismo DNA tiene lugar con el exterior de la doble hélice, especialmente sobre el surco mayor. Una característica importante de estos motivos es que un mismo motivo puede contactar simultáneamente con varios puntos diferentes del DNA, forzando así en este una modificación conformacional que hace que secuencias lejanas puedan aproximarse. El reconocimiento entre la proteína y el DNA se ejerce a través de regiones o elementos estructurales que son solo una parte de la estructura terciaria completa de la proteína, y que se pueden encontrar, con una estructura espacial muy similar en proteínas distintas, interviniendo en una misma función en todas ellas. Estas regiones o elementos estructurales que reconocen al DNA se llaman motivos estructurales protéicos o bien dominios de unión al DNA. Los dominios o motivos de unión al DNA de los factores transcripcionales pueden clasificarse en una de varias familias estructurales, los más frecuentes son, Fig. 4 (141):

- 1.- Motivo hélice-giro-hélice
- 2.- Hélice-bucle-hélice
- 3.- Homeodominio
- 4.- Dedo de Zinc
- 5.- Cremallera de leucina

Motivo hélice-giro-hélice.- Se abrevia como HTH (helix-turn-helix), esta formado por dos segmentos peptídicos en α -hélice, de estructura rígida, separados por una secuencia de aminoácidos flexible, que permite que las dos hélices se aproximen entre sí. Una de las α -hélices (llamada hélice de reconocimiento), se encaja en el surco mayor del DNA, de forma que los residuos de aminoácidos de un lado de la hélice interaccionan mediante puentes de hidrógeno con las bases nitrogenadas expuestas en ese surco, algunos aminoácidos, situados en la cara opuesta de la misma hélice, establecen interacciones con otros de la segunda hélice, quedando la segunda α -hélice cruzada sobre la hélice de reconocimiento y situada en el exterior del DNA. Esta segunda α -hélice interacciona con otras proteínas (142).

³Alberts.; Bray.; Lewis.; Raff.; Roberts.; Watson. Biología Molecular de la célula. 3ª. Ed. 1994.

Motivo hélice-bucle-hélice.- Se abrevia como HLH (helix-loop-helix), consta también de dos segmentos de α -hélice, pero en este caso el péptido que los une es más largo, lo que le dota de mayor flexibilidad, y en consecuencia, hay más posibilidades de orientación mutua de las dos hélices, generalmente al igual que en HTH, en HLH dos motivos HLH se asocian, formándose proteínas diméricas (143).

Motivo homeodominio.- Se puede considerar como una ampliación del motivo hélice-giro-hélice (HTH), pero adquiere entidad propia al aparecer repetidamente, con idéntica estructura, en distintas proteínas, además de la disposición de dos hélices cruzadas típicas del HTH, existe un tercer tramo en α -hélice, del que sale una región sin estructura secundaria definida cuyos aminoácidos interaccionan directamente con el DNA (144).

Motivo dedo de Zinc.- Al igual que en las estructuras anteriores, es frecuente que una misma proteína posea más de un motivo, en este caso, se observan múltiples dedos de zinc consecutivos. Este es un elemento estructural formado por unos 30 aminoácidos de los cuales 2 cisteínas y 2 histidinas aparecen en posiciones constantes, coordinando tetraédricamente un ión Zn^{+2} . Esta unión obliga a un plegamiento de la cadena peptídica, de forma que el motivo se caracteriza por una conformación tridimensional alargada, en forma de "dedo", que le da el nombre (145).

Motivo Cremallera de leucina.- Se trata de una región de la proteína cuya secuencia tiene un residuo de leucina cada 7 aminoácidos, al adoptar la conformación α -helicoidal se concentran en un lado los aminoácidos hidrofóbicos, de tal manera que la leucina se repite en la misma cara cada dos vueltas de hélice (2 vueltas de 3.4 residuos aproximadamente 7 aminoácidos). Dos cadenas de este tipo pueden asociarse hidrofóticamente, intercalando sus restos de leucina como si se tratara de los dientes de una cremallera. En el otro extremo del motivo las dos α -hélices encajan en el surco mayor del DNA y presentan en la cara exterior abundantes aminoácidos básicos que interaccionan favorablemente con los fosfatos. De alguna manera, este modelo se asemeja a una "Y", en la que el tallo corresponde a la cremallera de leucina y los brazos a los tramos de las hélices que contactan con el DNA. La cremallera de leucina esta flanqueada por un dominio de unión al DNA que contiene muchos residuos de lisina y arginina, para que ocurra la unión al DNA deben formarse dímeros (146).

La siguiente figura ilustra los 5 tipos más frecuentes de motivos de unión al DNA que hay:

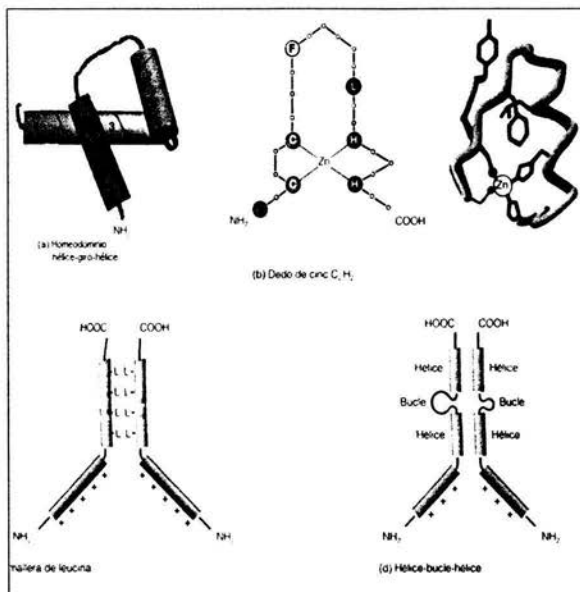


Fig. 4. Diferentes motivos de unión al DNA de los factores de transcripción ⁴

Diferentes promotores regulan diferentes genes.- En el genoma nuclear de eucariotas a partir de cada promotor solo se transcribe un gen, distintos genes en función de la RNA polimerasa, utilizan distintos tipos de secuencias promotoras, a las que se unen distintos factores de transcripción. El proceso de inicio de la transcripción en eucariotas utiliza promotores que tienen la secuencia TATA, la cual es reconocida por la RNA polimerasa indirectamente, previa interacción con los factores de transcripción (147).

Los factores de transcripción como ya se ha dicho, son necesarios para que la polimerasa de RNA inicie la transcripción, formando con ella un complejo de preiniciación. En las células de mamífero se han identificado varias proteínas que reconocen la secuencia CCAAT, la especialización de las RNA polimerasa eucarióticas para transcribir solo determinados genes viene determinada por la regulación de estos genes por secuencias promotoras y factores de transcripción diferentes, se distinguen así diferentes promotores para los genes de la clase I, clase II y clase III. Los factores de transcripción respectivos se nombran con las iniciales TF seguidas del tipo de RNA polimerasa con la que pueden actuar (I, II ó III) y una letra que los identifica (por ejemplo, TFIIA, TFIIB, TFIID son 3 factores de transcripción para la RNA polimerasa II) (148).

En la tabla siguiente se pueden ver los tipos de polimerasa que hay, y los factores que necesita para realizar sus productos génicos.

⁴ Griffiths A., Gerbart W., Miller J., Lewontin R. Genética Moderna. Ed. Interamericana. McGraw-Hill. México. 2000.

Tabla 1. Tipos de Polimerasa y factores de transcripción

Polimerasa (enzima)	Genes que transcriben (DNA)	Producto génico (RNA ó proteína)	Promotores (DNA)	Factores de transcripción
RNApol-I	"de clase I"	rRNAs: 28, 18, 5.8S	"de clase I"	TFI
RNApol-II	"de clase II"	Proteínas y snRNAs	"de clase II"	TFII
RNApol-III	"de clase III"	TRNAs, rRNA-5S.	"de clase III"	FTIII

Promotores de los genes de clase II.- La regulación de los genes de la clase II (transcritos por la RNA polimerasa) es del máximo interés por ser responsable de la síntesis de los mRNA, y por tanto, de la síntesis de todas las proteínas. Sus promotores se localizan en dirección 5' (corriente arriba) del origen de la transcripción (149).

Los promotores en general, pero de forma característica los de la clase II, se pueden dividir en 3 tipos, de acuerdo con su acción y su ubicación (150), estos son los siguientes :

1. Secuencias o elementos basales del promotor.- El promotor basal comprende las secuencias que definen el punto de inicio de la transcripción y son imprescindibles para que esta comience, es una región situada en posición adyacente al origen de transcripción, comúnmente corriente arriba hasta la posición -30, dentro de esta región se distingue la secuencia o caja TATA, también llamada caja de Hogness, situada alrededor de las posiciones -15 a -25. Otra secuencia basal frecuente es la secuencia iniciadora Inr, situada sobre el propio origen, entre -3 y +5. En cada gen pueden estar presentes ambas secuencias promotoras basales, una sola o incluso ninguna. La Fig.. 5 muestra estas secuencias (151).

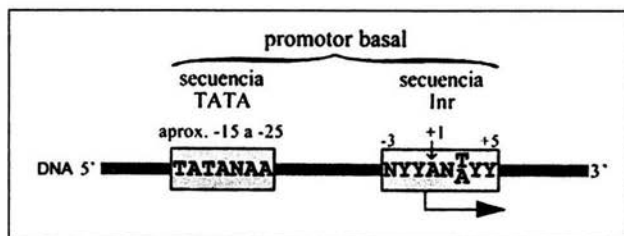


Fig. 5. Elementos basales del promotor⁵

2. Secuencias o elementos proximales.- Generalmente el promotor basal no es suficiente para provocar el inicio de la transcripción, sino que se requiere la intervención adicional de otra región conocida como promotor proximal. Esta región está cercana al promotor basal, pero más alejada, corriente arriba del origen, comúnmente entre las posiciones -30 y -200 pb. Por tanto esta región del DNA suele ser de mayor tamaño que la del promotor basal. Los elementos proximales no especifican la posición de inicio, sino que determinan la frecuencia con la que se produce el inicio de la transcripción. Ello es posible, gracias a que sobre ellos se unen diversos factores de transcripción que favorecen la

Tabla 1. Luque J., Herráez A. Biología Molecular e Ingeniería Genética. Harcourt. 2000.

⁵ Luque J., Herráez A. Biología Molecular e Ingeniería Genética. Harcourt. 2000.

interacción de la RNA polimerasa II con el DNA en el punto de inicio y su actividad enzimática. Aunque en general las secuencias son más variadas que las basales, las dos más características son la caja o secuencia CCAAT, entre -60 y -80 pb, y la caja GC, que aparece en copias múltiples y con cualquier orientación a ambos lados de la caja CAAT (152). Esto puede apreciarse en la Fig. 6.

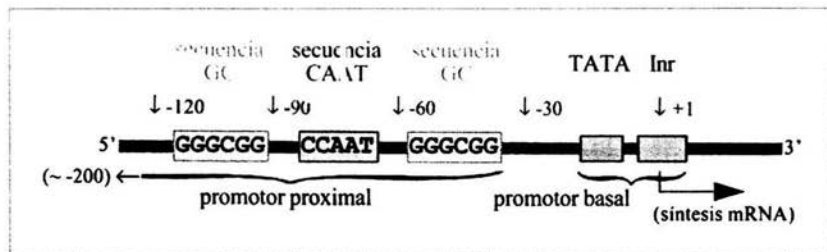


Fig. 6. Elementos proximales⁶

3. Secuencias o elementos distales.- La expresión de algunos genes sufre una regulación aún más compleja, que depende de secuencias situadas a gran distancia del punto de inicio, incluso de varios miles de pares de bases, corriente arriba o corriente abajo, esto ocurre especialmente para los genes inducibles, aquellos que no se expresan continuamente en la célula, sino cuya expresión sufre una regulación amplia y precisa como respuesta a diversas señales (como las hormonas esteroides y tiroideas) (153). Aunque no se suelen considerar como tales, estas secuencias promotoras deben considerarse como parte del gen, se les llaman secuencias promotoras distales por encontrarse alejadas del origen, estas secuencias promotoras son muy variadas y específicas para cada gen, actúan tanto activando la transcripción como reduciéndola, de acuerdo con ello, se clasifican en dos tipos (154):

- **Potenciadores.**- también llamados activadores o intensificadores, nombrados así porque pueden aumentar la velocidad de inicio de la transcripción (y por consiguiente la del proceso completo) conseguida a partir de promotores basales y proximales situados en la misma molécula del DNA (155,156).
- **Silenciadores.**- también llamados inhibidores, estos tienen el efecto opuesto, generalmente porque los factores de transcripción que se unen a ellos compiten con la acción de los promotores potenciadores y proximales (157,158). La Fig. 7 ilustra lo anterior:

⁶ Luque J., Herráez A. Biología Molecular e Ingeniería Genética. Harcourt. 2000.

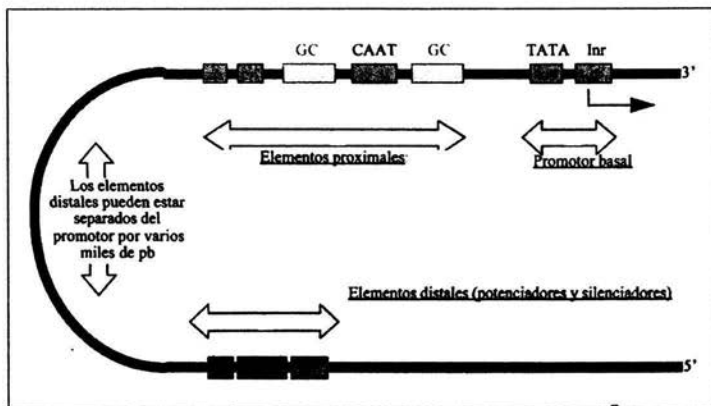


Fig. 7. Elementos proximales y distales ⁷

Factores de transcripción de clase II.- La RNA polimerasa interactúa con gran variedad de factores de transcripción dependiendo del gen y de forma simultánea con un número considerable de ellos. Estos factores se pueden clasificar en generales, proximales e inducibles, de acuerdo a su unión a uno de los 3 tipos de secuencias o elementos promotores antes descritos (159). Los factores de transcripción que aquí se describen son los que actúan sobre el promotor TATA, y que son los mejor conocidos hasta ahora.

Factores de transcripción generales.- Se llaman factores de transcripción generales aquellos factores que reconocen los elementos basales de un promotor, son proteínas muy conservadas evolutivamente, que promueven la formación alrededor del punto de inicio de un complejo plurimolecular, que incluye al promotor basal, los propios factores de transcripción generales y la RNA polimerasa-II. Se puede decir que al reconocer al promotor basal actúan de mediadores para que se fije la polimerasa, definiendo así el punto de inicio de la transcripción y activando a la enzima para que comience a sintetizar el RNA (160).

Se conocen las funciones de algunos de los factores de transcripción generales asociados a la RNA polimerasa-II, estos son:

- ❖ **TFIIA (161).- Composición:** TFIIA consiste en 2 subunidades en la levadura y 3 en los seres humanos y *Drosophila* (aunque 2 subunidades se derivan de una proteína del precursor).

Interacciones: TFIIA ata directamente a TBP y estabiliza su acomodamiento a la cadena de DNA, a través quizás, de sus propios contactos directos con el DNA. El acomodamiento de TFIIA no imposibilita la unión de TFIIIB u otros componentes del complejo de la transcripción, sin embargo, la unión de TFIIA a TBP es mutuamente exclusiva con la unión de algunas proteínas reguladoras negativas.

Funciones: Los estudios actuales indican que TFIIA actúa como contra-receptor, estabilizando a TFIIID, que bloquea los represores de la transcripción que inhiben la

⁷ Luque J., Herráez A. Biología Molecular e Ingeniería Genética. Harcourt. 2000.

unión de otros factores de la transcripción o que quitan a TBP del DNA. La actividad de la transcripción puede ser dependiente en esta función de TFIIA.

Características.- Ambas subunidades de TFIIA son extremadamente ácidas.

- ❖ TFIIB (162).- Composición de la proteína.- Es una sola subunidad, hasta la fecha todas las proteínas de TFIIB pesan de 35-40 kilodaltons.

Características.- Un dominio de dedo de Zinc en el extremo amino-terminal y una repetición directa en un dominio proteolíticamente estable del extremo carboxilo-terminal.

Interacciones.- Se enlaza directamente a TBP y a la RNA polimerasa-II, en parte lo hace a través de interacciones con una pequeña subunidad de TFIIF. Varios activadores ácidos pueden unir a TFIIB *in vitro*.

Funciones.- Estabiliza a TBP unido a la caja TATA, TFIIB es necesario para la asociación de la RNA polimerasa-II al complejo de iniciación, además se piensa que puede ser un blanco para los factores reguladores de la transcripción.

- ❖ TFIID (163,164).- el más conocido de todos ellos, es el único con especificidad por una secuencia de DNA, la de la caja TATA, a pesar de ello, parece actuar también sobre promotores que no tienen caja TATA, este factor determina que la RNA polimerasa-II actúe a una cierta distancia del promotor, definiendo el punto de inicio de la transcripción (nucleótido +1).

Características.- TFIID consiste en una subunidad que se une al DNA y que reconoce a la caja TATA y por tanto se designa como proteína TATA de unión (ó TBP), así como varios factores TBP asociados (ó TAFs). TFIID tiene un gran tamaño (PM cerca de 800 KDa), al estar formado por dos tipos de componentes:

- Una molécula de TBP ó "proteína de unión a TATA", que confiere a TFIID la capacidad de reconocimiento de la secuencia promotora, su unión a esta es el primer paso en la formación del complejo de inicio, con la particularidad de unirse al surco menor del DNA (a diferencia de la mayoría de las proteínas que se unen al surco mayor) y provoca la flexión de la molécula de DNA (165).
- Varias moléculas de factores asociados a los factores de transcripción ó "factores asociados a TBP", diferentes entre sí y que pueden variar para la unión a promotores diferentes. Son subunidades de 30 a 250 KDa que forman parte del TFIID en número de 9 a 12 típicamente (166).

TBP también interactúa con TFIIA, consiste en un dominio suficiente para la actividad, este dominio se compone de una secuencia repetida, y las repeticiones se reflejan en la simetría de la molécula. La proteína es parecida a una silla de montar, con la superficie interna entrando en contacto con la hebra de DNA (167).

Interacciones: Forma lo que es el núcleo del complejo de la transcripción, reclutando el resto de los factores con una interacción directa a TFIIB. La subunidad TBP de TFIID es suficiente para la unión a la caja TATA y para la interacción de TFIIB, apoyando la transcripción basal, sin embargo, esta reacción básica de la transcripción no responde a los activadores río arriba de la transcripción, muchos de estos factores reguladores se unen con TBP o TAFs en varios análisis *in vitro* (168).

Funciones.- Como ya se mencionó, se piensa que TFIID es uno de los iniciadores de la transcripción, TBP es un componente de los complejos de transcripción de la ARN polimerasa-I RNA, y de la RNA polimerasa-II (169).

- ❖ **TFIIE (170).**- Composición.- Esta formada por 2 subunidades, posiblemente un tetrámero que consiste en dos moléculas de cada subunidad.
Características.- La subunidad grande tiene un dominio en dedos de Zinc.
Interacciones.- TFIIE modula la helicasa y la actividad cinasa de TFIIH, pues hay interacciones entre los dos factores.
Funciones.- TFIIH recluta factores para la iniciación de la transcripción, además de modular las actividades de cinasa y de helicasa de TFIIH, también parece ser requerido para la separación de la RNA polimerasa del promotor.

- ❖ **TFIIF (171).**- Composición.- 2 subunidades (la levadura tiene una tercera proteína, no esencial asociada)
Interacciones.- TFIIF se une directamente a la RNA polimerasa-II (originalmente se aisló como una proteína de la RNA polimerasa- II). TFIIF es necesario para que la RNA polimerasa-II se asocie establemente al complejo promotor TFIIF-TFIIB.
Funciones.- TFIIB ayuda al reclutamiento de factores para el inicio del complejo de la transcripción junto con la RNA Pol II. TFIIF es un componente del complejo de la holoenzima y del mediador de la levadura, promueve la terminación de la transcripción.

- ❖ **TFIIH (172).**- Composición.- tiene 6 subunidades.
Funciones.- Es importante por su doble actividad enzimática como helicasa y como proteína cinasa, residentes en distintas subunidades. La helicasa esta implicada en la separación de las hebras del DNA en el sitio de inicio, necesaria para el acceso de la polimerasa a las bases, mientras que como cinasa fosforila el dominio C-terminal de la subunidad mayor de la RNA polimerasa-II, provocando en esta un cambio conformacional que induce el comienzo de su desplazamiento a lo largo del DNA, la separación de algunos factores de transcripción y, en definitiva, la transición entre el inicio y la elongación de la transcripción. Este factor de transcripción es también singular por intervenir en la reparación del DNA por escisión de nucleótidos.
Interacciones.- TFIIH parece ser dependiente de TFIIE para que se forme el complejo de iniciación. El siguiente esquema (Fig. 8) muestra la interacción de los factores transcripcionales con la polimerasa, también se observa la forma en que se amolda el DNA para poder interactuar con estos factores e iniciar la transcripción.

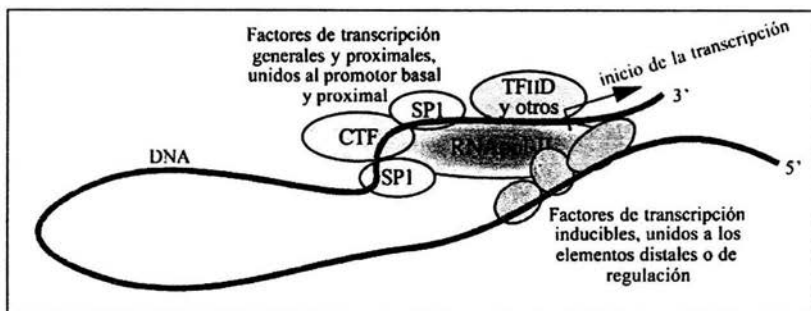


Fig. 8. Interacción de los diferentes factores transcripcionales con la polimerasa⁸

⁸ Luque J., Herráez A. Biología Molecular e Ingeniería Genética. Harcourt. 2000.

Formación del complejo de inicio de la transcripción.- Un ensamble ordenado del complejo de pre-iniciación de la transcripción fue originalmente propuesto en base a la formación de un complejo activo de transcripción *in vitro* (173). Para la formación de este complejo se han propuesto 2 mecanismos, cuyo resultado final es el mismo:

Modelo de ensamblaje consecutivo de los factores generales.- Se observó que la adición paso a paso de factores basales purificados era requerida para su unión al promotor y para iniciar la transcripción de los templados de DNA. En este modelo los pasos bioquímicos para la realización de la transcripción son los siguientes (174,175):

1. Un complejo estable formado entre TFIID, TFIIA y TFIIB (DAB), capaces de reconocer y unirse al elemento promotor TATA.
2. Un complejo cerrado más estable conteniendo DAB, RNA polimerasa-II hipofosforilada y TFIIF.
3. Un complejo abierto activado formado por la adición de los factores TFIIIE y TFIIF, el cual estimula una isomerización dependiente de ATP y su unión al promotor.
4. El despeje del promotor y la síntesis de un nuevo RNA después de la hiperfosforilación de la RNA polimerasa- II.

El siguiente esquema (Fig. 9) muestra la unión de los factores de transcripción en forma consecutiva al DNA, al final se une la RNA polimerasa para el inicio de la transcripción.

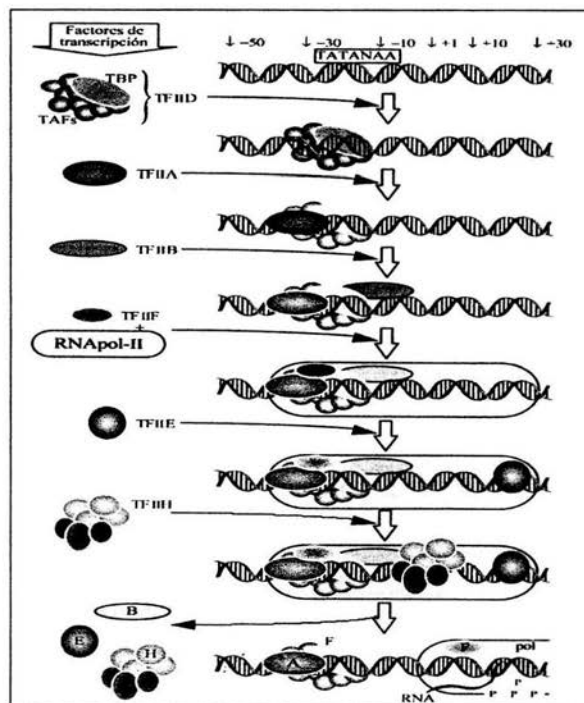


Fig. 9. Complejo de iniciación de la transcripción⁹

⁹ Luque J.; Herráez Angel. Biología Molecular e Ingeniería Genética. Harcourt. 2000.

Varios pasos bioquímicos durante la elongación de la síntesis de RNA han sido similarmente identificados con actividades enzimáticas y factores asociados al proceso de RNA acoplado a la transcripción tal como el corte y empalme (splicing), rompimiento (clivaje) y poliadenilación 3' (176,177).

Se han observado que las interacciones directas e indirectas de los activadores con los constituyentes de la maquinaria general de transcripción, afectan el rango de formación del complejo y de la transcripción (178). El ensamble escalonado del complejo de inicio de la transcripción es similar con los pasos bien definidos y observados bioquímicamente que además podrían satisfacer el requerimiento biológico por regulación dinámica. Sin embargo, se entiende que el inicio del complejo de la RAN polimerasa-II y de todos aquellos factores que participan en él, es mucho más elaborado que lo citado anteriormente pues contiene más de 40 polipéptidos comprometidos en funciones distintas que dirigen diferentes pasos y que permiten que se lleve a cabo la transcripción. Cuando estos péptidos interaccionan con cofactores para formar el centro del complejo de iniciación es necesaria una regulación activa y rápida de la transcripción, de otra forma, el ensamble que forma el complejo de iniciación podría ser extremadamente largo e ineficiente para la adecuada regulación y organización de este complejo, dentro de las escalas de tiempo necesarias para cada promotor en la célula (179).

Todo esto es apoyado por la limitada concentración celular de muchos de estos factores para el gran número de genes que pueden ser transcritos y por la modesta afinidad de unión típicamente observada entre estos componentes y el DNA blanco, particularmente en el contexto de la cromatina (180).

En resumen, lo que nos dice esta hipótesis, es que los factores de transcripción y la RNA polimerasa-II se van asociando a la región promotora en un cierto orden uno tras otro; se considera, que cada factor va estableciendo un complejo con la estructura adecuada para que se una el siguiente. La formación del complejo de iniciación comienza con la unión de TFIID al DNA en la secuencia TATA y a continuación, se van asociando los factores TFIIA y TFIIB, que permiten la unión de la polimerasa junto con el factor TFIIIF, y finalmente se incorporan TFIIIE y TFIIH (181).

A la fecha se desconoce si todas las interacciones reportadas entre reguladores, co-reguladores, y maquinaria central transcripcional sean necesariamente importantes para el ensamble de un complejo de iniciación para un promotor particular. Mientras muchas de las interacciones de alta afinidad son ciertamente importantes, es plausible que otras interacciones puedan ocurrir solamente para situaciones selectivas. Mucho más estudios serán necesarios para comprobar la veracidad de esta hipótesis (182).

Modelo de la holoenzima o de pre-ensamble.- Este es un modelo de iniciación de la transcripción opuesto al anterior, en el cual se van adicionando los factores necesarios hasta la formación completa de un pre-ensamble de RNA polimerasa-II u holoenzima. Este modelo fue propuesto cuando se observó que ciertas preparaciones de ARN polimerasa II se unían a elementos formadores de la maquinaria de inicio; que incluían co-reguladores y factores remodelantes de la cromatina tales como SWI/SNF y CBP, así como algunas proteínas implicadas en la replicación y reparación del DNA (183,184). Es considerable la heterogeneidad de este conglomerado de holoenzima para RNA Pol II pues una propiedad invariante es la ausencia de TFIID. Consecuentemente se requieren mínimamente 2 pasos claves para formar un complejo activo de preiniciación en el modelo de la holoenzima con la adición de TFIID (o un equivalente funcional) ya que esto es un prerrequisito para la transcripción. Una posible ventaja de un holo-complejo es la capacidad de obviar la limitada concentración celular de factores de transcripción individuales (185).

Un complejo polimerasa RNA pre-ensamblado podría, en principio, facilitar la respuesta a la reunión de factores que podrían cooperativamente alistar la maquinaria transcripcional, blanco de múltiples interfaces. Por otro lado, el alistamiento de holoenzimas universales monolíticas no se ajusta del todo, con las necesidades observadas para la vasta diversidad de co-reguladores en células animales, sería más favorable emplear múltiples reguladores que actuaran en diferentes estados de la transcripción, tal como un mecanismo multifacético que controlara diferentes barreras en el proceso de transcripción y por tanto proveyera una mayor flexibilidad y sintonización a la transcripción. Por el contrario un sistema que depende de la adición de un holo-complejo parecería menos efectivo en la regulación del acomodamiento o adaptación dinámica de la transcripción en respuesta a pequeñas variaciones en la concentración de factores reguladores celulares individuales (186).

El modelo de la holoenzima, llegó a presentar más desventajas cuando se consideró la evidencia bioquímica que sugiere que la elongación del complejo RNA polimerasa-II es diferente de aquella responsable del inicio de la transcripción (187). Si un holo-complejo pre-formado fuera responsable de la iniciación, entonces, presumiblemente, el complejo debería tener componentes desprendibles que podrían ser reciclados a nuevas holoenzimas, de otra manera serían sujetos a la degradación, a la síntesis de novo y al re-ensamble (188). Debido a que las polimerasas eucarióticas son sistemas enzimáticos, requerirán el reclutamiento de holoenzimas adicionales para cada promotor de cada evento de reiniciación. Tal mecanismo parece ser inconsistente con el gran número de moléculas RNA polimerasa-II relativo a otros componentes del complejo de iniciación en las células. Además, hay evidencias que parecen estar de acuerdo con una progresión en el orden de eventos remodelantes en la cromatina que temporalmente realizan los co-reguladores a partir de la maquinaria transcripcional. Este aspecto pone en duda la noción de que el complejo holoenzima inherentemente contiene todos los elementos necesarios para la remodelación de la cromatina y pone en duda también el inicio de la transcripción como un modelo pre-ensamblado (189).

En resumen en esta hipótesis alternativa, la RNA polimerasa II se asocia previamente a varios factores de transcripción, formando una enzima activa u holoenzima, que luego se une al DNA en la secuencia promotora definida por la unión del TFIID, como se observa en la Fig. 10. El resultado es el mismo complejo de iniciación que en el modelo escalonado, que permite el comienzo de la transcripción, y la polimerasa luego lo abandonaría y avanzaría igual que se ha indicado en el modelo anterior (190).



Fig. 10. Modelo escalonado del complejo de inicio de la transcripción

¹⁰Parvin J. Young R. Regulatory targets in the RNA polymerase holoenzyme. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8:565-570. 1998.

Organización del núcleo: implicaciones para la realización de la transcripción.-

Esta bien documentado que el núcleo contiene una malla fibrosa, visible y consistente de ribonucleoproteínas, actinas y otras proteínas aún no caracterizadas, esta matriz nuclear es responsable del citoesqueleto, para la integridad y función celular. Se estableció recientemente que los cromosomas individuales están organizados en territorios que se condensan y descondensan en cada ciclo celular (191), además parece que los genes activos transcripcionalmente están generalmente orientados hacia el centro del núcleo dentro de los cromosomas individuales, mientras que los genes silenciosos están ubicados cerca de la periferia del núcleo (192), también hay evidencia que sugiere que la eucromatina esta más estrechamente asociada con estructuras del complejo poro nuclear que extendida dentro del espacio nuclear, mientras que la heterocromatina esta ubicada en sitios distales a los poros (193).

Aunque en la metafase la cromatina esta altamente condensada, en la interfase la cromatina esta variablemente descondensada incluyendo la presencia de asas de fibras de 30 nm con la matriz o con sitios referidos como MARs o SARs, estas nucleasas, frecuentemente ricas en AT pueden estar separadas por decenas o cientos de kilobases y pueden rodear grupos de elementos cis-reguladores (194). Algunos elementos reguladores sugeridos son SARs/MARs propuestos como aisladores por sus regiones transcripcionalmente activas separadas de la cromatina a partir de regiones heterocromáticas silenciosas (195), estos y otros elementos similares reguladores y los factores asociados a la matriz nuclear o cromatina pueden servir para proteger y promover una apertura o dominio cromático accesible, el cual podría ser importante en la regulación de la transcripción tejido-específica de la célula. Tomando en cuenta lo anterior, estos estudios concuerdan con la noción de que los genes competentes transcripcionalmente podrían estar localizados en áreas específicas del núcleo (196).

Una de las manifestaciones más relevantes de un compartimento nuclear funcional para la transcripción es el nucleólo, donde la síntesis de RNAr y la biogénesis de los ribosomas tiene lugar. Los grupos de genes precursores de RNAr formados en tandém a partir de varios sitios cromosomales, llegan a estar asociados con la maquinaria de RNA polimerasa-I y el aparato procesador de ARNr para formar el nucleólo (197,198). Otros tipos de dominios altamente ordenados moduladores del ciclo celular se han observado, estos incluyen grupos de gránulos de intercromatina, cuerpos Cajal, cuerpos PML o PODs (199). Estos compartimentos nucleares potenciales se han asociado con varios factores de transcripción, co-reguladores, RNA polimerasas y factores procesadores de RNA. El significado funcional de estos cuerpos permanece desconocido, tal vez ellos podrían representar centros activos enzimáticos, o alternativamente, reservorios transcripcionalmente inertes para factores destinados a la degradación o reciclaje. Algunos factores de procesamiento o de transcripción parecen estar asociados con regiones reconocidas selectivamente (200), desafortunadamente la ubicación de algunos importantes factores reguladores identificados recientemente no se ha determinado y los constituyentes moleculares de estos sitios permanecen sin conocerse, no obstante hay evidencia que sugiere que la transcripción de algunos genes de ribonucleoproteínas co-localizados ocurre en un compartimento perinucleolar, mientras que la transcripción de otros genes ribonucleoproteínas es realizada dentro de áreas nucleares (201). Además hay reportes de que la transcripción activa de RNA polimerasa II ocurre en unas cuantas regiones discretas en el núcleo aislado como fue visualizado por inmunofluorescencia y microscopía cofocal tri-dimensional (202,203). Se ha sugerido que estas regiones representan unidades de transcripción individual, considerando estas observaciones, se especula que estas regiones pueden estar en una red

de centros activos organizados para ayudar directamente al complejo proceso de regulación inherente a la activación transcripcional (204).

Si hay una organización sistemática para el núcleo, los cromosomas deberían estar acomodados para el ajuste o adaptación diferencial del patrón temporal y tejido-específico celular de la expresión de genes. Los represores secuencia-específicos y sus co-reguladores asociados probablemente tienen un relevante papel en la organización del patrón de expresión génica, por ejemplo los reguladores transcripcionales linfocito-específicos: Ikaros, Helios y Aiolos interactúan con complejos HDAC y están asociados con algunos genes blanco en la heterocromatina pericéntrica (205,206). Aunque el reclutamiento de genes para un espacio transcripcionalmente inactivo dentro de los cromosomas parece tangible, la organización nuclear tal vez es directamente influenciada y tal vez participa en el reclutamiento de genes para activar centros de transcripción, por ejemplo los sitios observados para la transcripción por polimerasa-II podrían representar compartimentos en los cuales los genes pueden ser activamente reclutados vía movilización directa de la matriz nuclear (207).

Los Factores de Transcripción y su relación con la Diabetes

Historia genética de la diabetes mellitus tipo 2 .- En la tabla 2 se indica una breve historia del estudio de las bases genéticas de la diabetes, actualizada al año 2002.

Año	Suceso
1960s	Asociación de la insulina con diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2
1970s	locus HLA y diabetes tipo 1
1977	Clonación del cDNA de insulina de rata
1979	Clonación de los genes de insulina de rata
1980	Clonación del gen de insulina humana
1981	Identificación de la región 5' que flanquea el gen de insulina humana
1985	Clonación del gen transportador de glucosa y del gen receptor de insulina
1989	Clonación del gen de la glucocinasa de hígado de rata
1991	Mapeo de microsatélites MODY 1 en el cromosoma 20q de una familia
1992	Aislamiento del gen de glucocinasa humana y mapeo en el cromosoma 7p de diabetes de herencia materna asociada con mutaciones mitocondriales
1993	Asociación de la glucocinasa a MODY 2
1994	Investigaciones del genoma para la diabetes tipo 1
1995	Mapeo del locus de MODY 3 en el cromosoma 12q
1996	Investigaciones del genoma para la diabetes tipo 2
1997	Los genes de MODY 1 y MODY 3 son identificados
1998	Los genes de Mody 4 y Mody 5 son identificados
1999	Los genes de Mody 6 son identificados
2000	Realización del Proyecto Genoma Humano
2001	Realización del Proyecto Genoma Humano.
2002	Secuenciación completa del Proyecto Genoma Humano

Tabla 2. Historia molecular de la diabetes

Genes y Diabetes.- Como se sabe la diabetes tipo 2 resulta de la interacción entre factores ambientales y genéticos, los genes juegan un importante papel en el desarrollo de la diabetes (208), una evidencia de que la enfermedad tiene factores genéticos es la existencia de agregación familiar, pero la evidencia más convincente de las bases genéticas provienen de estudios en gemelos, los rangos de concordancia para la diabetes mellitus en gemelos idénticos son del 50–90%, mucho mayor que entre gemelos no idénticos de edad similar. Aunque los estudios en gemelos indican una susceptibilidad genética para la diabetes mellitus tipo 2, dichos estudios no proveen información de si esta enfermedad es causada por uno o por varios genes (209,210).

Otra evidencia de la importancia de los determinantes genéticos se manifiesta en los estudios de poblaciones con diferente fondo genético que viven en ambientes similares, la prevalencia de la diabetes mellitus tipo 2 en diferentes grupos étnicos que viven en la misma comunidad varía considerablemente, las mayores diferencias fueron primeramente descritas entre diferentes grupos étnicos que residían en Hawai, después se demostraron diferencias en la prevalencia en muchos lugares y entre diversas poblaciones que incluyeron asiáticos, indúes, chinos y gente originaria de malasia que vivía en singapur, asiáticos, indios y europeos que vivían en gran bretaña, así como diferentes grupos étnicos en los Estados Unidos. Existe evidencia molecular que sugiere que distintos genes o diversas combinaciones de estos genes pueden dar como resultado un mismo fenotipo diabético, y que estos genes son distintos entre distintas poblaciones y aún entre distintas familias de una misma población (211,212).

Otras certezas más de la importancia de la susceptibilidad genética provienen del estudio de marcadores genéticos, pues se han descrito las asociaciones entre la diabetes mellitus tipo 2 y varios marcadores genéticos localizados sobre diferentes cromosomas, estas asociaciones varían de población a población, tales marcadores sirven como indicadores de la existencia de una mezcla genética. La asociación de la diabetes mellitus tipo 2 con estos marcadores (los cuales no están ligados genéticamente con la enfermedad) indica que los niveles de susceptibilidad para la diabetes mellitus tipo 2 varían de acuerdo a diferentes genes dentro de diferentes poblaciones (213).

Aunque la evidencia de que la susceptibilidad para la diabetes tipo 2 esta genéticamente determinada, los genes específicos aún no han sido identificados, a pesar de muchos intentos los estudios de asociación con genes candidato potenciales, no han proveído una evidencia clara de los determinantes genéticos (214). La diabetes de inicio temprano es en muchos casos el resultado de mutaciones en un solo gen (215), sin embargo, pocos genes se han identificado como predisponentes a este tipo de diabetes, ninguno de los genes identificados hasta hoy (HNF-4 α , glucocinasa, HNF-1 α , IPF, HNF-1 β , BETA2/NEUROD1) han sido implicados en la patogénesis de la diabetes mellitus tipo 2 típica. La ubicación de los genes relacionados con la diabetes mellitus tipo 2 se ha logrado mediante estudios de ligamiento genético, así se han identificado genes sobre el cromosoma 2 y 15 en la población méxico-americana residente en texas, sobre el cromosoma 11, cromosoma 1 y cromosoma 7 en indios Pima, y sobre el cromosoma 20 en población finlandesa (216, 217,218).

El reconocimiento de la participación de 5 factores transcripcionales como HNF-4 α , HNF-1 α , IPF, HNF-1 β , BETA2/NEUROD1 causantes de diabetes tipo MODY y de otros factores transcripcionales pancreáticos como posibles diabetogenes, es muy importante, pues es bien sabido que si un factor transcripcional es afectado en su función por una mutación, la expresión de los genes que regula también será afectada, creándose condiciones favorables para la aparición de hiperglucemia. El reconocimiento de estos genes hace suponer, que estos u otros factores de transcripción, así como mutaciones en las regiones promotoras de distintos

genes involucrados en la homeostasis de la glucosa pudieran explicar, al menos parcialmente el componente genético de la diabetes tipo 2 del adulto (219).

El hecho por el cual la diabetes mellitus tipo 2 es genéticamente heterogénea es incierto, por tanto la realización de estudios genómicos en diversas poblaciones nos darán una indicación de la importancia y diversidad de la susceptibilidad genética, y solo cuando los genes específicos hayan sido identificados, y sus grados de asociación y fuerza con estas variantes en diferentes poblaciones sean conocidos, llegaremos a entender de una forma más clara la heterogeneidad genética de la diabetes. Los resultados de los estudios de ligamiento genético sugieren que varios genes están muy probablemente implicados como causantes de la diabetes mellitus y que su importancia diferirá entre las poblaciones en las que se encuentren presentes, pero aunque la susceptibilidad genética parece ser un prerrequisito para el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2, la última expresión de la enfermedad es determinada grandemente por los factores ambientales (220).

Genes determinados como causantes de diabetes mellitus de inicio temprano.

Diabetes tipo MODY.- Como ya ha sido mencionado, la diabetes tipo MODY es una forma de diabetes de comienzo tardío que se presenta en los jóvenes, causada por defectos monogenéticos en la función de la célula beta (con defectos mínimos o nulos en la acción de la insulina), por tener un patrón de herencia autosómico dominante con alta penetrancia y por presentarse a una edad temprana (generalmente antes de los 30 años) (221,222).

Los estudios epidemiológicos sugieren que del 2-5% de pacientes con diabetes tipo 2 pueden ser tipo MODY (223), variando la frecuencia de mutaciones en los distintos factores transcripcionales, así por ejemplo en un estudio realizado en población francesa se encontró que el 63% de las familias tenían mutaciones en el gen de la glucocinasa (MODY 2), el 21% tenían mutaciones en el gen HNF-1 α (subtipo MODY 3), y el 16% de estas familias pertenecían a loci MODY aún no conocidos (224). Por el contrario, Fraylin y cols. encontraron que mutaciones en HNF-1 α tienen alta prevalencia (73%), comparada con mutaciones en el gen de la glucocinasa (12%) en niños británicos, sugiriendo ser el resultado de diferencias en el fondo genético de las dos poblaciones (225).

Los genes MODY han permitido la identificación de mutaciones en 5 factores de transcripción, todos ellos reguladores positivos del gen de la insulina. Los HNFs son proteínas nucleares, inicialmente encontradas por expresarse en el hígado (226), son bien conocidos por modular la expresión de muchos genes hepáticos, tales como la albúmina y ApoC3, pero su papel en los islotes pancreáticos y en el riñón era desconocido hasta hace poco tiempo, ahora se sabe que los factores nucleares hepatocíticos (HNFs) tienen un papel central en la regulación y expresión de genes en hígado y riñón, sugiriendo que los pacientes con diabetes tipo MODY debidas a mutaciones en HNF-1 α , HNF-1 β o HNF-4 α pueden presentar anomalías en el hígado o en la función del riñón (227). Los genes blanco de los factores de transcripción en animales han demostrado recientemente que muchos de estos factores nucleares expresados en el hígado tienen un papel clave en el desarrollo fetal y estudios clínicos han mostrado que las mutaciones en estos genes están asociadas con una función anormal de las células β pancreáticas (228), resultando en defectos secretorios de insulina e indicando que la causa de la diabetes de inicio temprano comprende desordenes genéticos primarios de la célula-beta. Sin embargo, con excepción del gen de la insulina cuya expresión se limita a las células beta-adultas, la glucocinasa, los factores nucleares hepatocíticos (HNFs) y el factor promotor de insulina (IPF), se expresan en otros tejidos, sugiriendo que mutaciones en estos genes pueden tener diversas consecuencias fisiológicas (229).

Los genes muy probablemente determinan el tiempo y la calidad en que pueden funcionar las células β a lo largo de la vida, por ejemplo la mayoría de los defectos genéticos de la diabetes MODY a menudo no se manifiestan hasta la edad media de la vida (230). Con toda seguridad hay muchos otros genes aún no conocidos que limitan la capacidad de la masa de células β para compensar la resistencia a la insulina durante décadas, y aún llevar a una reducción en la masa de células β , todo empeora ante las cargas que pone el estilo de vida occidental tales como abundante comida y falta de ejercicio. Una vez que la hiperglucemia se desarrolla, la toxicidad de la glucosa puede producir más compromiso de la función de las células β y el empeoramiento de la resistencia a la insulina (231).

Varios genes candidato para diabetes tipo MODY han sido propuestos como causantes de esta enfermedad, ya que en muchas familias dichos genes no cosegregan con marcadores ligados a los 5 loci conocidos hasta ahora, además se estima que aproximadamente un 25% de casos MODY son debidos a mutaciones en genes aún no conocidos (232).

A continuación se describen los 5 factores de transcripción involucrados en la diabetes mellitus tipo MODY:

HNF-4 α (MODY 1).- Es un factor de transcripción de la superfamilia de receptores nucleares de hormonas esteroideas/tiroideas, localizado en el cromosoma 20 en el humano y en el cromosoma 2 en el ratón, tiene 6 dominios entre los que se encuentra el dominio de unión al DNA con una estructura del tipo dedos de Zinc, y el dominio de unión al ligando ubicado en el extremo carboxilo-terminal. En el hombre existen 6 isoformas de HNF4 llamadas $\alpha 1$ a $\alpha 6$, las cuales son obtenidas por las formas alternas de un transcrito primario, las isoformas humanas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ presentan cerca del 96% de similitud en la secuencia de los aminoácidos con las isoformas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la rata y el ratón. En los vertebrados HNF4 tiene un papel importante durante la formación del endodermo extraembrionario y en la determinación de funciones hepáticas e intestinales. En el ratón HNF-4 α , los ARNm de HNF4 se observan durante el estadio del día 4.5 en el endodermo primario del blastocisto y en el estadio del día 5.5 en las células del endodermo visceral. La primera aparición de HNF4 en los tejidos embrionarios es detectada en el estadio del día 8.5 en el hígado y en el intestino primitivo. La inactivación de HNF4 provoca severas perturbaciones en el desarrollo de la gastrulación que conducen a la muerte del embrión del ratón en el día 10.5 embrionario. HNF4 está involucrado en la homeostasis de la glucosa y es requerido también para la función normal de las células β , las mutaciones en el gen HNF-4 α se asocian a diabetes tipo MODY 1 (233,234).

En el adulto HNF-4 α se expresa en hígado, riñón, intestino e islotes pancreáticos, en intestino HNF4 se expresa tempranamente y tiene un papel relevante en la diferenciación de las células de éste órgano, los RNAm de HNF4 son detectados en el día 15 en el epitelio intestinal, sin embargo, el papel de HNF4 en la diferenciación intestinal, no está bien documentado. HNF-4 α actúa río-arriba como un regulador transcripcional positivo de la expresión de HNF-1 α y de genes involucrados en el metabolismo de la glucosa como el GLUT2, la aldolasa B, la gliceraldehído 3-fosfato-deshidrogenasa y la piruvato cinasa (235), además de otros genes involucrados en el metabolismo de los ácidos grasos. Se ha demostrado que las apolipoproteínas son generalmente sintetizadas en el hígado y liberadas en la circulación sanguínea cuando se asocian con los lípidos para formar lipoproteínas, HNF4 es un regulador importante de la expresión positiva de varios genes de apolipoproteínas, pues se une y activa a los promotores de CIII, apoB, apo AI, apoAII y apoAIV, además también se ha mostrado que ácidos grasos de cadena larga modulan directamente la actividad transcripcional de HNF-4 α al unirse como tioésteres-acil/CoA al dominio de unión al ligando de HNF-4 α , esta unión da como resultado la activación o la inhibición de la actividad

transcripcional de HNF-4 α como una función de la cadena larga y el grado de saturación de los ligandos grasos acil-CoA (236).

La expresión nula de HNF-4 α en ratones knockout resulta en muerte embrionaria, mientras que en los ratones heterocigotos se observa un fenotipo aparentemente normal. En el humano, mutaciones heterocigotas en este gen resultan en el fenotipo MODY, a la fecha se han descrito 9 mutaciones ubicadas en los exones 4, 7 y 9 que comprometen la función de los dominios de unión al DNA, de transactivación o bien de unión al ligando, Fig. 11 (237).

Los pacientes con alteraciones en HNF-4 α exhiben una función de células α anormal, lo que implica que esa forma de diabetes pueda ser caracterizada por una función defectuosa en más de un tipo de células de los islotes pancreáticos, se ha observado que la diabetes por alteraciones en el gen HNF-4 α puede asociarse a altos niveles de lipoproteínas en el suero (238).

Mutaciones en HNF-4 α aparecen en menos del 10% de los pacientes MODY, el tipo de diabetes que genera se caracteriza por un defecto en la secreción de la insulina inducida por la glucosa, esto es debido a una disfunción de las células β . Estudios a la fecha han puesto en evidencia 20 mutaciones en el gen HNF4 asociadas con MODY 1, algunas de estas mutaciones se ilustran en la Fig. 11 (239).

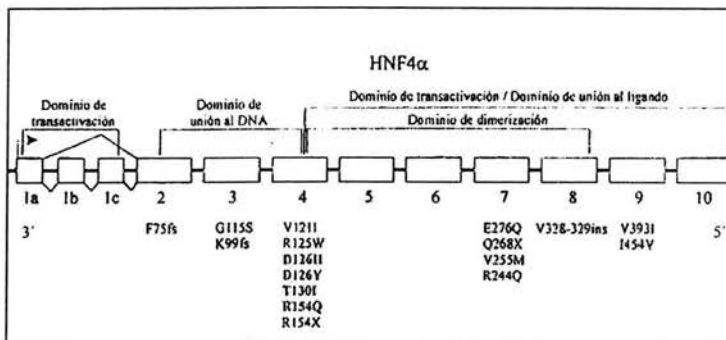


Fig. 11. Mutaciones encontradas en el gen HNF-4 α ¹¹

HNF-1 α (MODY 3).- Es un factor de transcripción de tipo homeodominio perteneciente a la superfamilia de receptores nucleares, formado por 10 exones que abarcan una región de 23 Kb comparte³ un 58% de identidad con el gen HNF-1 β , se expresa en las⁵ células endocrinas y exócrinas de hígado, intestino, riñón y páncreas donde regula la expresión de varios genes. El promotor necesario para la transcripción del gen HNF-1 α de rata, abarca un segmento de 43 pb localizada de 40-82 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción, hay un 95% de identidad entre la secuencia del promotor de humano, rata y ratón, sugiriendo que están regulados de una manera similar (240).

HNF-1 α es muy importante en la modulación del crecimiento de células β pancreáticas al regular la expresión del factor mayor de crecimiento de células β y de genes como el de la

¹¹ LeRoit Derek, Taylor Simeon, Olefsky Jerrold. Diabetes Mellitus and fundamental clinical text, 2a. Edición, Edit. Lippincott Williams y Wilkins. U.S.A. 2000.

Insulina y Glut2. HNF-1 α se ha detectado en células epiteliales pancreáticas en el día 10.5 embrionario, en las células endocrinas-hormona-positivas y en las células amilasa-positiva se expresa en el día 15.5 embrionario. La mayoría de las células positivas a pdx-1, Isl-1 y Pax-6 mostraron una coexpresión de HNF-1 α , estos factores se unen al DNA como homodímeros o heterodímeros, los cuales son estabilizados por el factor de dimerización PDCB/DcoH. En otras palabras la proteína HNF-1 α funcional es un dímero, el cual es capaz de homodimerizar o heterodimerizar con HNF-1 β . Hay 3 dominios funcionales (241):

- Un dominio de dimerización amino-terminal (aminoácidos 1-32).
- Un dominio de unión al DNA, tipo homeodominio (aminoácidos 150 - 280).
- Un dominio de transactivación en el extremo carboxilo-terminal (aminoácidos 281-631).

La dimerización de HNF-1 α es esencial para su unión al DNA, los pacientes con mutaciones en cualquiera de estos dominios podrían tener una disminución en la suma de la función del gen HNF-1 α a través de haploinsuficiencia (pérdida de función) o por un efecto dominante negativo. Las mutaciones por pérdida de la función incluyen mutaciones en el dominio de dimerización, mutaciones en el promotor lo cual da como resultado una expresión disminuida, y mutaciones en el marco de lectura los cuales generan proteínas truncadas que son inestables y que se degradan rápidamente. Las proteínas mutantes con dominios de dimerización intactos pero incapaces de unirse al DNA pueden formar dímeros no productivos con proteínas silvestres (wild-type), por lo tanto inhiben la actividad de la silvestre funcionando como mutaciones dominantes negativas (242).

Se ha encontrado que mutaciones heterocigotas en el gen que codifica a HNF-1 α causa daño a nivel de secreción de la insulina y por tanto diabetes, la diabetes que genera es una diabetes severa, con hiperglucemias altas de difícil control, requieren frecuentemente tratamiento con insulina (243), las complicaciones crónicas que genera están presentes en el 40% de los pacientes siendo la principal complicación las nefropatías, pues HNF-1 α también se expresa en el riñón y se ha observado que defectos en la resorción renal de glucosa, fosfatos y aminoácidos se asocian frecuentemente con defectos en la células β pancreática en pacientes MODY 3 (244).

Los ratones knockout heterocigotos carentes de una copia de HNF-1 α tienen un fenotipo normal, y los ratones con delección homocigota para HNF-1 α tienen una disminución en la respuesta secretoria de insulina estimulada por glucosa y desarrollan diabetes, mientras que todos los pacientes con MODY 3 tienen mutaciones heterocigotas y expresan todos ellos el fenotipo diabético. Se ha visto que el ratón que carece completamente del gen HNF-1 α tiene una gran disfunción en el hígado y en el túbulo proximal renal, que incluye una glucosuria masiva y fenilcetonuria (245,246).

En pacientes MODY se han descrito más de 90 mutaciones en el gen HNF-1 α distribuidos en los 10 exones del gen, Fig. 12, estas mutaciones comprometen la función de los dominios de unión al DNA, de transactivación o de dimerización, la pérdida parcial resulta en un defecto secretorio de insulina. Mutaciones en HNF-1 α se identificaron en pacientes afro-americanos, japoneses y caucásicos (247).

Se ha visto que la diabetes causada por alteraciones en el gen HNF-1 α puede exhibir una disminución en el umbral renal de la glucosa dando como resultado glucosuria, en presencia de niveles normales de glucosa sanguínea, lo que indica que la función del riñón puede estar alterada en esta forma de diabetes (248).

Las mutaciones en HNF-1 α explican del 2-5% de los casos de diabetes además son las más prevalentes ya que aparecen en más del 50% de los pacientes con diabetes de inicio

temprano (MODY) de distintas poblaciones, como alemania, japon, reino unido y escandinavia (249,250).

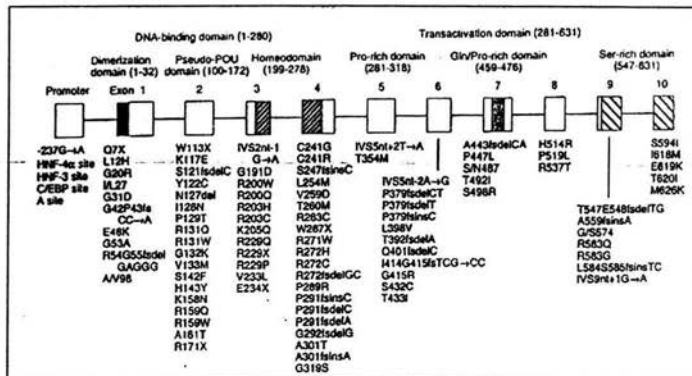


Fig.12 Mutaciones encontradas en el gen HNF-1α¹²

IPF-1 (MODY 4).- El factor promotor de la insulina (ipf) también es llamado idx (islet duodenum homebox-1); pdx-1 ó stf-1, fue aislado de la proteína homóloga X/Hbox8 de *Xenopus*, esta proteína es miembro de la familia de factores de transcripción de tipo homeodominio HLH, se expresa en el endodermo del embrión y es esencial para el desarrollo normal del páncreas endocrino y exócrino, tal como se ha evidenciado en la agénesis del páncreas. Se ha sugerido que IPF-1 es un gen maestro que controla el desarrollo del páncreas (251).

Este gen está involucrado en la regulación transcripcional de varios genes tejido-específico del páncreas endocrino como GLUT-2, insulina y glucocinasa en genes de células-β, de somatostatina en genes de células-δ y polipéptido amiloide en genes de células-γ, el factor IPF-1 es necesario en células β para la expresión eficiente de insulina en respuesta a la glucosa, se ha mostrado su unión a secuencias que controlan la expresión de la insulina en células β intactas (252).

Se ha mostrado que Pdx-1 se une con una región de los genes de polipéptido amiloide pancreático, Pax4, y glucocinasa para la regulación del gen de la insulina, por el contrario Pdx-1 no solo regula la transcripción génica de insulina, sino que participa en la regulación y desarrollo del páncreas indicando que tanto pdx-1, Beta2, Pax6 y Nkx2.2 son factores de transcripción que regulan la expresión de genes selectivamente expresados en las células β de los islotes (253).

Se sabe que el desarrollo del páncreas se ve abolido en ratones mutantes homocigotos pdx, por lo que el ratón con esta delección muere en el período postnatal, este ratón mutante desarrolla una diabetes de inicio tardío, la cual puede ser causada por una disminución de aproximadamente el 40% del número de las células β, en contraste con el número de las células α que se ve incrementado en un 23% (254).

¹² LeRoit Derek, Taylor Simeon, Olefsky Jerrold. Diabetes Mellitus and fundamental clinical text, 2a. Edición, Edit. Lippincott Williams y Wilkins. U.S.A. 2000.

Mutaciones heterocigotas en *Ipf-1* son causa genética de hiperglucemia y desarrollo de diabetes mellitus o intolerancia a la glucosa, la expresión de GLUT2 también se ve disminuida aunque en menor grado. La diabetes tipo MODY 4 ha sido asociada con mutaciones en el gen *pdx-1* humano, Fig. 13. Esta mutación resulta de un codón de paro prematuro y una proteína que carece de un dominio que es crucial para la unión del DNA, la importancia de *pdx-1* en el desarrollo del páncreas primario y en la diferenciación de células β ha sido bien reconocida (255).

El fenotipo de los sujetos que son heterocigotos para esta mutación va desde una glucosa normal, intolerancia a la glucosa o diabetes tipo 2. Se reportó el caso de un niño con una mutación homocigota para este gen, quien nació con agénesis pancreática y tuvo desde diabetes hasta insuficiencia pancreática exócrina. De hecho la proteína IPF-1 que contiene el homeodominio es crucialmente requerida para el desarrollo embrionario de los islotes pancreáticos así como para la regulación transcripcional de genes tejido específicos del páncreas endocrino de adultos, tales como la insulina, GLUT2 (256), genes de la glucocinasa en las células β y genes de la somatostatina en células δ . IPF-1 es normalmente expresado en todas las células de los islotes pancreáticos, y su ausencia en ratones altera el desarrollo de los islotes (257).

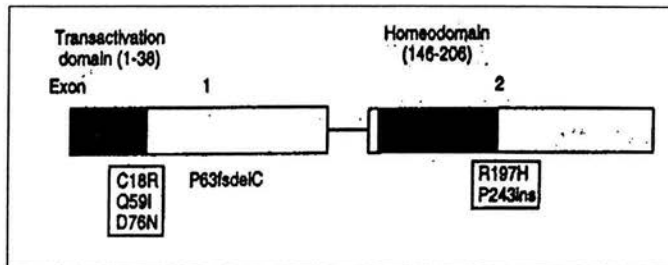


Fig. 13. Mutaciones encontradas en el gen IPF

HNF-1 β (MODY 5).- Es un factor de transcripción de tipo homeodominio, que comparte un 58% de identidad con HNF-1 α , se expresa en hígado, intestino, riñón y páncreas donde regula la expresión de múltiples genes, incluyendo el gen de la insulina. Estos factores se unen al DNA como homodímeros o heterodímeros, los cuales son estabilizados por el cofactor de dimerización (PDCB/DcoH). Mutaciones en este gen se han descrito en pocas familias con diabetes tipo MODY, las mutaciones en HNF-1 β se asocian con diabetes y enfermedad severa del riñón, la enfermedad policística de riñón y anomalías histológicas particulares mostrando meganefronas, estuvieron presentes en algunos pacientes, sugiriendo que este gen podría tener un papel mayor en el desarrollo del riñón y la diferenciación de la nefrona. HNF-1 β y HNF-1 α forman heterodímeros para unirse al DNA (258). La Fig. 14 muestra las mutaciones encontradas en este gen.

¹³ LeRoit Derek, Taylor Simeon, Olefsky Jerrold. Diabetes Mellitus and fundamental clinical text, 2a. Edición, Edit. Lippincott Williams y Wilkins. U.S.A. 2000.

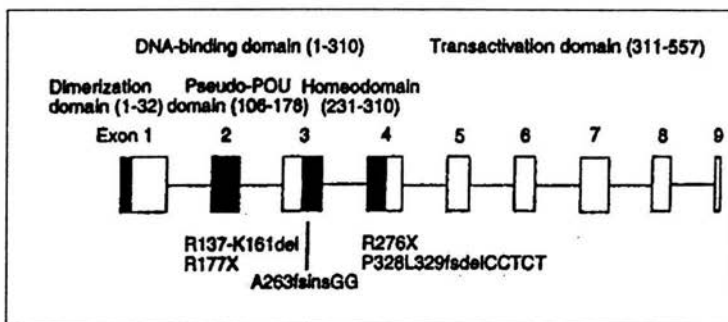


Fig. 14. Mutaciones encontradas en el gen HNF-1 β (MODY 5)

BETA2/ NEUROD1 (MODY 6).- Pertenece a la familia hélice-asa-hélice (HLH), fue aislado de células de insulinoma de hámster, este mismo gen también fue clonado como NEURO-D1, a partir de células madre embrionarias e identificado en neuronas postmitóticas durante el desarrollo neuronal. Consta de 2 exones y se encuentra en el sistema nervioso central, intestino y páncreas, tiene un papel clave durante el desarrollo embrionario, en la diferenciación celular, y en la formación y función normal del páncreas endocrino, al ser un regulador positivo de la transcripción del gen de la insulina (259).

BETA2 está presente desde las primeras etapas de desarrollo de las células pancreáticas, la mayoría de las células beta2-positivas coexpresan glucagón, sugiriendo que BETA2 esta presente en las células precursoras de los islotes primarios. La expresión de BETA2 solo se da en células endocrinas del páncreas, sugiriendo que este factor tiene un papel importante en la regulación y diferenciación de las células islóticas (260).

En el páncreas adulto BETA2 se expresa principalmente en células β aunque hay una expresión débil en células no- β , es decir en células α productoras de glucagón y células γ productoras de polipéptido pancreático, pero no se expresan en células δ productoras de somatostatina, además del páncreas, BETA2 también se expresa en células endocrinas intestinales, la pituitaria, la retina y el cerebro. Mutaciones heterocigotas encontradas en el gen que codifica este factor de transcripción se asocian a una forma monogénica de diabetes. Recientemente se han identificado 2 distintas mutaciones en este gen en pacientes con diabetes tipo 2 en adultos, Malecki y cols. encontraron dos mutaciones heterocigotas en este gen (R111L y H206fsinsC) que cosegregaron en 2 familias de diabetes tipo MODY (261).

Los ratones con delección homocigota para BETA2/NeuroD1, nacen con una marcada displasia de las células β y falla severa del páncreas endocrino, desarrollan hiperglucemia, diabetes y mueren en el período postnatal por deshidratación, mientras que los ratones heterocigotos muestran una reducción importante en el número y distribución de las células β , morfología del islote alterada y defectos neuromotores (262).

¹⁴ LeRoit Derek, Taylor Simeon, Olefsky Jerrold. Diabetes Mellitus and fundamental clinical text, 2a. Edición, Edit. Lippincott Williams y Wilkins. U.S.A. 2000.

Variabilidad genética en genes MODY.- Una de las razones originales para el estudio de genes asociados con la diabetes tipo MODY, era la posibilidad de que la identificación de estos genes pudieran proveer marcadores genéticos para la diabetes mellitus tipo 2. La hipótesis planteada era que las mutaciones que causarían una severa alteración en la función de los genes podrían estar asociadas con diabetes MODY, mientras que aquellas mutaciones que solo tuvieran un pequeño efecto en la función de los genes contribuirían al desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2. Recientes estudios han indicado que las variaciones asociadas a genes MODY en una misma población pueden estar asociadas con incremento en el riesgo de padecer diabetes mellitus tipo 2 (263).

Los genes MODY conocidos han sido identificados por mutaciones en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, además se ha comprobado que los polimorfismos encontrados cerca de estos genes están asociados con diabetes tipo 2. El hallazgo de mutaciones de genes MODY en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 han revelado otras supuestas mutaciones en casos individuales o bien en familias completas, sugiriendo que variantes raras en estos genes pueden contribuir a originar diabetes, especialmente en los genes HNF-4 α (264), HNF-1 α (265), e IPF-1 (266). Estudios genéticos han mostrado una evidencia de la asociación de diabetes mellitus tipo 2 con marcadores en la región de los genes MODY, aunque en análisis subsiguientes, no se encontró ninguna variación en la secuencia que pudiera asociarse con la diabetes tipo 2, pues en estudios de asociación en parejas afectadas de Finlandia se reveló la existencia de una asociación entre marcadores cercanos al gen HNF-4 α y diabetes mellitus tipo 2, pero el análisis de este gen reveló variantes no asociadas a diabetes (267).

Se encontró que mutaciones en el gen HNF-1 α en la población Oji-Cree canadiense, predisponían al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 en esta población. Hegele y cols. encontraron una variante en el gen HNF-1 α , G319S, la cual parece ser un polimorfismo único para esta población canadiense, estos investigadores encontraron que el alelo S319 fue significativamente más prevalente en personas diabéticas Oji-Cree que en no diabéticas (0.209 vs. 0.087), y que personas homocigotas S319/S319 y heterocigotas S319/G319 estaban predispuestas a padecer diabetes mellitus tipo 2 en una relación de 4.0 y 1.97 respectivamente, y que los genotipos que contenían el alelo S319 padecían a una edad más temprana la aparición de diabetes comparados con aquellos que tenían el genotipo G319/G319 (268).

La medición de tolerancia a la glucosa realizada a parientes sanos de pacientes con diabetes tipo 2 de población danesa, puso de manifiesto la existencia de un polimorfismo (Ala/Val 98) en el gen HNF-1 α que se asociaba con una disminución en la secreción de péptido-C sérico durante la medición de tolerancia a la glucosa en el 8% de los sujetos (269), todo lo cual sugiere la importancia de esta variante sobre la secreción de insulina en respuesta a la administración de glucosa. La importancia patogénica de esta variante sobre el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2, aún no está bien establecida (270).

Así la variación en la secuencia de los genes MODY, puede contribuir al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2, y por tanto la falta de asociación entre estos dos dentro de una población no debería frenar los estudios de estos mismos genes en otras poblaciones.

Factores de transcripción candidato para diabetes mellitus de inicio temprano.- La naturaleza de la susceptibilidad de los loci de la diabetes tipo 2 es aún desconocida, ellos podrían estar involucrados en la respuesta inmune, metabolismo de la glucosa o función de la célula β . Como ya se ha mencionado, genes específicos que participan en la génesis de la célula β -pancreática podrían estar involucrados en la susceptibilidad a la diabetes, como los

genes que codifican para factores nucleares y aquellos que participan en la función o replicación de dichas células (271).

En la diabetes tipo 2 de inicio temprano, se sugiere que influyen genes de susceptibilidad para padecer la enfermedad, entre los genes polimórficos demostrados se encuentran el sustrato del receptor de la insulina, el gen de la glucocinasa, factores transcripcionales como calpaína-10 y PPAR. En cambio el gen de la insulina, el receptor de la insulina y los transportadores de la glucosa no son polimórficos, los defectos en estos genes están presentes en menos del 1% de los pacientes diabéticos (272). Estos resultados han llevado a proponer la participación de genes involucrados en vías metabólicas aún no conocidas o bien genes que codifican para factores transcripcionales, reguladores de genes asociados al metabolismo de la homeostasis de la glucosa, entre estos genes están aquellos que codifican las proteínas de los islotes involucradas en el metabolismo de la glucosa, pues se han propuesto como posibles candidatos de las alteraciones en las células β que resultan en un daño al metabolismo de la glucosa en pacientes con diabetes tipo 2 (273).

Se han estudiado un gran número de factores de transcripción y de otros genes, las mutaciones encontradas en ellos se han asociado a un aumento en la susceptibilidad de padecer diabetes mellitus en edades tempranas de la vida, por lo que se han propuesto como genes candidato por ser posibles factores claves para el desarrollo de la enfermedad cuando estos sufren alteraciones en su regulación (274).

Avances en los mecanismos moleculares del desarrollo pancreático, señalización de la insulina, secreción de insulina, regulación del peso corporal, y todos aquellos cambios fisiopatológicos que contribuyen a la diabetes, han generado el estudio de un gran número de genes candidato potenciales para el desarrollo de diabetes, sin embargo, la identificación de estos genes de susceptibilidad ha sido una tarea ardua, y los avances en este campo son pocos y de progreso lento (275). Tan rápido como una nueva molécula es identificada en las vías metabólicas anteriores, es estudiada como un gen candidato para la diabetes, con solo pocas excepciones, estos estudios han sido negativos, debido en gran parte, al relativo bajo número de personas estudiadas para dichos genes (276). Sin embargo, con el conocimiento del genoma completo podrán estudiarse otros genes de susceptibilidad en diferentes poblaciones, junto con la secuencia del genoma humano y un catálogo de variaciones genéticas en el humano, se espera que nuevos genes de susceptibilidad sean identificados en un futuro cercano. Algunos genes bien establecidos como participantes en el desarrollo de la diabetes de inicio temprano como los factores nucleares hepatocíticos (MODYs) o genes candidato como PPAR y calpaína-10 identificarán nuevos caminos bioquímicos, pues solo la identificación y caracterización de los genes involucrados en la diabetes tipo 2 ayudará a entender mejor la regulación y función de la célula β incluyendo las vías de compensación de dichas células (277).

En los estudios de genes candidato, se analiza la frecuencia de polimorfismos en diversos genes que codifican para proteínas involucradas en la regulación de la glucosa y se compara en grupos de personas sanas y diabéticas. En la expresión diferencial de genes se busca identificar aquellos que se expresan y aquellos que no son expresados en dos condiciones diferentes: sujetos sanos y enfermos o enfermos controlados y sin control, es así como se ha descubierto la importancia y el funcionamiento de proteínas como resistina y PPAR entre otras (278,279).

A continuación se presenta una lista de genes candidato de susceptibilidad a la diabetes, de los cuales se ha comprobado que variaciones genéticas en su secuencia y en algunos casos mutaciones funcionales, condicionan la aparición de diabetes mellitus de inicio temprano.

HNF-3 α .- En los mamíferos se han identificado los factores de transcripción: HNF-3 α , HNF-3 β HNF-3 γ , estos se expresan en forma temprana en el endodermo del embrión. En el adulto estos genes se expresan en el sistema nervioso central, células neuroendócrinas, pulmón, hígado y páncreas. En ratones la expresión nula de HNF-3 β es letal, resultando en muerte embrionaria, en estudios realizados en células madre embriogénicas se demostró que HNF-3 β es un regulador positivo de la transcripción de: HNF-1 α , HNF-3 α , IPF-1 y HNF-4 α (280).

En los ratones heterocigotos para HNF-3 β , se presenta un fenotipo aparentemente normal aunque una disminución en la expresión de enzimas gluconeogénicas, particularmente fosfoenol-piruvato-carboxinasa, transferrina y tirosina-aminotransferasa. Recientemente se identificó una mutación en el gen HNF-3 β en una familia MODY en población japonesa. En el ratón knockout para HNF-3 α se observa un síndrome complejo caracterizado por hipoglucemia persistente neonatal, insuficiencias hormonales, disfunción pancreática de las células α y β y muerte neonatal, mientras que los ratones heterocigotos muestran secreción deficiente de insulina, e intolerancia a la glucosa (281).

PAX-4.- Los genes Pax, codifican para una familia de factores de transcripción, son esencialmente requeridos para la formación de varios tejidos a partir de las capas germinales de los embriones de los mamíferos. Específicamente en la organogénesis, están involucrados en los eventos primarios que disparan la diferenciación celular, la diferenciación del páncreas endocrino derivado del endodermo es mediado a través de Pax4 y Pax6 (282).

Concretamente Pax4 es un factor de transcripción de caja-par de tipo homeodominio (dominio-par) su expresión inicial en páncreas sucede en el día embrionario 10.5 en un grupo de células precursoras endócrinas, el cual exhibe una actividad de unión al DNA y es el motivo funcional más conservado en todas las proteínas Pax a través de millones de años de evolución, esta formado por 6 α -hélices, se expresa en el desarrollo del páncreas primario pero más tarde es restringido a células β y permanece hasta la edad adulta (283).

Se ha identificado la secuencia de unión al DNA del el dominio par de Pax-4, se observó que Pax-4 puede unirse a sitios de unión para Pax-6, el análisis de los dominios usando quimeras Pax-4-GAL4 reveló que la región carboxilo-terminal de Pax-4 contiene dominios de represión y dominios de activación, cuando el dominio de represión se liga al dominio de transactivación de Pdx-1, este dominio de represión puede abolir completamente el potencial de transactivación de pdx, lo que sugiere un papel importante de Pax-4 como un represor transcripcional cuya función puede involucrar la inhibición competitiva de la función de Pax-6 (284,285).

En ratones con delección homocigota para Pax-4 se muestra un retardo en el desarrollo de células β y δ aunque algunos autores indican que no hay formación de células β productoras de insulina, muriendo después del nacimiento por diabetes, la mayoría de los autores sí coinciden en una hiperplasia de las células α . Por otro lado se piensa que el balance entre Pax-4 y Pax-6 es determinante para que las células progenitoras comunes se diferencien a células α , y β , otros reportes indican que ratones homocigotos para Pax-4 mueren después del nacimiento por deshidratación mientras que los ratones heterocigotos muestran un fenotipo al parecer normal (286).

Pax-4 mostró afinidad similar a los sitios de unión de Pax-6 sobre el promotor del gen de glucágon, alterando la transcripción de dicho gen, específicamente a través de la inhibición de la transactivación mediada por Pax-6, esta inhibición transcripcional parece estar mediada por competición de la unión directa al DNA con Pax-6 y mecanismos potencialmente

adicionales como interacciones proteína-proteína y una actividad represora general de Pax-4 (287).

Se ha clonado el cDNA completo de Pax-4 de ratón, este fue de 1.38 Kb, la proteína deducida de Pax-4 fue de 349 aminoácidos con un peso molecular de 38 KDa, 2 motivos de unión al DNA: 1) Un dominio par de 128 aminoácidos y 2) un dominio par de 61 aminoácidos, que exhiben ambos una homología alta en cuanto a aminoácidos con Pax-6 (71.2% y 65% respectivamente), sin embargo, la secuencia del segmento C-terminal de Pax-4 fue diferente, y no mostró homología con ninguno de los otros Pax conocidos, la región codificante de Pax-4 abarcó aproximadamente 5.5 Kb y esta compuesta por 10 exones. La homología en la secuencia de proteínas y nucleótidos entre Pax-4 de ratón y el de humano fue de 83.1 y 80.0% respectivamente (288).

La delección del gen Pax-4 elimina virtualmente a las células secretoras de hormonas de yeyuno y duodeno, como a las células productoras de somatostatina y serotonina del estómago distal, indicando que Pax-4 regula también la diferenciación de las células endocrinas gastrointestinales (289).

Pax-6.- Es un factor transcripcional de tipo homeodominio. La caja-par de genes Pax-6 se expresa durante las etapas tempranas del desarrollo pancreático y en células endocrinas maduras. Pax-6 se expresa en todas las células de los islotes, ojo y sistema nervioso central. El ratón con delección homocigota para Pax-6 no desarrolla células α , sin embargo, aunque las células β y δ parecen no ser afectadas en número, su organización dentro de los islotes pancreáticos esta alterada. En los ratones heterocigotos el desarrollo de los islotes es aparentemente normal (290,291).

Pax-6 es un regulador positivo del gen de la insulina aunado a otros factores de transcripción como Beta2, Pdx-1 y Nkx2.2, la pérdida de la función de Pax-6 da un fenotipo de pérdida del ojo en mamíferos e insectos, sugiriendo que Pax-6 es un gen maestro universal del control de la morfogénesis del ojo al regular el control genético del cristalino pues se han encontrado que mutaciones intragénicas en el gen Pax6 causan aniridia en el humano. Pax 6 también promueve el crecimiento del epitelio ductal y de células progenitoras endocrinas, esta implicado en la diferenciación de motoneuronas somáticas y de interneuronas en cerebelo o cordón espinal así como en el desarrollo de la pituitaria y sistema olfativo (292).

Se han asociado mutaciones del gen Pax-6 con una alteración en el desarrollo del telencéfalo, dando como resultado una delgada placa cortical, la expansión de placas proliferativas y la ausencia del bulbo olfativo, Pax-6 regula también el proceso de migración radial de precursores neuronales. Estudios realizados en ratones deficientes de Pax6 mostró que este gen tiene influencia sobre la actividad celular a través de la corticogénesis, además, la delección del gen Pax-6 elimina a las células productoras de gastrina del estómago distal, indicando que Pax-6 regula también la diferenciación de las células endocrinas gastrointestinales, reflejando un camino común para la diferenciación de células endocrinas gastrointestinales y pancreáticas (293).

Las mutaciones en el gen Pax-6 en humanos pueden llevar a un defecto en el páncreas endocrino, indicando que las mutaciones heterocigotas en el gen Pax-6 inducirían anomalías en el ojo e intolerancia a la glucosa en personas con estas mutaciones, además de ser un factor de transcripción esencial para la diferenciación de células α (294).

Nkx2.2.- Es un factor transcripcional de tipo homeodominio que pertenece a la familia Nk2, actúa como regulador durante el desarrollo y diferenciación en varios órganos como el corazón y sistema nervioso central. Originalmente Nkx2.2 fue identificado como un gen

expresado en las regiones ventrales del desarrollo del sistema nervioso central, este gen se expresa en células α , β , y γ del páncreas, pero no en células δ , además es un regulador positivo de la transcripción del gen de la insulina (295, 296).

Nkx2.2 se expresa en los precursores de las células islóticas durante el desarrollo pancreático, y persiste en las células β -maduras, Nkx2.2 tiene 2 exones alternativos no codificantes (Ex1a y Ex1b). En el ratón transgénico, las secuencias río arriba de Ex1a dirigen la expresión en las células maduras de los islotes, el promotor de Ex1a tiene interacciones con HNF3 y Ngn3 o NeuroD1 uniéndose a sitios adyacentes que juegan papeles clave en la expresión específica de las células de los islotes. Por el contrario las secuencias río arriba de Ex1b restringen la expresión específicamente a células precursoras de insulina, lo que revela distintos mecanismos para la dirección de la expresión de factores clave de diferenciación en las células maduras de los islotes. Se ha propuesto a Nkx2.2 como un factor indispensable para la diferenciación final de las células β pancreáticas, pues como ya se ha mencionado en su ausencia, dichas células β caen o son víctimas de un estado indiferenciado (297).

Se ha mostrado que los ratones homocigotos para una mutación nula de Nkx2.2, no desarrollan bien células β y presentan una disminución en el número de células α y γ , muriendo en el período postnatal por hiperglucemia severa. De acuerdo a cortes histológicos pancreáticos en el día embrionario 18.5 se demuestra que estos ratos homocigotos carecen de islotes de Langerhans normales y que no tienen células productoras de insulina, además el número de células α y γ están significativamente disminuidas. En contraste el número de células δ y la expresión de la somatostatina no se ven afectadas, interesantemente se demuestra la existencia de una gran población de células parecidas a las endócrinas contenidas en islotes desorganizados, estas células expresan proteínas específicas de la célula β tal como polipéptido amiloide pancreático y prohormona convertasa, pero carecen de la expresión de GLUT2, glucocinasa y Nkx6.1, por tanto ellas pueden representar una población incompletamente diferenciada de células β . Parece ser que Nkx2.2 es indispensable para la expresión del gen de la insulina y para la maduración de las células β . Los ratones heterocigotos muestran un fenotipo aparentemente normal (298).

NKx6.1.- Es una proteína de tipo homeodominio, es un factor de transcripción ampliamente expresado en epitelio pancreático en el día embrionario 10.5, pero es restringida a las células β por el día 18.5 sugiriendo su importante papel en la diferenciación. Este gen está implicado en la diferenciación de células β productoras de insulina, se ha mostrado que la ruptura o desorganización de la caja de genes Nkx6.1 en el ratón da como consecuencia la pérdida de precursores de células β y bloquea la neogénesis de dichas células β durante su diferenciación (299). Por el contrario, el desarrollo de los islotes en embriones doblemente mutantes para Nkx6.1/Nkx2.2 es idéntico al desarrollo de islotes con una sola mutante en Nkx2.2 en la cual los precursores de células β sobreviven pero fallan en la diferenciación de éstas células en el curso del desarrollo. Estos experimentos en conjunto revelan 2 caminos independientes que controlan la diferenciación de dichas células β y sitúan a Nkx6.1 río abajo de Nkx2.2 en el camino mayor de la diferenciación de células β pues la expresión de Nkx6.1 en páncreas se pierde en el ratón Nkx2.2 $-/-$ pero no a la inversa. Además de la participación en la diferenciación pancreática, Nkx6.1 es un factor que también participa en el desarrollo y formación de células neuroepiteliales ventrales (300).

Isl-1.- Islet-1 es un factor de transcripción de tipo homeodominio que se une a una región promotora del gen de la Insulina, participa también en la regulación del gen del

glucágon, y somatostatina (301). La expresión de islet-1 puede ser detectada en células precursoras endocrinas posmitóticas a partir del día embrionario número 9, además isl-1 es expresado en células mesenquimales del brote dorsal pero no del brote ventral pancreático, más tarde islet-1 es expresado en todas las células de los islotes permaneciendo ahí hasta la edad adulta. Así, Isl-1 es necesario para el desarrollo del mesénquima dorsal pancreático, el cual puede subsecuentemente inducir el desarrollo de las células exócrinas a partir del epitelio pancreático primario. Isl-1 es un factor indispensable para la diferenciación celular endócrina, participa en el desarrollo temprano y diferenciación neuronal, se expresa también en páncreas, es un transactivador del promotor de glucágon y se ha sugerido su participación en la transactivación del gen de la insulina (302,303). El cDNA humano de islet-1 se aisló y se caracterizó su estructura, el análisis de ligamiento en 172 familias francesas reveló una asociación con diabetes tipo 2 en pacientes con un índice de masa corporal <27. Shimomura y cols. identificaron una mutación sin sentido heterocigota (Q310X) en este gen, en una familia japonesa, el sujeto probando fue diagnosticado con diabetes a los 32 años de edad (304). El ratón con delección homocigota de Isl-1 se detiene (no crece) durante el desarrollo embrionario y muere por una falla en el desarrollo del páncreas endócrino (305).

Hlxb-9.- Es un factor de transcripción de tipo homeodominio, que codifica para el gen HB9, es expresado en el desarrollo temprano del páncreas y en páncreas adulto. Se ha visto que en el desarrollo embrionario de ratones, la bolsa pancreática ventral, dorsal y las células β -pancreáticas expresan Hlxb-9. En los ratones knockout para este gen, se observa una falla en el desarrollo del lóbulo dorsal del páncreas, el resto del páncreas Hlxb9 $-/-$ tiene una disminución en el tamaño de los islotes, disminución en el número de células β , y una expresión disminuida de los genes para GLUT2 y el factor de transcripción Nkx6.1 (306).

Neurogenina 3.- Es un miembro de la familia de factores de transcripción hélice-asa-hélice, fue aislada de células neuroblásticas usando RT-PCR, que está involucrado en la determinación de células precursoras neuronales en el neuroectodermo. El gen de la neurogenina consta de un exón, y se expresa en regiones discretas del sistema nervioso y en las células del páncreas embrionario (307). Se ha observado que los ratones carentes de Ngn3 no pueden generar ninguna de las células endocrinas pancreáticas y mueren después del nacimiento por diabetes, por tanto se ha sugerido que la Ngn3 se requiere para la formación de precursores comunes de los cuatro tipos celulares del páncreas endócrino (308).

La neurogenina 3 también participa en el desarrollo de células gliales bipotenciales que llegarán a ser células oligodendrocíticas o bien células astrocíticas. El ratón carente de Ngn3 tiene una pérdida parcial de la expresión de Nkx2.2, un factor que se requiere también para la oligodendroglíogenesis, sugiriendo que la Ngn3 puede regular la diferenciación glial en un estado de desarrollo anterior a la segregación del linaje oligodendrocítico y astrocítico (309).

La Ngn3 parece ser un marcador de células endocrinas precursoras y está ausente en las células endocrinas diferenciadas sugiriendo su participación en el desarrollo de las células pancreáticas primarias (310).

La Fig. 15 muestra todos aquellos factores de transcripción que participan en la morfogénesis y diferenciación de las células de los islotes pancreáticos, cada factor transcripcional aparece en un día embrionario determinado, una vez que cada tipo de célula pancreática está bien diferenciado, entonces los factores transcripcionales ayudarán a las células a mantener su funcionalidad durante toda su vida. En la siguiente figura los factores de transcripción y los días en que aparecen estos se determinaron en células pancreáticas de

rata, sin embargo, las células pancreáticas y factores de transcripción humanos son muy similares a los de la rata.

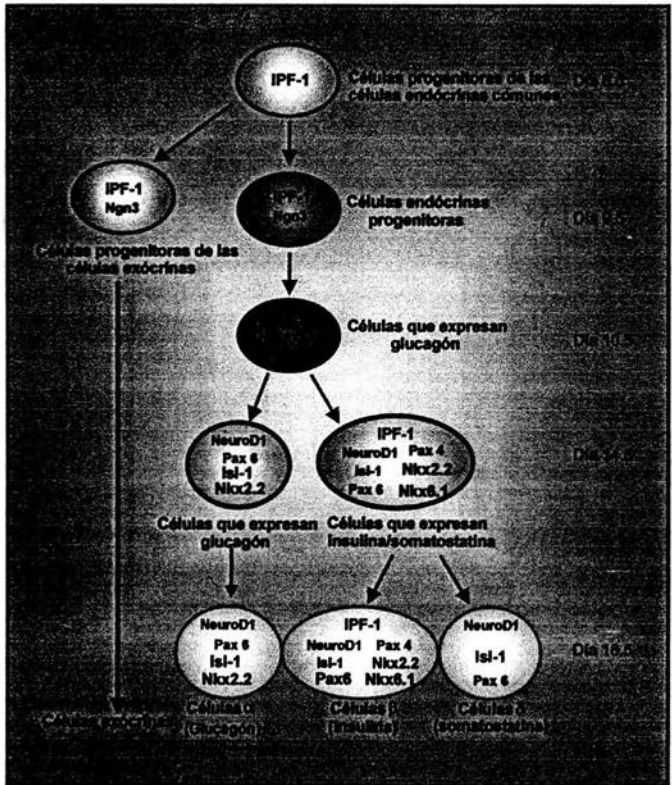


Fig. 15. Participación de los factores transcripcionales en la morfogénesis de las células pancreáticas¹⁵.

¹⁵ Hsiang-Po Huang.; Ming-Jer Tsai. Transcription Factors involved in Pancreatic Islet Development. J Biomed Sci. 7:27-34. 2000.

Genes candidato para la diabetes mellitus de inicio temprano.

Gen del receptor de proliferación γ del peroxisoma.- PPAR- γ es un miembro de la familia de receptores hormonales nucleares relacionados con procesos de diferenciación en los adipositos (311), existe como heterodímero asociado con receptores X de los retinoides con actividad en las histonas. La acetilación de las histonas es un factor de remodelación de la cromatina que facilita la actividad transcripcional de los genes (312), además se ha demostrado que PPAR- γ funciona como ligando de hipoglucemiante tiazolidinediona, utilizado para el tratamiento de los pacientes diabéticos (313).

En fechas recientes se encontraron dos polimorfismos de PPAR- γ en los pacientes con resistencia severa a la insulina y no en los sujetos control. Otros polimorfismos de PPAR- γ también correlacionaron con resistencia severa a la insulina (314). Estos pacientes aparentemente constituyen un grupo con defecto en la transcripción y asociados con los hipoglucemiantes. Un polimorfismo en un aminoácido común (Pro12Ala) ha sido asociado con diabetes, esta variación encontrada correlaciona con un buen control de la glucosa y los sujetos portadores de este polimorfismo no son obesos (315).

En los modelos experimentales de ratones knockout, se ha puesto de manifiesto lo siguiente: el knockout homocigoto para PPAR- γ -/- es letal, el ratón heterocigoto +/-, tiene un buen control de la glucosa, no es obeso en condiciones de dieta rica en carbohidratos y lípidos, mientras que los ratones silvestres en las mismas condiciones se vuelven obesos y presentan resistencia periférica a la insulina. Por las características del gen y su comportamiento ante situaciones modificadas de alimentación, se propone como gen ahorrador o almacenador (316).

Personas homocigota para el alelo Pro12 son más resistente a la insulina que aquellos que tienen el alelo Ala12, además presentan 1.25 veces más riesgo de desarrollar diabetes. Hay evidencia de interacciones entre este polimorfismo y ácidos grasos sugiriendo una asociación de este locus con la dieta. La expresión de PPAR- γ en los tejidos en respuesta a la insulina (grasa y músculo) y en células-beta pancreáticas provee una asociación entre resistencia a la insulina y secreción a la insulina (317).

Gen de Calpaína-10.- La calpaína-10 pertenece a la familia de la cisteín-proteasas no lisosomales, las calpains también conocidas como proteasas neutras, son activadas por el calcio y su expresión es ubicua en todos los tejidos, la familia de las calpains es un grupo de proteínas que contienen varias subunidades, la subunidad grande se divide en 4 dominios (318):

Dominio I.- localizado en la región amino-terminal, participa en la regulación de este complejo protéico.

Dominio II.- es un dominio proteolítico homólogo a la papaína.

Dominio III.- es un dominio de unión de función desconocida.

Dominio IV.- es un sitio de unión semejante a calmodulina dependiente de calcio.

La calpaína-10 es una calpaína atípica porque carece del sitio semejante a calmodulina, en su lugar contiene un sitio carboxilo-terminal (319), actúa en ciertos sustratos celulares que intervienen en las señales intracelulares, señales de proliferación, diferenciación y señales derivadas después de la activación mediada por la insulina. Aunque la expresión de la calpaína es ubicua, la actividad transcripcional esta elevada en los islotes pancreáticos, músculo e hígado, lo cual sugiere que probablemente participa en la regulación para la secreción y acción de la insulina y en la producción de glucosa hepática (320).

Un hallazgo reciente sitúa a la calpaína-10 como el marcador de asociación para diabetes en pacientes mexicano-americanos. A través de un análisis de una región de 1.7 Mb

en 10 sujetos diabéticos se identificaron 179 SNPs (cambios de una sola base) distribuidos en tres genes, entre ellos la calpaína-10, en el intrón 3 de la calpaína-10 se encontró el polimorfismo denominado UCSNP-4, con la variación G/A. En el cromosoma 2q37.7 se encuentra localizado el gen de la calpaína-10 donde el tercer intrón es polimórfico en G/A, al parecer este polimorfismo está asociado con una disminución de los mensajeros para la calpaína-10 en músculo y con estados de resistencia a la insulina. Se propone también un rearreglo alternativo de los exones (splicing alternativo), que genera 10 diferentes variantes de calpaína, las variantes 10c, 10g y 10h están presentes en islotes pancreáticos (321).

Variaciones genéticas en este gen han sido asociadas con diabetes tipo 2, pues aumenta 3 veces el riesgo de alteraciones en la función normal de las células-β y de la acción de la insulina sobre el músculo y la grasa. Personas no diabéticas con este haplotipo de alto riesgo secretan significativamente menos insulina en respuesta a la glucosa, ellos podrían ser más resistentes a la insulina con una disminución en el rango de la movilización de la glucosa mediada por insulina en músculo y adipocitos. Todavía falta mucho por esclarecer en polimorfismo, funcionalidad, y estados de resistencia periférica a la insulina en los pacientes con diabetes, no obstante, las evidencias indican que de todos los marcadores genéticos analizados en diabetes, la calpaína-10 puede ser un excelente candidato para estudiar en población mexicana (322).

El gen de la Insulina.- La insulina es producto de un gen de copia única, localizada sobre el cromosoma 11p15, su RNAm consta de 446 nucleótidos codificado por 3 exones, la traducción da como resultado la preproinsulina, un precursor con 105 aminoácidos compuesto por un péptido señal, cadena B ó beta, las piezas conectoras, y la cadena A ó alpha (323).

Desde la clonación de la insulina humana en 1980, la insulina ha sido un gen candidato para la diabetes mellitus tipo 2, varios estudios moleculares fueron hechos para determinar si ciertos alelos específicos estaban asociadas a la diabetes mellitus tipo 2, en particular, una región que flanquea la posición 5' del gen de la insulina con 3 alelos diferentes debidos a repeticiones en tandem (designados como alelos de clase I, clasell y clase III) ha sido ampliamente estudiada (324), encontrándose que el gen de la insulina, no es un locus de susceptibilidad mayor para la diabetes tipo 2, sin embargo, pocos estudios sugieren que el gen de la insulina puede contribuir modestamente a la diabetes tipo 2 y a la resistencia a la insulina, aunque los mecanismos para estas supuestas asociaciones son desconocidos, los estudios indican que los alelos de clase III están asociados con una disminución en la transcripción del gen de la insulina en páncreas fetal, lo cual puede inducir efectos tardíos de resistencia a la insulina sobre músculo en adultos jóvenes, particularmente en aquellos individuos sujetos a un bajo crecimiento fetal debido a un ambiente intrauterino subóptimo, sin embargo, se necesitan más estudios para comprobar o desechar esta hipótesis (325).

Olansky y cols. identificaron una inserción de 8 pares de bases en la posición -315 del promotor de la insulina, esta inserción fue asociada con diabetes mellitus en afro-americanos, en los cuales el 5% que presentaban diabetes fueron heterocigotos para esta inserción, mientras que solo el 1% de los sujetos sanos tuvo la inserción. Esta misma inserción no estuvo presente en indios Pima, ni en 35 caucásicos de St. Louis. La inserción de 8 pb se asoció con una disminución en la actividad del promotor *in vitro*, sugiriendo su importancia funcional (326). Estudios en otras poblaciones y en la historia familiar del propósito se requieren para definir mejor la importancia de esta variante en la zona promotora del gen de la insulina.

Se han identificado también, casos raros de familias con moléculas de proinsulina que tienen propiedades bioquímicas anormales y que se han asociado con intolerancia a la

glucosa o con diabetes, en varias de estas familias se encontraron mutaciones en el gen de la insulina que incluían Val192Leu, Fen48Ser, Fen49Leu, His34Asp, Arg65His, Arg65Leu y Arg65Pro. Varios investigadores han encontrado estas, y otras mutaciones en sujetos con diabetes tipo 2 típica, y han concluido que estas variaciones son de baja frecuencia (327-330).

El gen del receptor de glucagón.- El glucagón es una de las hormonas contrarreguladoras de la insulina, que controla la producción de glucosa hepática, además de estar involucradas en la regulación de la secreción de la insulina por las células de los islotes. Algunas personas con diabetes mellitus han elevado la producción de glucógeno circulante, indicando que las anomalías en la secreción de glucógeno o su señalización pueden tener un papel patofisiológico importante. El receptor del glucagón, es un receptor con 7 dominios ligado a proteínas que se unen al nucleótido guanina, la unión del glucagón a su receptor da como resultado la activación de la adenil-ciclasa y la acumulación intramolecular de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). El gen receptor del glucagón está localizado sobre el cromosoma 17q25 y contiene 13 exones que abarcan aproximadamente 5.5 kilobases (331).

A través de un análisis por SSCP (polimorfismo conformacional de cadena simple), Hager y cols. (332) identificaron una mutación sin-sentido (Gly40Ser) en el gen del receptor de glucagón. En caucásicos franceses este polimorfismo se encontró en el 4.6% de personas con diabetes tipo 2, contrariamente ningún sujeto sano lo presentó, ni aquellos sanos con una historia familiar de diabetes tipo 2. Esta mutación fue asociada con diabetes tipo 2 en familias francesas, particularmente estuvieron afectados aquellos sujetos con una tolerancia a la glucosa alterada o aquellos que presentaron hiperglucemia en ayunas. Un estudio realizado por Gough y cols. en caucásicos del Reino Unido confirma estos resultados(333). Sin embargo en otros estudios no se encontró asociación de este polimorfismo con diabetes tipo 2 como en los rusos, sardinios y finlandeses, en los cuales no se encontró dicho polimorfismo en las poblaciones estudiada (334-336). Cuando este polimorfismo (Gly40Ser), fue estudiado *in vitro*, el receptor del glucagón tuvo una disminución en la afinidad de unión al glucagón de aproximadamente 3 veces comparada con el receptor silvestre (wild-type), sugiriendo que esta mutación genera un cambio funcional (337). Estudios *in vivo* en personas heterocigotas sardinianas no diabéticas, mostraron una respuesta significativamente baja de la glucosa a la administración de glucagón, comparada con aquellas personas sanas homocigotas Gly40 de la misma población, ambos grupos presentaron niveles de insulina similares, por tanto este polimorfismo puede jugar un papel importante en el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2 (338).

El gen de la proteína de unión a ácidos grasos intestinales (FABP2).- Mediante estudios moleculares, Prochazka y cols. identificaron una región sobre el cromosoma 4q que estaba ligada a resistencia a la insulina en indios Pima (339). En población México-americana, esta misma región en 4q28-31 fue ligada niveles normales de insulina después de una curva de tolerancia a la glucosa. Sin embargo, esta región no fue ligada a diabetes tipo 2 en indios Pima, en México-americanos, ni en población francesa (340). Entre los genes conocidos por ser codificados dentro de esta región está el gen FABP2. FABP2 se expresa solamente en células epiteliales del intestino delgado y en proteínas de unión a ácidos grasos de cadena larga, lo que sugiere un papel importante en la absorción de ácidos grasos del intestino. El metabolismo anormal de los ácidos grasos está asociado con resistencia a la insulina, por lo tanto FABP2 es un gen candidato para la diabetes tipo 2. En estudios moleculares de FABP2 se identificó una mutación sin sentido (Ala54Thr), la variante Ala54Thr es prevalente en indios Pima con un alelo de frecuencia de 0.29, además se encuentra en otras poblaciones

(frecuencia alélica en japoneses 0.34, finlandeses 0.28, canadienses nativos 0.14). Se observó que los indios pima con la variante Ala54Thr tuvieron valores de insulina en ayuno más altos y una entrada de glucosa a la célula disminuida en la prueba del modelo mínimo (prueba hiperinsulinémica-euglucémica) indicando una mayor resistencia a la insulina. Estos pacientes también presentaron alto rango de oxidación de grasas. Los pacientes japoneses con polimorfismos homocigotos para el alelo Thr54 demostraron tener niveles de insulina basal mucho más altos después de dos horas de una tolerancia a la glucosa comparados con aquellos de diferente genotipo, sugiriendo nuevamente una asociación de resistencia a la insulina con el alelo Thr54 en esta población. También se observó que después de un ultrasonido abdominal los pacientes japoneses presentaron mayor acumulación de grasa intraabdominal comparada con otros genotipos. La grasa subcutánea, la cual no está asociada con resistencia a la insulina, no estuvo asociada con ningún genotipo (341). Por el contrario, en otros estudios hechos a pacientes japoneses y caucásicos no se encontró ninguna asociación de este polimorfismo Ala54Thr con diabetes mellitus, obesidad y altos niveles de insulina (342,343).

Para entender mejor la fisiología del polimorfismo Ala54Thr en el gen FABP2, este fue expresado *in vitro* encontrándose que la unión de ácidos grasos de cadena larga a su receptor tenía dos veces más afinidad que el receptor silvestre. Adicionalmente el polimorfismo Ala54Thf de FABP2 incrementa el transporte de ácidos grasos en células Caco-2 *in vitro*. Agren y cols. encontraron que homocigotos para Thr54 tienen niveles de triglicéridos significativamente más altos en ayunas que los homocigotos Ala54. Así el polimorfismo Ala54Thr del gen FABP2 podría ser más eficiente en la unión de ácidos grasos, lo cual puede resultar en un aumento en la absorción de ácidos grasos libres de la dieta y por tanto en la aparición de resistencia a la insulina (344).

El gen de la subunidad reguladora de la proteína fosfatasa-1 (PPP1R3).- La subunidad reguladora de la proteína-fosfatasa 1 (PPP1R3) está localizada sobre el cromosoma 7q31.1-q31.2. Las mutaciones en PPP1R3 tienen la propiedad de inactivar a PP1, (la PP1 es encargada de activar la glucógeno-sintetasa) por tanto disminuyen los niveles de glucógeno-sintetasa activa y en su momento disminuye la incorporación de glucosa a glucógeno. A través de las técnicas de SSCP y secuenciación se han identificado varios polimorfismos en el gen PPP1R3, la mutación sin sentido Asp905Tyr identificada en población danesa no está asociada directamente con diabetes tipo 2, sin embargo, en voluntarios sanos daneses, el alelo Tyr905 se asoció con una disminución en el metabolismo de la glucosa no oxidativa estimulada por insulina (síntesis de glucógeno) y un aumento en la oxidación de glucosa basal. Durante una curva de tolerancia a la glucosa, personas obesas no diabéticas heterocigotas para la mutación Tyr905 tuvieron un 42% más alta la respuesta de la insulina en la primera fase, comparada con sujetos obesos homocigotos para Asp905. Posiblemente el incremento en los niveles de insulina ayuden a sobrellevar la disminución en la actividad de la glucógeno-sintetasa resultado de la mutación PPP1R3. Este polimorfismo es mucho más común en población japonesa que en danesa (frecuencia alélica 0.68 vs. 0.10) (345). Shen y cols. reportaron una asociación del genotipo Tyr905/Tyr905 con un bajo índice de masa corporal en personas japonesas con diabetes tipo 2, sin embargo los efectos de un buen control diabético o control de peso no se consideraron (346).

Xia y cols. identificaron una inserción/delección de 5 pb de largo en la región 3' no traducida que afecta la distancia entre dos motivos ATTTA. Los motivos ATTTA son los motivos más pequeños de elementos ricos en AU (AT) desestabilizantes del ARNm. En indios Pima aquellos homocigotos para la delección tuvieron una concentración de RNAm de PPP1R3

44% más baja que aquellos homocigotos para la inserción, los sujetos heterocigotos tienen niveles intermedios de ARNm de PPP1R3 (20% menos de lo normal). Aquellos sujetos con delección presentaron una insulina plasmática en ayuno más alta, así como una entrada de glucosa mediada por insulina baja y una alta susceptibilidad para desarrollar diabetes tipo 2. Este polimorfismo ha sido identificado también en indios Oji-Cree canadienses, donde las personas con una glucosa en ayuno alterada o con diabetes tipo 2 y homocigotas para la misma delección tienen niveles de glucosa más bajos que aquellas con el alelo de inserción (347).

El gen de la fosfatidil inositol-3-cinasa.- El fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), es activada por vía IRS-1 de la insulina y juega un papel importante en la entrada de glucosa estimulada por insulina en tejidos sensibles a la insulina (músculo y grasa), así como a la fosforilación del fosfatidilinositol, el cual actúa como un segundo mensajero. PI3K es un heterodímero compuesto de una subunidad reguladora ($p85\alpha$) y una subunidad catalítica. Como la disminución de la entrada de glucosa a la célula estimulada por insulina es observada en sujetos con resistencia a la insulina, PI3K es un gen candidato para la diabetes tipo 2. Dos grupos han estudiado la subunidad $p85\alpha$ en busca de mutaciones, sin embargo, ambos grupos usaron cDNA de músculo para su estudio, por tanto, mutaciones en regiones no codificantes deberían ser primeramente identificadas. En el primer estudio una mutación sin sentido Met326Ile se identificó en población danesa, sin embargo, la mutación no segregó con diabetes tipo 2. Una prueba de tolbutamida intravenosa se llevó a cabo en sujetos caucásicos sanos para valorar el papel de la mutación en la resistencia a la insulina. Los homocigotos Ile326 tuvieron un 23% menos de efectividad de la glucosa y 32% menos en efectividad de la insulina comparada con aquellos sujetos homocigotos y heterocigotos Met326, sugiriendo que esta mutación tiene relevancia clínica en el desarrollo de resistencia a la insulina (348).

Por el contrario en el segundo estudio, el polimorfismo Met326Ile fue identificado en indios pima (frecuencia alélica 0.25) y en caucásicos franceses (frecuencia alélica 0.17), al igual que en población danesa no hubo ninguna asociación del polimorfismo con diabetes tipo 2 en todo el grupo estudiado. Sin embargo, cuando los Indios Pima hombres y mujeres se analizaron por separado, las mujeres con Met/Met y genotipos Met/Ile tuvieron una prevalencia más alta de desarrollar diabetes tipo 2 comparada con aquellas mujeres con el genotipo Ile/Ile (72%, 71% y 42% respectivamente). Además las mujeres Ile/Ile tienen una mayor respuesta de insulina y bajos niveles de glucosa dos horas después de una administración de glucosa, al contrario del estudio danés. La sensibilidad a la insulina, mediada por modelo mínimo en mujeres no diabéticas, fue similar entre los tres genotipos (349).

Gen del polipéptido amiloide de los islotes.- El gen del polipéptido amiloide de los islotes (IAPP), está localizado sobre el cromosoma 12 y codifica un precursor de 89 aminoácidos, el cual es procesado a un polipéptido de 37 aminoácidos con homología a la familia de calcitonina (350). Varios estudios han demostrado que las personas con diabetes tipo 2 tienen un exceso de IAPP en los islotes pancreáticos así como también en circulación, indicando que este IAPP puede tener un papel importante en la disfunción de la célula β y/o resistencia a la insulina (351). Además los ratones deficientes en IAPP a los que se les da un bolo de glucosa tienen un aumento en la respuesta de insulina seguida por una disminución más rápida en la glucosa sanguínea que aquellos ratones control silvestre sugiriendo que la presencia de IAPP disminuye la secreción de insulina (352). Los análisis por SSCP en sujetos japoneses revelaron una mutación sin sentido de una serina por glicina en el codón 20 que solo estuvo presente en sujetos con diabetes tipo 2 (353). En otros estudios hecho en

japoneses y taiwaneses no se encontró asociación alguna de IAPP con diabetes tipo 2, además el polimorfismo Ser20Gly no se encontró ni en sujetos con diabetes ni en sanos de población caucásica indicando que este polimorfismo no tiene un papel relevante en esta población (354).

El gen del receptor del Péptido 1 parecido al glucágon.- El péptido-1 parecido al glucágon (GLP-1) es producido en el intestino delgado en respuesta a la glucosa o al bolo alimenticio que incrementa la secreción de insulina estimulada por glucosa. El receptor para el GLP-1 es codificado sobre el cromosoma 6p21 y se encuentra en los islotes pancreáticos. Dos tandem simples altamente polimórficos (GLP-1R-CA1 y GLP-1R-CA3), fueron identificados en este gen (355). La frecuencia alélica de los dos marcadores se comparó en sujetos diabéticos y en no diabéticos afro-americanos. La frecuencia alélica fue similar en los dos grupos para ambos marcadores, los estudios de asociación del receptor GLP-1 con la diabetes han sido hechos en un gran número de poblaciones como caucásicos franceses, caucásicos británicos, y japoneses pero fueron negativos en todos ellos (356).

Gen del receptor de la vitamina D.- Varios estudios han sugerido al receptor de la vitamina D como gen candidato para la diabetes mellitus tipo 2. Un estudio en personas sanas de bangladesh con riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 mostró que la ausencia homocigota de un sitio de restricción Apa I, se asoció con un alto índice de secreción de la insulina (357). En población caucásica sana, se mostró una asociación de un polimorfismo Taq1, con resistencia a la insulina, sin embargo, en otro estudio con caucásicos no diabéticos con una historia familiar de diabetes tipo 2, no mostraron asociación a polimorfismos Taq1 ni a Bsm1 con sensibilidad a la insulina (358).

Otros genes.- El promotor del gen de la glucosa-6-fosfatasa se estudió en población japonesa y el gen del promotor de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas fue estudiado en indios Pima y caucásicos con diabetes tipo 2, no se identificaron polimorfismos en ninguno de estos dos genes al hacer la técnica de SSCP o secuenciación directa. El Antígeno linfocítico humano CD38 tiene actividad de ciclasa ribosil adenosin trifosfato, la cual puede ser importante para movilizar el calcio que es necesario para la secreción de insulina. Yagui y cols. encontraron una asociación significativa de una mutación sin sentido Arg40Trp en parientes de sujetos con diabetes tipo 2 que tenían esta mutación (359).

En general todos los defectos genéticos en los factores de transcripción o en los genes formadores de proteínas importantes para el metabolismo de la glucosa provocan anomalías en la homeostasis de glucosa, y por tanto promueven el desarrollo de hiperglucemia crónica, a través de alteraciones en la secreción de insulina y posiblemente en el desarrollo de los islotes pancreáticos (360).

Genes que incrementen la susceptibilidad a la diabetes tipo 2 probablemente estén involucrados en el desarrollo pancreático, en la secreción de insulina y metabolismo de la glucosa o aquellos que incrementen la susceptibilidad a la obesidad. Es probable que mutaciones en algunos genes sean distintas para una población dada, mientras otras pueden ocurrir más marcadamente en otras poblaciones, además la expresión fenotípica de una mutación dada puede variar marcadamente entre poblaciones (igual en un solo individuo de una misma población) dependiendo del fondo genético y de diferencias en el ambiente (361, 362).

Varias investigaciones han acertado y caracterizado fenotípicamente a grupos y familias para estudios genéticos. Debido a las dificultades para elucidar genes de susceptibilidad para enfermedades crónicas como la diabetes, cuando se encuentran

resultados positivos, es decir que relacionen los genes encontrados con la enfermedad, estos genes o locus deben ser estudiados hasta que su autenticidad sea apoyada por estudios en otras poblaciones, y/o hasta que la evidencia de un defecto funcional en el producto del gen mutado sea demostrada. Con toda seguridad, los años venideros serán exitosos en la identificación de genes de susceptibilidad para la diabetes, con estos descubrimientos podrá mejorarse el diagnóstico temprano y el desarrollo de nuevas medidas terapéuticas (farmacológicas y terapia génica) para la prevención y tratamiento de la diabetes (363).

Perspectivas Futuras

Recientes estudios clínicos y de laboratorio sobre diabetes mellitus tipo 2 de inicio temprano a través de todo el mundo indican que es una alteración más común de lo que se cree en realidad, el porcentaje de prevalencia que indica que del 2–5% de todos los pacientes diabéticos son pacientes con diabetes tipo 2 de inicio temprano es solo un número aproximado que representa a un grupo de personas que están destinadas a desarrollar diabetes debido a la herencia de un gen mutante que es suficiente para causar diabetes (364), lo que marca la diferencia entre los pacientes con diabetes tipo 1 y tipo 2, en los cuales la susceptibilidad a padecer la enfermedad se hereda, más que la diabetes misma, y los factores no-genéticos como son los factores ambientales y el estilo de vida, disparan el desarrollo de la diabetes en individuos genéticamente susceptibles (365). Sin embargo, la susceptibilidad es determinada por variaciones genéticas comunes en varios genes, variaciones que también están presentes en individuos normales en la población en general (366).

El hecho de que la diabetes tipo 2 de inicio temprano sea mal entendida y por tanto mal diagnosticada, es debido principalmente a que en muchos casos se desconoce la existencia de esta forma de diabetes, por tanto son necesarios programas educacionales que indiquen la existencia de esta enfermedad, así como el establecimiento de criterios diagnósticos específicos dentro de los cuales uno de los más importantes es la historia familiar del propósito más que el diagnóstico individual del paciente. Las pruebas para determinar la diabetes de inicio temprano, son basadas en pruebas genéticas, pruebas que deberían ser menos costosas para el estudio de las mutaciones y pruebas que deberían estar disponibles en los centros de salud, aunado a esto, el significado patofisiológico de cada mutación es necesario para determinar las consecuencias fisiológicas que traerá la enfermedad (367).

Terapia génica para Diabetes.- Los tipos de diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2, tienen en común la incapacidad de las células β y de los islotes de Langerhans para liberar insulina en la cantidad y precisión necesarias para mantener los niveles de glucosa normales en el torrente sanguíneo, es decir, glucemia normal (368). Para ambos tipos de diabetes (tipo 1 y tipo 2) el mayor problema clínico resulta de los efectos prolongados de la hiperglucemia crónica, lo cual ocurre debido a una terapia estándar para la diabetes, que no puede mantener los niveles de glucosa sanguínea dentro del rango normal que se hallaría con un funcionamiento normal del páncreas. Aunque no se sabe porque, la hiperglucemia permite la formación de productos finales glucosilados altamente reactivos (AGEs), la exposición crónica

a altos niveles de AGEs genera múltiples daños en el organismo, los cuales se dividen en complicaciones microvasculares y macrovasculares. Independientemente de la causa de la diabetes, el objetivo de la terapia es restablecer la capacidad de liberación de insulina a los niveles normales o simplemente proporcionar de alguna forma la posibilidad de lograr estos niveles en la sangre (369).

Los avances en la ciencia y en particular los de ingeniería genética, han hecho posible vislumbrar nuevas vías de terapia entre las que destaca la terapia génica como una alternativa muy diferente a la administración convencional de insulina. Los conocimientos básicos que se manejan del funcionamiento del páncreas, unidos a los avances de la biotecnología, han permitido el trabajo genético sobre un posible tratamiento de la diabetes mellitus, por tanto, la terapia génica para la diabetes puede ser definida como cualquier método o técnica que usa cualquier modalidad terapéutica para mejorar el estado clínico de un paciente con esta enfermedad (370).

Los primeros pasos en terapias que no contemplaban trasplante de páncreas, consistieron en la inserción de islotes de cerdo en pacientes diabéticos, lo que se efectuaba introduciéndolos directamente en la vena porta o bajo la cápsula perirenal, además, del tratamiento de inmunosupresión. Si bien se produjo un 60% de rechazo, y el 40% restante mantuvo vivas las células por más de un año, ninguno de los pacientes presentó liberación de insulina al torrente sanguíneo (371).

En 1995 se logró aislar islotes de cerdos neonatales para intentar disminuir el rechazo inmunológico, los resultados mostraron que los niveles intracelulares de insulina habían aumentado hasta 30 veces, pero de igual forma no se logró la liberación de esta hormona en el torrente sanguíneo. Después en 1996 se intentó la introducción de estos islotes en conjunto con el trasplante de mioblastos genéticamente manipulados para que produjeran un ligando que uniría a las células encargadas de la inmunidad, y como consecuencia las células que generan rechazo se autodestruirían mediante una muerte programada o apoptosis, con lo cual se lograría una tolerancia periférica, si bien esto permitió mejorar las condiciones de producción de insulina en los islotes introducidos, faltaba aún mejorar las condiciones de liberación y regulación de esta liberación hormonal (372).

La capacidad para expresar genes en las células pancreáticas es un prerrequisito para muchas formas de terapia génica, la mayoría de los estudios han usado un protocolo en el cual las células de los islotes son transducidas *ex vivo* y después reintroducidas *in vivo*. Para la transferencia de genes se han utilizado métodos como lipofección, electroporación y transferencia de genes mediante vectores. Todos estos métodos son capaces de controlar las condiciones para optimizar la eficiencia de la transferencia de genes y evitar la transferencia de dichos genes a células no islóticas, la desventaja es que las células deben ser introducidas dentro del paciente inmediatamente después de la transducción (373).

La transferencia de genes a células β *in vivo* debería tener implicaciones exitosas para la terapia de diabetes, pero a la fecha no hay estudios que demuestren que esto se haya logrado, sin embargo, la inyección de un vector adenoviral dentro de la arteria pancreática de un páncreas humano intacto *ex vivo*, ha sido reportado con un resultado de transducción de aproximadamente 50% de las células β . Este alto grado de éxito podría ser debido a que los islotes son altamente vascularizados, dando como resultado una eficiente entrada de muchos de los virus inyectados por las células β (374).

El conocimiento exacto de los defectos que generan la diabetes deberán ser bien entendido para identificar que genes deberían ser blancos apropiados para estudios de transferencia génica. Las hipótesis actuales implican varias vías diferentes en la señalización de la insulina, incluyendo defectos en la translocación del transportador de la glucosa GLUT4

a la superficie de la célula, sin embargo, aún no se ha hecho una asociación entre la genética de la población estudiada y la genética molecular de la diabetes (375). La manipulación de las vías que están involucradas con la regulación de los adipocitos tales como aquellos que involucra a la hormona leptina podrían generar una disminución en el tejido adiposo, lo que resultará en un gran mejoramiento de la resistencia a la insulina encontrada en la diabetes tipo 2. Una disminución en la cantidad de adipocitos podría beneficiar la relación de estos con la célula β en el estado diabético, pues los efectos tóxicos de los ácidos grasos sobre la célula β podrían participar en la pérdida eventual de las células β en la diabetes tipo 2. Altos niveles de ácidos grasos producidos por adipocitos no respondientes a la glucosa han sido mostrados como inductores de apoptosis en la célula β . En modelos animales con diabetes tipo 2, la célula β muere por apoptosis, en estos modelos animales podría ser posible prevenir esta pérdida por inhibición de apoptosis o por manipulación en la vía de la leptina (376).

Como es bien sabido, uno de los grandes retos de la ciencia, es encontrar la relación entre los genes de susceptibilidad y los factores ambientales y nutricionales que desencadenan el problema de la diabetes, la búsqueda debe encaminarse a interpretar la relación entre el polimorfismo de los genes y las señales para el control de la glucosa (377).

Recientemente se han desarrollado técnicas para el análisis de la actividad transcripcional de los genes en respuesta al microambiente. El análisis de microarreglos permite evaluar hasta 20 mil genes, el mejor ejemplo es el estudio de tumores, con esta metodología se analizan genes de proliferación, factores de crecimiento, proteínas oncogénicas y proteínas de diferenciación celular mediante el aislamiento del RNA (en pacientes y sujetos control), convertido a DNA y amplificado por PCR con nucleótidos fluoromarcados, las muestras son hibridizadas con los genes conocidos y son colocadas en laminillas. En el caso particular del cáncer, se han mostrado diferentes patrones de expresión, cuando los pacientes entran en periodo de remisión, la expresión de los genes malignos se apaga (378).

En fechas muy recientes se han dado los primeros pasos para entender la expresión diferencial de los genes, mediante análisis de microarreglos de 11 mil transcritos de tejido adiposo de ratones delgados, obesos, y obesos diabéticos, se encontraron 214 transcritos diferentes entre los ratones delgados y obesos. Además se estudiaron animales obesos con diferentes niveles de hiperglucemia y se encontraron 88 genes involucrados con el grado de severidad de la diabetes. Otro estudio de expresión diferencial de genes mostró que ante distintas concentraciones de glucosa, las células β del páncreas mostraron diferencias en la actividad transcripcional en los genes involucrados en la secreción, glucosilación, síntesis de proteínas, señalización y expresión de genes relacionados con su metabolismo (379).

En el futuro, se propone estudiar a los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 mediante el análisis de la actividad transcripcional del órgano afectado (músculo, tejido adiposo) en las siguientes condiciones: paciente controlado con dieta y ejercicio, paciente en las mismas circunstancias pero que recibe medicamentos y pacientes con resistencia a los tratamientos actuales. A la fecha no se han identificado todos aquellos genes responsables de la diabetes de inicio temprano, por tanto es necesario un gran trabajo y esfuerzo para encontrarlos, auxiliándonos para ello en los estudios fisiológicos y de biología molecular, de tal forma que podamos entender completamente las bases genéticas y patofisiológicas de esta enfermedad, para finalmente tener acceso a nuevas terapias que prevengan, retarden o corrijan las alteraciones en la función de la célula β -pancreática característica de este tipo de diabetes, entonces, tal vez sea posible entender el complejo término de resistencia periférica a la insulina y la susceptibilidad de los genes en las distintas poblaciones, en especial en la población mexicana con alto riesgo de padecer la enfermedad (380,381).

BIBLIOGRAFIA

1. Gerich J.E. **The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion vs. impaired insulin sensitivity.** *Endocr. Rev.* 19:491-503. 1998.
2. De Fronzo R.A. **Pathogenesis of type (non-insulin dependent) diabetes mellitus: a balanced overview.** *Diabetologia.* 35:389-397. 1992.
3. Yki-Järvinen H. **Patogénesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus.** *Lancet.* 343:91-95. 1994.
4. Ferrannini E. **Insulin resistance vs. Insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes mellitus: problems and prospects.** *Endocr. Rev.* 19:477-490. 1998.
5. Olefsky JM. **Insulin resistance and the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus: cellular and molecular mechanisms.** *Adv. Exp. Med. Biol.* 334:129-150. 1993.
6. Häring H.U. **Pathogenesis of type II diabetes: are there common cause for insulin resistance and secretion failure?.** *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 107:[Suppl.2]:S17-S23. 1999.
7. Stratton I.; Adler A.; Neil H.; Mathews D.; Manley S.; Cull C.; Hadden D.; Turner R.; Holman R. **Association of glycemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study.** *BMJ.* 321:405-412. 2000.
8. Escobar J.F.; Fernández S.M.L. **Diabetes mellitus.** Editorial: Biblioteca aula médica. 2000.
9. Reaven G.M. **Pathophysiology of insulin resistance in human disease.** *Physiol. Rev.* 75:473-486. 1995.
10. Kahn Ronald. **Patogénesis de la diabetes tipo 2 no insulino dependiente.** *Atlas de Endocrinología.* p.72-73. Aventis. 2000.
11. Haffner S.M.; Stern M.P.; Hazuda H.P.; Mitchell B.D.; Patterson J.K. **Cardiovascular risk factors in confirmed prediabetic individuals. Does the clock for coronary heart disease start ticking before the onset on clinical diabetes?** *J. Am. Med. Assoc.* 263:2893-2898. 1990.
12. Shaw J. **Impaired fasting glucose or impaired glucose tolerance. What best predicts future diabetes in Mauritius.** *Diabetes Care.* 22:399-402. 1999.
13. Tomilehto J. Lindstrom J.; Eriksson J.G.Valle T.T.; Hamalainen H.; Ilanne-Parikka P.; Keinanen-Kiokaaniemi S.; Laakso M.; Louheranta A.; Rastas M.; Salminen V.; Uusitupa M. **Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance.** *N.Engl. J.Med.* 344:1343-1350. 2001.
14. Pan X.R.; Li G.W.; Hu Y.H.; Wang J.X.; Yang W.Y.; An Z.X.; Hu Z.X.; Lin J.; Xiao J.Z.; Cao H.B.; Liu P.A.; Jiang X.G.; Jiang Y.Y.; Wang J.P.; Aheng H.; Zhang H.; Bennett P.H.; Howard B.V. **Effects of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance: the DaQing IGT and Diabetes Study.** *Diabetes Care* 20:537-544. 1997.

15. Diabetes Prevention Program Research Group: **Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin.** N. Engl J. Med. 346:393-403. 2002.
16. Chiasso J.L.; Josse R.G.; Gomis R.; Hanafeld M.; Karasik A.; Laakso M. **Acarbosa for prevention of type 2 diabetes mellitus: the StOP-NIDDM randomized trial.** Lancet. 359:2072-2077. 2002.
17. Sjostrom L. **XENDOS (Xenical in the prevention of diabetes in obese subjects): a landmark study.** Poster presented at the International Congress on Obesity (ICO), San Paulo, Braszil. 2002.
18. Buchanan T.A.; Xiang A.H.; Peters R.X.; Kjos S.L.; Marroquin A.; Goico J.; Ochoa C.; Tan S.; Berkowitz; Hodis H.N.; Azen S.P. **Preservation of pancreatic β -cell function and prevention of type 2 diabetes by pharmacological treatment of insulin resistance in high-risk hispanic women.** Diabetes. 51:2796-2803. 2002.
19. Groop Leif. **Genetic and metabolic heterogeneity of diabetes.** International Diabetes Monitor. 12(4):1-6. 2000.
20. De Fronzo RA, Ferranini E.; **Insulin resistance: A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease.** Diabetes Care. 14(3): 173-194.1991.
21. Zimmet P.; Boyko E.; Collier G. & de Courten M. **The Metabolic Syndrome X.** Vol.892. (eds Hansen B.; Saye J. & Wennogle) 25-44 (New York Academy of Sciences, New York). 1999.
22. Isomaa B. **Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome.** Diabetes Care. 24:683-689. 2001.
23. Wei M.; Gaskill S.; Haffner S.; Stern M. **Effects of diabetes and level of glycemia on all-cause and cardiovascular mortality.** The San Antonio Heart Study. Diabetes Care. 7:1167-1172. 1998.
24. Boden G. **Role of fatty acids in the pathogenesis of insuline resistance and NIDDM.** [published erratum apper in Diabetes 1997 Mar. 46(3):536] Diabetes 46:3-10.1997.
25. UKPDS-Study Group **Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes.** UKPDS 38. Br Med J 317:703-713.1998.
26. Kabadi U.; Vora A.; Kadabi M. **Hyperinsulinemia and central adiposity (Letter).** Diabetes Care. 23:1024-1025. 2000.
27. Deckert T.; Feldt-Rasmussen B.; Borch-Johnsen K. M.; Jensen T.; Kofoed-Envoldsen. **Albuminuria reflects widespread vascular damage.** The Steno hypothesis. Diabetología. 32:219-226.
28. Gall M.; Hougaard P.; Borch-Johnsen K.; Parving H. **Risk factors for development of incipient and overt diabetic nephropathy in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus: prospective, observational study.** BMJ 314:783-788. 1997.
29. Atkinson M.; Maclaren N.K. **The pathogenesis of insulin dependent diabetes.** N.Engl. J.Med. 331:1428-1436. 1996.
30. Cheatham B.; Kahn C.R. **Insulin action and the insulin signaling network.** Endocr. Rev. 16:117-142.1995
31. White M. F.; Kahn C.R. **The insulin signaling system.** J Biol. Chem 269:1-4.1994.

32. Martin B.C.; Warram J.H. Krolewski A.S. **Role of glucose and insulin-resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study.** *Lancet.* 340:925-929. 1992.
33. Lebovitz H.E. **Insulin secretagogues: old and new.** *Diabetes Reviews* 7:139-153. 1999
34. Zimmet Paul.; Alberti K.G.M.; Shaw Jonathan. **Global and societal implications of the diabetes epidemic.** *Nature* 414(6865):782-787. 2001.
35. Bogardus C.; Lillioia S.; Bennett P.H. **Pathogenesis of NIDDM in Pima Indians.** *Diabetes Care.* 14:685-690. 1999.
36. Martin B.C.; Warram J.H.; Rosner B. **Familial clustering of insulin sensitivity.** *Diabetes.* 41:850-854. 1992.
37. Trischitta V.; Frittitta L.; Vigneri R. **Early molecular defects in human insulin resistance: studies in healthy subjects with low insulin sensitivity.** *Diabetes Metab Rev.* 13:147-162.1997
38. Polonsky K.S.; Sturns J.; Bell G. **Non-insulin dependent diabetes mellitus a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance.** *N. Engl. J.Med.* 334:777-784. 1996.
39. Shulman G. **Cellular mechanisms of insulin resistance.** *J.Clin. Invest.* 106:171-176. 2000.
40. Wing R.R.; Blair E.H.; Bononi P.; Marcus M.D.; Watanabe R.; Bergman R.N.; **Caloric restriction per se is a significant factor in improvements in glycemc control and insulin sesitivity durin weight loss in obese NIDDM patients.** *Diabetes Care.* 17:30-36. 1994.
41. Rosenblom A.; Joe J.; Young R.; Winter W. **Emerging epidemic of Type 2 diabetes in youth.** *Diabetes Care.* 22:345-354. 1999.
42. American Diabetes Asociation: **Type 2 diabetes in children and adolescents.** (Concensus Statement). *Diabetes Care.* 23:382-389. 2000.
43. American Diabetes Association: **Gestational diabetes mellitus** (Position Statement). *Diabetes Care* 26 (Suppl 1):S103-S105. 2003.
44. Fajans S.S.; Bell G.I. Bowden D.W. **Maturity-onset diabetes of the young.** *Life Sci.* 55:314-422. 1994.
45. Fajans S.S., Brown M.B. **Administration of sulfonylureas can increase glucose-induced insulin secretion for decades in patients with maturity-onset diabetes of the young (MODY).** *Diabetes Care.* 16:1254. 1993.
46. Fajans S.S. Cohn J.W. **Prediabetes, subclinical diabetes and latent clinical diabetes: interpretation, diagnosis and treatment.** In: Leibel B.S., Wrenshall G.A. eds. *On the nature and treatment of diabetes.* Serial no. 84. New York. International Congress. 1965.
47. Tattersall R.B. **Mild familial diabetes with dominant inheritance.** *Q.J. Med.* 43:339. 1974.
48. Tattersall R.; Fajans S. **A difference between the inheritance of classical juvenile onset and maturity onset type type of diabetes.** *Diabetes.* 24:44-53. 1975.
49. Cammdige P.J. **Diabetes mellitus and heredity.** *Br. Med. J.* 2:739. 1928.
50. Häring H.U. **Pathogenesis of type 2 diabetes: are there common cause for insulin resistance and secretion failure.** *Exp Clin Endocrinol. Diabetes* 107[Suppl 2]:S17-S23. 1999.
51. **Report of Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.** *Diabetes Care.* 22[Suppl 1]: S5-S19. 1999.

52. Expert Committee on the Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus: **Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of Diabetes Mellitus.** Diabetes Care 26 (supl.1):S5-S20. 2003.
53. Fajans S.S. **Scope and heterogeneous nature of MODY.** Diabetes Care. 13:49-64. 1990.
54. Fajans S.S. **Maturity-onset diabetes of the young.** Diabetes Metab Rev 5:579-606. 1989.
55. Froguel P.; Zouali H.; Velho G. **Familial hiperglicemia due to mutations in the glucokinase gene.** N. Engl. J. Med. 328:697-702. 1993.
56. Doria A.; Yang Y.; Malecki M. **Phenotypic characteristics of early-onset autosomal-dominant type 2 diabetes unlinked to known maturity-onset diabetes of de young (MODY) genes.** Diabetes Care. 22:253. 1999.
57. Hsiang-Po Huang.; Ming-Jer Tsai. **Transcription Factors involved in Pancreatic Islet Development.** J. Biomed Sci. 7:27-34. 2000.
58. Zimmet P. **Globalization, coca-colonization and the chronic disease epidemic: can the doomsday scenario be averted?.** J. Intern. Med. 247:301-310. 2000.
59. Marceau P.; Biron S.; Hould FS.; Marceau S.; Simard S.; Thung S.N.; Kral J.G. **Liver pathology and metabolic syndrome X in severe obesity.** J Clin Endocrinol Metab. 84: 1513-1517.1999.
60. Harrison L.; Kay T.; Colman P.; & Honeyman M. **Diabetes in the New Millennium** (eds Turtle. J. & Osato S.) 85-100 (The Endocrinology and Diabetes Research Foundation of the University of Sydney. Sydney 1999.
61. Astrup A. & Finer N. **Redefining type 2 diabetes: "diabesity" or "obesity dependent diabetes mellitus"?** Obesity Rev. 1:57-59. 2000.
62. King H.; Aubert R. & Herman W. **Global burden of diabetes, 1995-2025. Prevalence, numerical estimates and projections.** Diabetes Care. 21:1414-1431. 1998.
63. Amos A.; MacCarty D. & Zimmet P. **The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010.** Diabetic Med. 14:S1-S85. 1997.
64. Flegal K.M., Ezzati M., Harris M.I. **Prevalence of diabetes in Mexican-Americans, Cubans and Puerto Ricans from the Hispanic Health and Nutrition Examinations Survey, 1982-1984.** Diabetes Care. 14:628. 1991.
65. Knowler W.C., Pettitt D.J., Saad M.D., Bennett P.H. **Diabetes Mellitus in the Pima Indians: incidence, risks factors and pathogenesis.** Diabetes Metab Rev. 6:1. 1990.
66. Zimmet P. **Diabetes epidemiology as a trigger to diabetes research.** Diabetologia. 42:499-518. 1999.
67. Haffner S.M. **Epidemiology of type 2 diabetes: risk factors.** Diabetes Care. 21 [Suppl 3]:C3. 1998.
68. Sepúlveda J. **Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas.** Dirección General de Epidemiología. SSA. 1993.
69. O'Rahilly S.; Spivey R.S., Holman R.R. **Type II diabetes of early onset: a distinct clinical ang genetics syndrome?** BMJ. 294:923-928. 1987.
70. Aguilar Salinas C., Rojas R.; Gómez Pérez M., Garcia E., Valles V., Rios Torres J., Franco Aurora., Olaiz G., Sepúlveda J., Rull M. **Prevalence and Characteristics of early-onset type 2 diabetes in México.** The American Journal of Medicine. 113:569-574. 2002.
71. Mather H.M., Keen H. **The southall diabetes survey: prevalence of known diabetes in asians and europeans.** Br Med J. 291:1081-1084. 1985.

72. Ramachandran A., Snehalatha C., Kapur A. **High prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance in India: National Urban Diabetes Survey.** *Diabetología.* 44:1094-1101. 2001.
73. Rios Burrows N.; Geiss L. Engelgau M., Acton K. **Prevalence of diabetes among native American and Alaska natives 1990-1997.** *Diabetes Care.* 23:1786-1790. 2000.
74. Gardner L.I., Stern M.P., Haffner S.M. et.al. **Prevalence of diabetes in mexican americans: relationship to percent of gene pool derived from native american sources.** *Diabetes.* 33:86-92. 1984.
75. Neufeld N., Raffel L., Landon C. **Early presentation of type 2 diabetes in Mexican-American Youth.** *Diabetes Care.* 21:80-86. 1998.
76. González Villalpando C. **El estado del arte en diabetes. Análisis de logros a nivel internacional y la perspectiva nacional.** Mimeo. México, Fundación Mexicana para la Salud. 1989.
77. Secretaría de Salud. **Encuesta Nacional de Salud (ENSA) 2000.** México, 2000.
78. World Health Organization Study Group. **Prevention of diabetes mellitus.** Technical Report 884. WHO Geneva. 1995.
79. García J., Ríos J., Castañeda R., **Algunos aspectos clínicos y epidemiológicos de la diabetes mellitus.** *Rev. Sal. Pub. Méx.* 39:669-673. 1989.
80. Isselbacher K.; Braunwald E.; Wilson J.; Martin J.; Kasper D. **Principios de Medicina Interna.** 13a. Ed. Vol. II. Interamericana McGraw Hill. 1994.
81. Collins P.M., Ferrier R.J., **Monosaccharides: Their Chemistry and their roles in natural products.** John Wiley & Sons, Chichester, Inglaterra.
82. Murray R.; Granner D.; Mayes P.; Rodwell V. **Bioquímica de Harper.** Ed. Manual Moderno. 2001.
83. Aspinall G.O. **The polysaccharides.** Vols 1. Academic Press. Inc. Nueva York. 1895.
84. Lehmann J. **Carbohydrates: Structure and Biology.** Thieme, Verlag. Nueva York. 1998.
85. Pikiš S.J., Granner D.K. **Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis.** *Annu. Rev. Physiol.* 54:885-909. 1992.
86. Fell D. **Understanding the control of metabolism.** Portland Press. Miami. 1997.
87. Wilson.; Foster. **Endocrinología.** 7a. Ed. Panamericana. 1989.
88. Phillips D., Blake C. Watson H. **The enzymes of glycolysis: Structure, Activity and evolution.** *Philos. Trans. R. Soc. Lond. [Biol].* 293:1-214. 1981.
89. Barford D., Hu S., Johnson L. **Structural mechanism for glycogen phosphorylase control by phosphorylation and AMP.** *J.Mol.Biol.* 218:233-260. 1999.
90. Wood T. **Physiological functions of the pentose phosphate pathway.** *Cell Biochem. Funct.* 4:241-247.
91. Meléndez-Hevia E., Waddell T. Shelton E. **Optimization of molecular design in the evolution of metabolism: the glycogen molecule.** *Biochem. J.* 295, 477-483. 1993.
92. Heinrich R., Meléndez-Hevia., Montero F., Nuno J., Stephani A., Wadell T. **The structural design of glycolysis: an evolutionary approach.** *Biochem. Soc. Trans.* 27:261-264. 1999.
93. Opdenakker G. Rudd P., Pointing C. Dwek R. **Concepts and principles of glycolysis.** *FASEB J.* 7:1330-1337. 1993.
94. Lienhard F., Slot J., James D., Mueckler M. **How cells absorb glucose.** *Sci. Am.* 266:86-91. 1992.
95. Mueckler M. **Facilitative glucose transporter.** *Eur. J. Biochem.* 219:713-725. 1994.

96. Chayen J., Howat D., Bitensky L. **Cellular biochemistry of glucose 6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenase activities.** Cell Biochem. Funct. 4:249-253. 1986.
97. Easom R.A. **CaM kinase II: A protein kinase with extraordinary talents germane to insulin exocytosis.** Diabetes 1999. (In press).
98. Susuki K., Kono T. **Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77:25-42. 1987.
99. Lang J. **Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion.** Eur. J. Endocrinol. 259:3-17.1999.
100. Seatter M.; Gould G. **The mammalian facilitative glucose transporter (GLUT) family.** Pharm. Biotechnol 12:201-228. 1999.
101. Hollenbeck C.; Reaven G. **Variations in insulin-stimulated glucose uptake in healthy individuals with normal glucose tolerance.** J.Clin. Endocrinol. Metab. 64:1169-1173. 1987.
102. Pilkins S.; Granner D.; **Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis.** Annu.Rev.Physiol. 54:885-909. 1992.
103. Pilkins S., Claus T. **Hepatic gluconeogenesis/glycolysis: regulation and structure/function relationships of substrate cycle enzymes.** Annu. Rev. Nutr. 11:465-515. 1991.
104. Crapo L. **Hormones: The messengers of Life.** Freeman and Company. Nueva York. 1985.
105. Botero D., Danon M. Brown R. **Symptomatic non-insulin dependent diabetes during therapy with recombinant growth hormone.** J. Pediatr. 123:590. 1993.
106. Bratusch M., Smith D., DeFronzo R. **The effects of growth hormone on glucose metabolism and insulin secretion in man.** J. Clin Endocrinol Metab. 55:973. 1982.
107. Wajngot A., Giacca A., Grill V. **The diabetogenic effects of glucocorticoids are more pronounced in low-than in high-insulin responders.** Proc Natl Acad Sci USA. 89:6035. 1992.
108. Caro J.; Amatruda J. **Glucocortioinduced insulin resistanse. The importance of postbinding events in the regulation of insulin binding actino and degradation in freshly isolated hepatocytes.** J Biol Chem. 250:8389. 1982.
109. Lehr S., Herbst M., Kampermann J. **Adrenaline inhibits depolarization induced increases in capacitance in the presence of elevated intracellular calcium concentration in insulin secreting cells.** FEBS Lett. 415:1-5. 1997.
110. Malbon C.; Campbell R. **Thyroid hormones regulate hepatic glycogen synthase.** Endocrinology. 115:681-686. 1984.
111. Dimitriadis G.; Leighton B.; Vlachonikolis I. **Effects of hyperthyroidism on the sensitivity of glycolysis and glycogen synthesis to insulin in the soleus muscle of the rat.** Biochem J. 253:87-92. 1988.
112. Holness M., Sugden M. **Hepatic carbon flux after re-feeding hyperthyroidism blocks glycogen synthesis and the suppression of glucose output.** Biochem J. 255:90-97. 1990.
113. Nelson D., Cox M. Lehninger. **Principios de Bioquímica.** Omega. 2001.
114. Alberts.; Bray.; Lewis.; Raff.; Roberts.; Watson. **Biología Molecular de la célula.** 3ª. Ed. 1994.
115. Kornberg R. **Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA.** Science. 184:868-871. 1974.

116. Lorch Y., Cairns B., Zhang M., Kornberg R. **Activated RSC-nucleosome complex and persistently altered form of the nucleosome.** *Cell.* 94:29-34. 1998.
117. Beato M.; Eisfeld K. **Transcription factor access to chromatin.** *Nucleic acids Res.*25:3559-3563.1997.
118. Roeder A., Rutter W. **Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms.** *Nature.* 224:234-237. 1969.
119. McKnight S., Tjian R. **Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells.** *Cell.* 46:795-805. 1986.
120. Dynan W.S. **Modularity in promoters and enhancers.** *Cell.* 58:1-4.1989.
121. Bautz E., Bautz F. **Initiation of RNA synthesis: The function of sigma in the binding of RNA polymerase to promoter sites.** *Nature.* 226: 1219-1222. 1970.
122. Matsui T. Segall J., Weil P., Roeder R. **Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II.** *J. Biol. Chem.* 255:11992-11996. 1980.
123. Dynan W., Tjian R. **The promoter-specific factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter.** *Cell.* 35:79-87. 1983.
124. Guarente L. **Regulatory Proteins in yeast.** *Annu. Rev. Genet.* 21:425-452. 1987.
125. Johnson P., Landschulz W., Graves B., Mcknight S. **Identification of a rat liver nuclear protein that binds to the enhancer core element on three animal viruses.** *Genes & Dev.* 1:133-146. 1987.
126. Hahn S., Buratowski S., Sharp P., Guarente L. **Isolation of the gene encoding the yeast TATA binding protein TFIID: A gene identical to the SPT15 suppressor of Ty element insertions.** *Cell.* 58:1173-1181. 1989.
127. Hansensen SK.; Takada S.; Jacobson RH.; Lis JT.; Tjian R. **Transcription properties of a cell type-specific TATA-binding protein, TRF.** *Cell* 91:71-83.1997.
128. Pugh B., Tjian R. **Mechanism of transcriptional activation by Sp1: Evidence for coactivators.** *Cell.* 61:1187-1197. 1990.
129. Tanese N.; Pugh B.; Tjian R. **Coactivators for a proline-rich activator purified from the multisubunit human TFIID complex.** *Genes & Dev.* 5:2212-2224. 1991.
130. Dynlacht B.D.; Hoey T.; Tjian R. **Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation.** *Cell.* 66:563-576.1991.
131. Brown C.; Lechner T.; Howe L.; Workman J. **The many HATs of transcription coactivators.** *Trends Biochem. Sci.* 25:15-19. 2000.
132. Onate S.; Tsai S.; Tsai M.; O'Malley B. **Sequence and characterization of a co-activator for the steroid hormone receptor superfamily.** *Science.* 270:1354-1357. 1995.
133. Goodrich JA; Cutler G.; Tjian R. **Contact in context: Promoter specificity and macromolecular interactions in transcription.***Cell.*84:825-830.1996.
134. Lenardo M.; Baltimore D. **NF-kappa B: A pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control.** *Cell.* 58:227-229. 1989.
135. Lozano T.; Galindo C.; García-Dorrón M.; Martínez L.; Peñafiel G.; Solano M. **Bioquímica y Biología Molecular para Ciencias de la Salud.** 2ª. Ed. MacGraw-Hill Interamericana. 2000.
136. Ptashne M. **How eukaryotic transcriptional activators work.***Nature* 335:683-689.1988.
137. Chi T.; Liebman P.; Ellwood K.; Carey M. **A general mechanism for transcriptional synergy by eukaryotic activators.** *Nature.*377:254-257.1995.

138. Ptashne M. and Gann A. **Transcriptional activation by recruitment.** *Nature.* 386:569-577. 1997.
139. Maniatis T.; Goodbourn S.; Fischer J.A.; **Regulation of inducible and tissue-specific gene expression.** *Science.* 236:1237-1245.1987.
140. Pabo C.; Sauer R. **Transcriptions factors: structural factors and principles of DNA recognition.** *Annu. Rev. Biochem.* 61:1053-1095. 1992.
141. Mitchell P.J.; Tjian R. **Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins.** *Science.* 245:371-378.1989.
142. Lewin B. **Genes VII.** Oxford University Press, Nueva York. 2000.
143. Schleif R. **Genetics and molecular Biology.** 2a. Ed. The Johns Hopkins University Press. Baltimore. 1993.
144. Griffiths A.; Gerbart W.; Miller J.; Lewontin R. **Genética Moderna.** Interamericana-McGraw-Hill, México. 2000.
145. Ikeda K.; Halle J.; Stelzer G.; Meisterernst M.; Kawakami K. **Involvement of negative cofactor NC2 in active repression by zinc finger-homeodomain transcription factor.** *AREB6. Mol. Cell. Biol.* 18:10-18. 1998.
146. McKnight D. **Molecular zippers in gene regulation.** *Sci. Am.* 264:54-64. 1991.
147. Buratowski S.; Hahn S.; Guarente L.; Sharp P.A. **Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II.** *Cell* 56:549-561.1989.
148. Lai E.; Darnell J. **Transcriptional control in hepatocytes: A window on development.** *Trends Biochem. Sci.* 16:427-430. 1991.
149. Jacob F., Monod J. **Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins.** *J. Mol. Biol.* 3:318-356. 1961.
150. Kornberg R. **RNA polymerase II transcription control.** *Trends Biochem. Sci.* 21: 325-326. 1996.
151. Struhl K. **Yeast transcriptional regulatory mechanisms.** *Annu. Rev. Genet.* 29:651-674. 1995.
152. Luque J.; Herráez Angel. **Biología Molecular e Ingeniería Genética.** Harcourt. 2000.
153. Yoshinaga S., Peterson C.; Herskowitz I.; Yamamoto K. **Roles of SWI1, SWI2 and SWI3 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors.** *Science.* 258:1598-1604. 1992.
154. Samuels M.; Fire A.; Scharp P. **Separation and Characterization of factors mediating accurate transcription by RNA polymerase II.** *J.Biol. Chem.* 257:14419-14427. 1982.
155. Forrester W.; Van Genderen C.; Grosschedl R. **Dependence of enhancer-mediated transcription of the immunoglobulin *mugene* on nuclear matrix attachment regions.** *Science.* 265:1221-1225. 1994.
156. Gasser S.M.; Laemmli U.K.; **Cohabitation of scaffold binding regions with upstream/enhancer elements of three developmentally regulated genes of *D.melanogaster*.** *Cell.* 46:521-539.1986.
157. Sun X.; Zhang Y.; Cho H.; Rickert P.; Lees E.; Reinberg D. **NAT, a human complex containing *Srb* polypeptides that functions as a negative regulator of activated transcription.** *Mol. Cell.* 2:213-222. 1998.
158. Reece R.; Platt A. **Signaling activation and repression of RNA polymerase II transcription in yeast.** *Bioessays.* 19:1001-1010. 1997.
159. Thummel C. **Mechanisms of transcriptional timing in *Drosophila*.** *Science.* 255:39-40.1992.
160. Conaway R.C.; Conawa J.W. **General initiatons factor for RNA Polymerasa II.** *Annu. Rev Biochem.* 2:161190.1993.

161. Andel F.; Laduner AG.; Inouye C.; Tjian R.; Nogales E.; **Three-dimensional structure of the human TFIID-IIA-IIB complex**. Science 286:2153-2156.1999.
162. Goodrich J.; Hoey T.; Thut C.; Admon A.; Tjian R. **Drosophila TAFII40 interacts with both a VP16 activation domain and the basal transcription factor TFIIB**. Cell. 75:519-530. 1993.
163. Brand M.; Leurent C.; Mallouh V.; Tora L.; Schultz P. **Three-dimensional structures of the TAFII-containing complexes TFIID and TFTC**. Science. 286:2151-2153. 1999.
164. Burley S.K.; Roeder R. **Biochemistry and structural biology of transcription factor IID(TFIID)**. Annu Rev.Biochem.65:769-799.1996.
165. Cho H.; Orphanides G.; Sun X.; Yang XJ.; Ogrysko V.; Lees E. **A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure**. Mol.Cell Biol. 18:5355-5363.1998.
166. Green M. **TBP-associated factors (TAFIs): Multiple, selective transcriptional mediators in common complexes**. Trends Biochem. Sci. 25:59-63. 2000.
167. Wieczorek E.; Brand M.; Jacq X.; Tora I. **Function of TAF(II)-containing complex without TBP in transcription by RNA polymerase II**. Nature. 393:187-191. 1998.
168. Chen J.; Attardi L.; Verrijzer C.; Yokomori k.; Tjian R. **Assembly of recombinat TFIID reveals diferential coactivator requeriments for distinct transcriptional activators**. Cell. 79:93-105. 1994.
169. Yokomori K.; Zeidler M.; Chen J.; Mlodzik M.; Tjian R. **Drosophila TFIIA directs cooperative DNA binding with TBP and mediates transcriptional activation**. Genes & Dev. 8:2313-2233. 1994.
170. Mannervik M.; Nibu Y.; Zhang H.; Levine M. **Transcriptional coregulators in development**. Science. 284:606-609. 1999.
171. Pugh B. **Mechanisms of transcription complex assembly**. Curr. Opin. Cell Biol. 8: 303-311. 1996.
172. Tirode F.; Busso D.; Egly J. **Reconstitution of the transcription factor TFIIF: Assignment of functions for the three enzymatic subunits, XPB, XPD and cdk7**. Mol. Cell. 3:87-95. 1999.
173. Buratowski S. **The basic of the basal transcription by RNA polymeraseII**.Cell 77:1-3.1994.
174. Sun X.; Sheldon M.; Yeung K.; Reinberg D. **Reconstitution of human TFIIA activity from recombinant polipeptides: a role in TFIID-mediated transcription**. Genes. & Dev. 8:2336-2348.1994.
175. Orphanides G.; Lagrande T.; Reinberg D. **The general transcription factors of RNA polymerase II**. Genes & Dev. 10:2657-2683. 1996.
176. McCracken S.; Rosonina E.; Fong N.; Beyer A.; Bentley D. **Role of RNA polymerase II carboxy-terminal domain in coordinating transcriptionwith RNA processing**. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 63:301-309. 1998.
177. Bentley D. **Coupling RNA polymerase II transcription with pre-mRNA processing**. Curr Opin. Cell. Biol. 11:347-351. 1999.
178. Lin Y.; Gree M. **Mechanism of action of an acidic transcriptional activator in vitro**. Cell. 64:971-981. 1991.
179. Diamond M.I.; Miner J.N.; Yoshinaga S.K.; Yamamoto K.R.; **Transcription factor interations: selector of positive or negative regulation from a single DNA element**. Science 249:1266-1272.1990.

180. Tyler J.; Kadonaga J. **The "dark side" of chromatin remodeling: Repressive effects on transcription.** *Cell.* 99:443-446. 1999.
181. Horikoshi M.; Hai T.; Lin Y.S.; Green M.R.; Roeder R.G.; **Transcription factor ATF interacts with the TATA factor to facilitate establishment of preinitiation complex.** *Cell.* 54:1033-1042.1988.
182. Bushnell D.A.; Bamda C.; Kornberg R.D. **A minimal set of RNA polymerase II transcription protein interactions.** *J Biol Chem* 271:20170-20174.1996.
183. Wang W.; Xue Y.; Zhou S.; Kou A., Crabtree G. **Diversity and specialization of mammalian SW1/SNF complexes.** *Genes & Dev.* 10:2117-2130. 1996.
184. Struhl K. **Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms.** *Genes & Dev.* 12:599-606. 1998.
185. Koleske A.; Young R. **An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators.** *Nature.* 368:466-469. 1994.
186. Parvin J.; Young R. **Regulatory targets in the RNA polymerase holoenzyme.** *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8:565-570. 1998.
187. Reines D.; Conaway R.; Conaway J. **Mechanism and regulation of transcriptional elongation by RNA polymerase II.** *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11:342-346. 1999.
188. ZawalL.; Kumar K.; Reinberg D. **Recycling of the general transcription factor during RNA polymerase II transcription.** *Genes & Dev.* 9:1479-1490. 1995.
189. Kimura H.; Tao Y.; Roeder R.; Cook P. **Quantitation of RNA polymerase II and its transcription factors in an HeLa cell: Little soluble holoenzyme but significant amounts of polymerases attached to the nuclear substructure.** *Mol.Cell.Biol.* 19:5383-5392. 1999.
190. Chao D.; Gadbois E.; Murray P.; Young R. **A mammalian SRB protein associated with an RNA polymerase II holoenzyme.** *Nature.* 380:82-85. 1996.
191. Ferreira J.; Palolella G.; Ramos C.; Lamond A. **Spatial organization of large-scale chromatin domains in the nucleus: A magnified view of single chromosome territories.** *J. Cell Biol.* 139:1597-1610. 1997.
192. Croft J.; Bridger J.; Boyle S.; Perry P.; Bickmore W. **Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus.** *J. Cell Biol.* 145:1119-1131. 1999.
193. Verschure P.; Van Der Kraan.; Manders E.; Van Driel R. **Spatial relationship between transcription sites and chromosome territories.** *J. Cell. Biol.* 147:13-24. 1999.
194. Cockerill P.; Garrard W. **Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites.** *Cell.* 44:273-282. 1986.
195. Andrulis E.; Neiman A.; Zappulla D.; Sternglanz R. **Perinuclear localization of chromatin facilitates transcriptional silencing.** *Nature* 394:592-595. 1998.
196. Jenuwein T.; Forrester W.; Fernandez H.; Laible G.; Dull M.; Grosschedl R. **Extension of chromatin accessibility by nuclear matrix attachment regions.** *Nature.* 385:269-272. 1997.
197. Fakan S.; Hernandez V.D. **The nucleolus and the nucleolar organizer regions.** *Biol.Cell.* 56:189-205.1986.
198. Scheer U.; Hock R. **Structure and function of the nucleolus.** *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11:385-390. 1999.
199. Gall JG.; Bellini M.; Wu Z.; Murphy C.; **Assembly of the nuclear transcription and processing machinery:Cajal bodies (coiled bodies) and transcriptosomes.** *Mol.Biol.Cell.*10:4385-4402.1999.

200. Matera A. **Nuclear bodies: Multifaceted subdomains of the interchromatin space.** Trends Cell Biol. 9:302-309. 1999.
201. Huang S.; Deerinck T.; Ellisman M.; Spector D. **The perinucleolar compartment and transcription.** J.Cell Biol. 143:35-47. 1998.
202. Zeng C.; Kim E.; Warren S.; Berget S. **Dynamic relocation of transcription and splicing factors dependent upon transcriptional activity.** EMBO J. 16:1401-1412. 1997.
203. Wei X.; Somanathan S.; Samarabandu J.; Berezney R. **Three-dimensional visualization of transcription sites and their association with splicing factor-rich nuclear speckles.** J.Cell. Biol. 146:543-558. 1999.
204. Pombo A.; Cuello P.; Schul W.; Lon J.; Roeder R.; Murphy S. **Regional and temporal specialization in the nucleus: A transcriptionally-active nuclear domain rich in PTF. Oct1 and PIKA antigens associates with specific chromosomes early in the cell cycle.** EMBO J. 17:1768-1778. 1998.
205. Brown C.; Guest S.; Smale S.; Fischer A. **Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin.** Cell. 91:845-854. 1997.
206. Hahm K.; Cobb K.; McCarty A.; Brown E.; Klug C.; Smale S. **Helios, a T cell-restricted Ikaros family member that quantitatively associates with Ikaros at centromeric heterochromatin.** Genes & Dev. 12:782-796. 1998.
207. Edmondson D.; Roth S. **Chromatin and transcription.** FASEB. 10: 1173-1182. 1996.
208. Permutt M.A.; Chiu K.; Ferrer J. **Genetics of type 2 diabetes.** Recent Prog. Horm. Res. 53:216. 1998.
209. Barnett A.; Leslie R. **Diabetes in identical twins: a study of 200 pairs.** Diabetologia. 20:87-93. 1981.
210. Medici F.; Hawa A.; Lanari A. **Concordance rate for type II diabetes mellitus in monozygotic twins: actuarial analysis.** Diabetologia. 42: 146. 1999.
211. Kawate R.; Yamakido M.; Bennett P.; Hamman R. **Diabetes mellitus and its complications in Japanese migrants on the island of Hawaii.** Diabetes Care. 2:161. 1989.
212. Timan G.; Karir P.; Mohan V. **A genetic analysis of type 2 diabetes mellitus in Punjabi Sikhs and British caucasoid patients.** Diabetic Med. 4:526-530. 1997.
213. Cruz M.; Montoya C.; Gutiérrez M.; Wachter N.H.; Kumate J. **Polimorfismo de genes relacionados con diabetes tipo 2.** Rev. Med. IMSS. 40(2):113-125.2002.
214. Pillay T.S.; Langlois W.J.; Olfesky J.M. **The genetics of non-insulin diabetes mellitus.** Adv. Genet 32: 51-97.1995.
215. Rich S. **Mapping genes in diabetes: genetic epidemiological perspective.** Diabetes; 39(11): 1315-1319. 1990.
216. Neufeld N.D.; Raffel L.J.; Landon C.; Chen Y.D.; Vadheim C.M. **Early presentation of type 2 diabetes in Mexican- American youth.** Diabetes Care. 37:103. 1998.
217. Cox N.J.; Frigge M.; Nicolae D.L. **Loci on chromosomes 2 (NIDDM1) and 15 interact to increase susceptibility to diabetes in mexican americans.** Nat Genet. 21:213. 1999.
218. Ghosh S.; Watanaber R.; Hauser E. **Type 2 diabetes: evidence for linkage on chromosome 20 in 716 Finnish affected sib pairs.** Proc Natl Acad Sci USA. 96:2198. 1999.
219. Fajans S.S. **Scope and heterogeneous nature of MODY.** Diabetes Care. 13:49-64. 1990.

220. Johnson G.; Todd J. **Strategies in complex disease mapping.** *Curr Opin Genet Dev.* 10(3):330- 334. 2000.
221. Velho G. and Frogue P. **Genetic metabolic and clinical characteristics of maturity onset diabetes of the young.** *Eur. J. Endocrinol.* 138:233-239. 1998.
222. Fajans S.S.; Bell G.I.; Bowden D.W.; Halter J.B.; Polansky K.S. Minireview: **Maturity onset diabetes of the young.** *Life Sci* 55:413-422. 1994.
223. Ledermann H.M. **Is maturity onset diabetes ay young age (MODY) more common in Europe than previously assumed?.** *Lancet.* 345:648.1995.
224. Chevre J.C. **Mutation screening in 18 caucasian families suggest the existence of other MODY genes.** *Diabetología.* 41:1017-1023. 1995.
225. Frayling T.M. **Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene are a common cause of maturity-onset diabetes of the young in the U.K.** *Diabetes.* 46:720-725.1997.
226. Cereghini S. **Liver-enriched transcription factor and hepatocyte differentiation.** *FASEBJ* 10: 267-282.1996.
227. Iwasaki N.; Ogata M.; Tomonaga O.; Kuroki H.; Kasahara T.; Yano N.; Iwamoto Y. **Liver and kidney function in japanese patients with maturity-onset diabetes of the young.** *Diabetes care.* 21: 2144-2148.1998.
228. Kahn S.E. **The importance of [beta]-cell failure in the development and progression of type 2 diabetes.** *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 86:4047-4058. 2001.
229. Tronche F.; Ringeisen F. Blumenfeld M.; Yaniv M.; Pontoglio M. **Analisis of the distribution of binding sites for a tissue-specific transcription factor in the vertebrate genoma.** *J.Mol. Biol.* 266:231-245. 1997.
230. Jonas J.C.; Sharma A.; Hasenkamp W. **Chronic hyperglycemia and loss of β -cell differentiation.** *J Biol Chem.* 1999.
231. Gordon C. W.; Bonner Weir S.; Sharma Arun. **Regulación de la secreción de Insulina y de la función de las células de los islotes.** *Atlas de endocrinología Clínica.* T. I. Capitulo 1. p 1. 2000.
232. Barrio R.; Bellanne-Chantelot.; Moreno J.; Morel V.; Calle H.; Alonso M. **(MODY) Candidate Genes in 22 Spanish Families.** *J. Clin Endocrinol Metab.* 87(6):2532-9. 2002.
233. Byrne M.M.; **Altered insulin secretory responses to glucose in subjects with a mutation in MODY1 gene on chromosome 20.** *Diabetes.* 44:699-704.1995.
234. Sladek F.; Zhong W.; Lai E.; Darnell J. **Liver-enriched transcription factor HNF-4 α is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily.** *Genes Dev.* 4:2353-2365. 1990.
235. Stoffel M.; & Duncan S.A. **The maturity-onset of de young (MODY1) transcription factor HNF4 α regulates expressions of genes required for glucose transport and metabolism.** *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13209-13214.1997.
236. Hertz R.; Magenheim.; Berman Bar-Tana. **Fatty acyl-Coathioesters and ligands o nuclear factor 4-alpha.** *Nature.* 392:512-516. 1998.
237. Yamagata K.; Furuta H.; Oda N.; Kaisaki P.J.; Menzel S.; Cox N.J.; Fajans S.S.; Signorini S.; Stoffel M.; Bell G.I. **Mutations in the hepatocyte nuclear factor 4 alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY 1).** *Nature* 384:458-460. 1996.
238. Ladias J.; Hadzopoulou-Cladaras M.; Kardassi D., **Transcriptional regulation of human apolipoprotein genes ApoB, ApoCIII and Apoya by members of the steroid hormone receptor superfamily HNF-4, ARP-1, EAR-2 and EAR-3.** *J.Biol. Chem.* 267:15849. 1992.

239. Fajans S.; Bell G.; Herman W. **Natural history, genetics and pathogenesis of HNF-4 α /MODY1: a 40 year prospectivestudy of the RW pedigree.** In: Motschinsky F.; Magnuson M.; eds. Research symposium on MODYs as paradigm of the pathogenesis of type 2 diabetes. Basal: Karger. 1999.
240. Tronche F.; Yaniv M. **HNF1, a homeoprotein member of the hepatic transcription regulatory network.** Bio. Essays. 14:579-587. 1992.
241. Mendel D.; Khavari P.A.; Conley P.B.; Graves M.K.; Hansen L.P. **Characterization of a cofactor that regulates dimerization of a mammalian homeodomain proteins.** Science. 254:1762-1767. 1991.
242. Vaxillaire M. **MODY3 mutations affect transcriptional activity of hepatocyte nuclear factor 1 alpha.** Diabetologia 41 (suppl.1): 719-185. 1998.
243. Pontoglio M. **Defective insuline secretion in hepatocyte nuclear factor 1 α deficit mice.** J. Clin. Invest. 101:359-365. 2000.
244. Isomaa B. **Chronic diabetic complications in patient with MODY3 diabetes.** Diabetologia. 41. 467-473. 1998.7(abstr.). 1998.
245. Shih D. **Loss of HNF-1alpha function in mice leads to abnormal expression of genes involved in pancreatic islet development and metabolism.** Diabetes. 50:2472-2480. 2001.
246. Ellard S. **Hepatocyte Nuclear Factor 1 Alpha (HNF-1 α) Mutations in Maturity-Onset Diabetes of the Young.** Human Mutation 16: 377-385. 2000.
247. Byrne M.; Sturis J.; Menzel S. **Altered insulin secretory responses to glucose in diabetic and nondiabetic subjects with mutations in the diabetes mellitus susceptibility gene MODY 3 on chromosome 12.** Diabetes. 45:1503. 1996.
248. Menzel S.; Kaisaki.; Menzel R.; Rjasanowski I.; Sahm J.; Lederman H.; Sachse G.; Kerner W. **Phenotype of human hepatocyte nuclear factor 1 α mutations: diabetes late complications, and glucosuria (Abstract).** Diabetologia 408 (Suppl.1): A161. 1997.
249. Bulman M.P.; Pues H.; Ryffel G.U.; Hattersley A.T. **Functional analysis of mutation in hepatocyte nuclear factor 1 alpha to investigate MODY genotype/phenotype relationships.** DIABET Med. 16 suppl.1:A81,27. 1999.
250. Iwasaki N.; Oda N.; Ogata M. **Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 α /MODY3 gene in Japanase subjects with early and late-onset NIDDM.** Diabetes. 46:1504. 1996.
251. Stoffers D.; Zinkin N.; Stanojevic V.; Clarke W.; Habener J. **Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence.** Nat Genet. 15 106-110. 1997.
252. Ahlgren U.; Johsson J.; Honsson L. **β -cell specific inactivation of the mouse Ipf1/Pdx1 gene results in loss β -cell phenotype and maturity onset diabetes.** Genes Dev. 12:1763. 1998.
253. Haber J.F.; Soffers D.A. **A newly discovered role of transcription factors involved in pacreas development and the pathogenesis of diabetes mellitus.** Pross Asoc am physicians 110(19):12-21. 1998.
254. Jonsson J.; Carisson L.; Edlund T.; and Edlun H. **Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice.** Nature 371: 606-609. 1994.
255. Stoffers D.A.; Ferrer J.; Clarke W.L.; Habener J.F. **Early-onset type II diabetes mellitus (MODY 4) linked to IPF-1.** Nat Genet. 17:138-139. 1997.

256. Waeber G.; Thompson N.; Nicod P.; Bonny C. **Transcriptional activation of the GLUT2 gene by the IPF-1/STF-1/IDX-1 homeobox factor.** *Mol Endocrinol.* 10:1327-1334. 1996.
257. Stoffers D.A.; Satanojevic V.; Habener J. **Insuline promotor factor-1 gen mutation linked to early-onset type 2 diabetes mellitus directs expression of a dominant negative isoprotein.** *J Clin Invest.* 102:232-241. 1999.
258. Horikawa Y. **Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 β gene (TCF2) associated with MODY.** *Nat Genet.* 17 384-385. 1997.
259. Peyton M.; Moss L.; Tsai M. **Two distinct class A helix-loop-helix transcription factor E2A and BETA1, form separate DNA binding complexes on the insulin gene E box.** *J Biol Clin.* 259:25936. 1994.
260. Naya M.; Stellrecht C.; Tsai M.; **Tissue- specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix -loop-helix transcription factor.** *Genes Dev.* 9:1009. 1995.
261. Malecki M.T.; Jhala U.; Antonellis A. **Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus.** *Nature Genetics.*23:323-8. 1999.
262. Naya F.; Huang H.; Qiu Y.; Mutoh H.; De Mayo F.; Leiter A.; Tsai M. **Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice.** *Genes Dev.* 11:2323-2334. 1999.
263. Hattersley A.T. **Maturity-onset diabetes of the young: clinical heterogeneity explained by genetic heterogeneity.** *Diabet Med.* 15:15-24. 1998.
264. Moller A.; Urhammer S.; Dalgaard L. **Studies of the genetic variability of the coding region of the hepatocyte nuclear factor-4 α in Caucasians with maturity onset NIDDM.** *Diabetologia.* 40:980. 1997.
265. Cox R.; Southam L.; Hashim Y. **UKPDS 31: hepatocyte nuclear factor-1 alpha /the MODY 3 gene) mutation in late onset type II diabetic patients in the United Kingdom.** *Diabetologia.* 42:120. 1999.
266. McFarlane W.; Frayling T. **Missense mutations in the insulin promoter factor 1 gene predispose to type 2 diabetes.** *J. Clin Invest.* 104:R33. 1999.
267. Ghosh S.; Watanabe R.; Hauser E. **Type 2 diabetes evidence for linkage on chromosome 20 in 716 Finish affected sib pairs.** *Proc Natl Acad Sci. USA.* 96:2198. 1999.
268. Hegele R.; Cao H.; Harris S. **The hepatic nuclear factor-1 α G319S variant is associated with early onset type 2 diabetes in Canadian Oji-Cree.** *J Clin Endocrinol Metab.* 84:1077. 1999.
269. Urhammer S.; Fridberg M.; Hansen T. **A prevalent amino acid polymorphism at codon 98 in the hepatocyte nuclear factor 1- α gene is associated with reduced serum C-peptide and insulin responses to an oral glucose challenge.** *Diabetes.* 46:912. 1997.
270. Urhammer S.; Hansen T.; Ekstrom C. **The Ala/Val98 polymorphism of the hepatocyte nuclear factor 1 α gene contributes to the interindividual variation in serum C-peptide response during an oral glucose tolerance test: evidence from studies of 231 glucose-tolerant first degree relatives of type 2 diabetes probands.** *J Clin Endocrinol Metab.* 83:4506. 1998.
271. Mc Carthy M.I.; Froguel P.; Hitma G. **The genetics of non-insulin-dependent diabetes mellitus: tools and aims.** *Diabetologia.* 37:957-969. 1994.
272. Zhang Y.; Warren-Perry P.J.; Saker A. **Candidate gene studies in pedigrees with maturity-onset diabetes of the young not linked with glucokinase.** *Diabetologia.* 38:1055-1060.1995.

273. Watada H.; Scheel DW.; Leung J.; German M. **Distinct gene expression programs function in progenitor and mature islet cells.** *J Biol Chem* [epub ahead of print].2003.
274. Tusié M.T. **La genética de la diabetes mellitus tipo 2: genes implicados en la diabetes de aparición temprana.** *La revista de investigación Clínica.* 52(3).296-305.2000.
275. Kahn C.; Banting Lecture. **Insulin action, diabetogenes and the cause of type II diabetes.** *Diabetes.* 43:10066. 1994.
276. Rotter J.; Valdheim C.; Rimoin D. **Genetics of diabetes mellitus** In: Rifkin H., Porter D. eds. *Diabetes mellitus: theory and practice.* New York. Elsevier: 378. 1990.
277. Iwasaki N.; Cox NJ.; Wang YQ.; Schwarz PE. **Mapping genes influencing type 2 diabetes risk and BMI in Japanese subjects.** *Diabetes* 52(1):209-213.2003.
278. Sanke T.; **Diagnostic use of gene polymorphisms for type 2 diabetes.** *Rinsho Byori.*50(9):871-876.2002.
279. Orita M.; Suzuki Y.; Sekiya T.; Hayashi K.; **Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction.** *Genomics.* 5:874-878. 1995.
280. Shih D.; Heimesaat M.; Kuwajima S.; Stein R.; Wright CV.; Stoffel M. **Profound defects in pancreatic beta-cell function in mice with combined heterozygous mutations in Pdx-1, HNF-1alpha. And HNF-3beta.** *Proc Natl Acad Sci. USA* 99(6): 3818-3823.2002.
281. Hinokio Y.; Horikawa M. Bell G. **Mutations in the hepatocyte nuclear factor-3 β gene in Japanese subjects with MODY.** 48:A182. 1999.
282. Dohrmann C. Gruss P.; Lemaire I. **Pax genes and the differentiation of hormone-producing endocrine cells in the pancreas.** *Mech Dev.* 92:47-54. 2000.
283. Berry C. **Development and pathology: The Pax gene.** *J. Pathol.* 197:279-280. 2002.
284. Smith S.; Ee H.; Conners J.; German M. **Paired-homeodomain transcription factor PAX4 acts as a transcriptional repressor in early pancreatic development.** *Mol Cell Biol.* 19:8272-80. 1999.
285. Fujitani Y.; Kajimoto Y.; Yasuda T.; Matsuoka T.; Kaneto H.; Umayahara Y.; Fujita N.; Watada H.; Miyazaki J.; Yamasaki Y.; Hori M. **Identification of a portable repression domain and an E1A-responsive activation domain in Pax4: a possible role of Pax4 as a transcriptional repressor in the pancreas.** *Mol Cell Biol.* 12:8281-91. 1999.
286. Sosa-Pineda B.; Chowdhury K.; Torres M.; Oliver G.; Gruss P. **The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas.** *Nature.* 386:399-402. 1997.
287. Smith S.; Ee H.; Conners J.; German M. **Paired-homeodomain transcription factor Pax4 acts as a transcriptional repressor in early pancreatic development.** *Mol. Cell Biol.* 19:8272-8280. 1999.
288. Inoue H.; Momiyama J.; Nakai K.; Matsutani A.; Tanizawa Y.; Oka Y. **Isolation of full-length cDNA of mouse PAX4 gene and identification of its human homologue.** *Biochem Biophys Res Commun.* 243:628-33. 1998.
289. Brink C.; Chowdhury K.; Gruss P. **Pax4 regulatory elements mediate beta cell specific expression in the pancreas.** *Mech Dev.* 2001. 100:37-43.

290. St-Qnge L.; Sosa-Pineda B.; Chowdhury K.; Mansouri A.; Gruss P. **Pax 6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cell in mouse pancreas.** *Nature.* 387:406. 1997.
291. Sander M.; Neubuser A.; Kalamaras J.; Ee H.; Martín G.; German M. **Genetic análisis reveals that Pax 6 is required for normal transcription of pancreatic hormones genes and islet development.** *Genes Dev.* 11:1662. 1997.
292. Hartmann B.; Lee P.; Kang Y.; Tomarev S. de Couet H.; Callaerts P. **Pax6 in the sepiolid squid *Eupryma scolopes*: evidence for a role a eye, sensory organ and brain development.** *Mecg Dev* 120:177-83. 2003
293. Turque N.; Plaza S.; Radvayi F.; Carriere C.; Saule S.; **Pax-QNR/Pax6, a paired box-snd homeobox-containing gene expressed in neurons, is also expressed in pancreatic endocrine cells.** *Mol Endocrinol.* 8:929. 1994.
294. Tang H.; Chao L.; Saunders G. **Functional analysis of paired box missense mutations in the Pax 6 gene.** *Hum Mol. Genet.* 6:381-386. 1997.
295. Cisell MA.; Zhao L.; Sussel L.; Henderson E.; Stein R.; **Transcription factor occupancy of the insulin gene in vivo. Evidence for direc regulation by Nkx2.2.** *J Biol. Chem* 278(2): 751-756.2003.
296. Price M.; Lazzaro D.; Pohl T.; Mattei MG.; Rüter U. **Regional expression of the homebox gene Nkx-2,2 in the developing mammalian forebrain.** *Neuron* 8:241-255. 1992.
297. Sander M.; Sussel L.; Conners J.; Scheel D.; Kalamaras J.; De la Cruz F.; Schwitzbegel V.; Hayes-Jordan A.; German M. **Homeobox gene Nkx2 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas.** *Development* 127(24): 5533-5540.2000.
298. Sussel L.; Kalamaras J.; Hartigan-O'Connor D.; Meneses J.; Pedersen R.; Rubenstein J.; German M.; **Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells.** *Development.* 125:2213-2221. 1998.
299. Madsen O.; Jensen J.; Petersen H.; Pedersen E.; Oster A.; Andersen F.; Jorgensen M.; Jensen P.; Larsson L.; Serup P. **Transcription factors contributing to the pancreatic beta-cell phenotype.** *Horm. Metab. Res.* 29:265-270. 1997.
300. Mirmira R.; Lau J.; German M. **Functional role of transcription factor Nk6.1 in pancreatic beta-cell differentiation.** In: *The Endocrine Society's 81 st Annual Meeting San Diego. Calif. Ju ne 12-15. p.68.* 1999.
301. Ahlgren U.; Pfait S.; Jessell T. Edlund T.; Edlun H. **Independent requeriment fos Isl-1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells.** *Nature.* 385:257-260. 1997.
302. Wang M.; Drucker D.J.; **The Lim domain homeobox gene isl-1 is a positive regulator of islet cell-specific proglucagon gene transcription** *J. Biol Chem.* 270:126412652.1995.
303. Nakamura T.; Kishi A.; Nishio Y.; Maegawa H.; Egawa K.; Wong NC.; Kojima H. **Insuline production in a neuroectodermal tumor that expresses islet factpr-1, but no pancreatic-duodenal homeobox 1.** *J Clin. Endocrinol Metab* 86(4): 1795-18000.2001.
304. Shimomura H.; Sanke T.; Hanabusa T. **Nonsense mutation in the ISL-1 gene (Q310X) found in a type 2 diabetic patient with a strong family history.** *Diabetes.* 48:A405. 1999.
305. Leonard J.; Serup P.; Gonzalez G.; Edlun T.; Montminy M. **The LIM family transcription factor Isl-1 requires cAMP response element binding protein to promote**

- somatostatin expression in pancreatic islet cells.** Proc Natl Acad Sci USA 89:6247-6551. 1992.
306. Harrison K. Thaler J.; Plaff S.; Gu H.; Kehrl J. **Pancreas dorsal lobe agenesis and abnormal islets of Langerhans in Hlb9-deficient mice.** Nat Genet. 23(1):71-5. 1999.
307. Fode C.; Gradwohl G.; Morin X.; Dierich A.; LeMeur M.; Goriadis C.; Guillemot F.; **The bHLH protein NEUROGENIN 2 is a determination factor for epibranchial placode-derived sensory neurons.** Neuron 20: 483-494. 1998.
308. Schwitzgebel V.; Scheel D.; Conners J.; Kalamaras J.; Lee J.; Anderson D.; Sussel L.; Johnson J.; German M. **Expression of neurogenin 3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas.** Development 127: 3533-3543. 2000.
309. Lee J.; Wu Y.; Xue H.; Liu Y.; Sheel D.; German M.; Qiu M.; Guillemot F.; Rao M. **Neurogenin 3 participates in gliogenesis in the developing vertebrate spinal cord.** Dev Biol 253(1):84-98.2003.
310. Gradwohl G.; Dierich A.; LeMeur M.; Guillemot F. **Neurogenin 3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas.** Proc Natl Acad Sci USA 97:1607-1611. 2000.
311. Tontonoz P.; Hu E.; Graves R.; Budavari A.; Spiegelman B. **MPPAR gamma 2: Tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer.** Genes Dev. 8(10):1224-1234. 1994.
312. Glass C.; Rosenfeld M. **The co-regulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors.** Genes Dev. 14(2):121-141. 2000.
313. Lehmann J.; Moore L.; Smith-Oliver T.; Wilkinson W.; Willson T.; Kliewer S. **An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisomes proliferation-activated receptor gamma (PPAR-gamma).** J. Biol Chem. 270(22):12953-12956. 1995.
314. Barroso L.; Gurnell M.; Crowley VEF.; Agostini M.; Schwabel J.; Soos M. **Dominant negative mutations in human PPAR-gamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension.** Nature. 402(6764):880-883. 1999.
315. Yen C.; Beamer B.; Negri C.; Silver K.; Brown K.; Yarnall D. **Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma (hPPAR-gamma) gene in diabetic caucasians: Identification of a pro12ala PPAR-gamma-2 missense mutation.** Biochem Biophys. Res Commun. 24(2):270-274. 1997.
316. Ek J.; Urhammer S.; Sorensen T.; Andersen T.; Auwerx J.; Pedersen O. **Homozygosity of the Pro12Ala variant of the peroxisome proliferation-activated receptor-gamma 2 (PPAR-gamma 2): divergent modulating effects on body mass index in obese and lean caucasian men.** Diabetologia. 24(7):892-895. 1999.
317. Tontonoz P.; Hu E.; Spiegelman B. **Stimulation of adipogenesis in fibroblast by PPAR-gamma 2, a lipid-activated transcription factor.** Cell. 79(7):1147-1156. 1994.
318. Carafoli E.; Molinari M. **Calpain: A proteasa in search of function?.** Biochem Biophys Res Commun 247(2):193-203. 1998.
319. Dear N.; Matena K.; Vingron M.; Boehm T. **A new subfamily of vertebrate calpain lacking a calmodulin-like domain: Implications for calpain regulation and evolution.** Genomics. 45(1):175-184. 1997.
320. Horikawa Y. Oda N.; Cox N.; Li X.; Orho-Melander M.; Hara M. **Genetic variation in the gene encoding calpain-10 associated with type 2 diabetes mellitus.** Nat Genet. 26(2):163-175. 2000.

321. Baier L.; Permana P.; Yang X.; Portley R.; Hanson R.; Chen G. **A calpain-10 gene polymorphism is associated with reduces muscle mRNAs levels and insulin resistance.** J Clin Invest. 106:R69-R73. 2000.
322. Saido T.; Sorimachi H.; Suzuki K. **Calpain: New perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement.** FASEB J. 8(11):814-822. 1994.
323. Steiner D.; Bell G.; Tager H. **Chemistry and biosynthesis of pancreatic protein hormones.** De Groot L. et al. Endocrinology. Philadelphia: WB Saunders. 75. 1989.
324. Owerbach D.; Nerup J. **Restriction fragment length polymorphism of the insulin gene in diabetes mellitus.** Diabetes. 31:275. 1989.
325. Phillips D. **Insulin resistance as a programmed response to fetal undernutrition.** Diabetologia. 39:1119. 1996.
326. Olansky L.; Janssen R.; Welling C.; Permutt M. **Variability of the insulin gene in American blacks with NIDDM. Analysis by single-strand conformational polymorphisms.** Diabetes. 41:742. 1992.
327. Gruppuso P.; Gorden p.; Kahn C. **Familial hyperproinsulinemia due to a proposed defect in conversion of proinsulin to insulin.** N Engl J Med. 311:629. 1984.
328. Kishimoto M.; Sakura H.; Hayashi K. **Detection of mutations in the human insulin gene by single strand conformation polymorphisms.** J. Clin Endocrinol Metab. 4:1027. 1992.
329. Warren-Perry M.; Mussett S.; Morris R. **A novel point mutation in the insulin gene giving rise to hyperproinsulinaemia.** Diabetes. 44:162A. 1995.
330. Haring H.; Mehnert H. **Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: candidates for a signal transmitter defect causing insulin resistance of the skeletal muscle.** Diabetologia. 36:176. 1993.
331. Lok S.; Kuijper J.; Jelinek L. **The human glucagon receptor encoding gene: structure, cDNA sequence and chromosomal localization.** Gene. 140:203. 1994.
332. Hager J.; Hansen L.; Vaisse C. **A missense mutation in the glucagon receptor gene is associated with non-insulin-dependent diabetes mellitus.** Nat Genet. 9:299. 1995.
333. Gough S.; Saker P.; Pritchard L. **Mutation of the glucagon receptor gene and diabetes mellitus in the UK, association or founder effect?** Hum Mol Genet. 4:1609. 1995.
334. Babadjanova G.; Reincke M.; Mora P. **Polymorphism of the glucagon receptor gene and non-insulin-dependent diabetes mellitus in the Russian population.** Exp Clin Endocrinol Diabetes. 105:225. 1997.
335. Tonolo G.; Melis M.; Ciccarese M. **Physiological and genetic characterization of the Gly40Ser mutation in the glucagon receptor gene in the Sardinian population.** The Sardinian Diabetes Genetic Study Group. Diabetologia. 40:89. 1997.
336. Huang X.; Orho M.; Lehto M.; Groop L. **Lack of association between the Gly40Ser polymorphism in the glucagon receptor gene and NIDDM in Finland.** Diabetologia. 38: 1246. 1995.
337. Ogata M.; Iwasaki N.; Ohgawara H. **Absence of the Gly40Ser mutation in the glucagon receptor gene in Japanese subjects with NIDDM diabetes.** Res Clin Prac.33: 71. 1996.
338. Tonolo G.; Melis M.; Ciccarese M. **Glucagon receptor receptor Gly40Ser amino acid variant in Sardinian hypertensive non-insulin-dependent diabetic patients.** Sardinian Genetic Study Group. Acta Diabetol. 34:75. 1997.

339. Prochazka M.; Lillioja S.; Tait J. **Linkage of chromosomal markers on 4q with putative gene determining maximal insulin action in Pima Indians.** *Diabetes.* 42:514. 1993.
340. Mitchell B.; Kammerer C.; O'Connell P. **Evidencia for linkage of postchallenge insulin levels with intestinal fatty acid-binding protein (FABP2) in Mexican-Americans.** *Diabetes.* 44:1046. 1995.
341. Baier L.; Sachettini J.; Knowler W. **An amino acid substitution in the human intestinal fatty acid binding protein is associated with increase fat oxidation, and insulin resistance.** *J Clin Invest.* 95:1281. 1995.
342. Hayakawa T.; Nagai Y.; Nohara E. **Variations of the fatty acid binding protein 2 gene is not associated with obesity and insulin resistance in Japanese subjects.** *Metabolism.* 48:655 1998.
343. Rissanen J.; Pihlajamaki J.; Heikkinen S. **The Ala54Thr polymorphism of the fatty acid binding protein 2 gene does not influence insulin sensitivity in Finnish nondiabetic and NIDDM subjects.** *Diabetes.* 46:711. 1977.
344. Agren J.; Valve R.; Vidgren H. **Postprandial lipemic response is modified by the polymorphism at codon 54 of the fatty acid-binding protein 2 gene.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18:1606. 1998.
345. Hansen L.; Hansen T.; Vestergaard H. **A widespread amino acid polymorphism at codon 905 of the glycogen-associated regulatory subunit of protein phosphatase-1 is associated with insulin resistance and hypersecretion of insulin.** *Hum Mol Genet.* 4:1313. 1995.
346. Shen G.; Ikegami H.; Kawaguchi Y. **Asp905Tyr polymorphis of the gene for the skeletal muscle-specific glycogen-targetin subunit of protein phosphatase 1 in NIDDM.** *Diabetes Care.* 21:1086. 1998.
347. Xia J.; Scherer S.; Cohen P. **A common variant in PPP1R3 associated with insulin resistance and type 2 diabetes.** *Diabetes.* 47:1519. 1998.
348. Baier L.; Wiedrich C.; Hanson R.; Bogardus C. **Variant in the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase(p85alpha): preliminary evidence indicates a potencial role of this variant in the acute insulin response and type 2 diabetes in Pima Women.** *Diabetes.* 47: 973. 1998.
349. Hansen T.; Andersen C.; Echwald S. **Identification of a common amino acid polymorphism in the p85alpha regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase; effects on glucose disappearance constant, glucose effectiveness, and the insulin sensitivity index.** *Diabetes.* 46:494. 1997.
350. Sanke T.; Bell G.; Sample C. **Islet amyloid peptide is derived from an 89-amino acid precursor by proteolytic processing.** *Biol Chem.* 263:17243. 1998.
351. Clark A. **Islet amyloid and type 2 diabetes.** *Diabetic Med.* 6: 561. 1989.
352. Gebre-Medhin S.; Mulder H.; Pekny M. **Increased insulin secretion and glucose tolerance in mice lacking islet amyloid polypeptide (amylin).** *Biochem Biophys Res Commun.* 250: 271. 1998.
353. Sakagashira S.; Sanke T.; Habanusa T. **Missense mutation of amylin gene (S20G) in Japanese NIDDM patients.** *Diabetes.* 45:1279. 1996.
354. Birch C.; Fagan L.; Armstrong M. **The S20G islet-associated polypeptide gene mutation in familial NIDDM.** *Diabetologia.* 40:1113. 1997.
355. Tanizawa Y.; Riggs A.; Elbein S. **Human Glucagon-like peptide-1 receptor gene NIDDM. Identification and use of simple sequence repeat polymorphisms in genetic analysis.** *Diabetes.* 43:752. 1994.

356. Zhang Y.; Cook J.; Hattersley A. **Non-linkage of the glucagon-like peptide 1 receptor gene with maturity onset diabetes of the young.** *Diabetologia.* 37: 721. 1994.
357. Norman A.; Frankel J.; Heldt A.; Grodsky G. **Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin.** *Science.* 209:823. 1980.
358. Baynes K.; Boucher B.; Feskens E.; Kromhout D. **Vitamin D. Glucose tolerance and insulinaemia in elderly men.** *Diabetologia.* 40:344. 1997.
359. Hitman G.; Mannan N.; McDermott M. **Vitamin D receptor gene polymorphism influence insulin secretion in Bangladeshi Asians.** *Diabetes.* 47: 688. 1998.
360. Chiu K.; Ryu J.; Tsai G. **Association between vitamin D receptor gene polymorphism and insulin resistance.** *Diabetes.* 48: A410. 1999.
361. Yagui K.; Shimada F.; Mimura M. **A missense mutation in the CD38 gene, a novel factor for insulin secretion: association with type II diabetes mellitus in Japanese subjects and evidence of abnormal function when expressed in vitro.** *Diabetologia.* 41:1024. 1998.
362. Weir G.; Sharma A.; Zangen D. **Transcription factor abnormalities as a cause of beta cell dysfunction in diabetes: a hypothesis.** *Acta Diabetol* 34:177-184. 1997.
363. Elbein S.; Gruppuso P.; Schwartz R. **Hyperproinsulinemia in a family with proposed defect in conversion is linked to the insulin gene.** *Diabetes.* 34:821-824. 1985.
364. Cox N.; Bell G. **Perspectives in diabetes. Disease associations chance, artifact or susceptibility genes?** *Diabetes.* 38:947-950. 1989.
365. Keen H. **The genetics of diabetes: from nightmare to headache.** *Brit. Med J.* 294:917-919. 1987.
366. Fajans S. **MODY: a model for understanding the pathogenesis and natural history of type II diabetes.** *Horm Meta Res* 19:391. 1987.
367. Bennett P.; Knowler W.; Baird H.; Butler J. **Diet and development of non-insulin-dependent diabetes mellitus: an epidemiological perspective.** In: Pozza G.; Micossi P.; Catapano A., eds. *Diet, diabetes and atherosclerosis.* New York. Raven Press. 109. 1989.
368. Meyers R.; Lumelsky N.; Lerman L.; Maniatis T. **Detection of single base substitutions in total genomic and DNA polymorphisms.** *Nature.* 313:495. 1989.
369. Celi F.; Cohen M.; Antonaraki S. **Determination of gene dosage by a quantitative adaptation of the polymerase chain reaction (qd-PCR): rapid detections of deletions and duplications of genes sequences.** *Genomics.* 21:304. 1994.
370. Rhodes C.; Alarcon C. **What β -cell defect could lead to hyperproinsulinemia in NIDDM: Some clues from recent advances made in understanding the proinsulin conversion mechanism.** *Diabetes.* 43:511-517. 1994.
371. Frieman E. **Advanced glycosylated end products and hyperglycemia in the pathogenesis of diabetic complications.** *Diabetes Care.* 22(supl 2): B65-B71. 1999.
372. Verma B.; Somia N. **Gene therapy –promises, problems and prospects.** *Nature.* 389:239-242. 1999.
373. Levine F.; Leibowitz G. **Toward gene therapy of diabetes mellitus.** *Molecular Medicine Today.* 5:165-171. 1999.
374. Levine F. **Gene therapy for diabetes: strategies for beta-cell modification and replacement.** *Diabetes Metab Rev.* 13:209-249. 1999.
375. Leibowitz G. **Gene transfer to human pancreatic endocrine cell using viral vector.** *Diabetes.* (in press)

376. Crystal R. **Transfer of genes humans: Early lessons and obstacles to success.** Science. 270::404-410. 1995.
377. Friedmann T. **Overcoming the obstacles to gene therapy.** Sci Am. 276:96-101. 1997.
378. Shimabukuru M. **Protection against lipoapoptosis of β -cell through leptin-dependent maintenance of Bcl-2 expression.** Proc Natl Acad Sci USA. 95:9558-9561. 1998.
379. Bailey J.E. **Toward a science of metabolic engineering.** Science. 252: 1668-1675. 1991.
380. Blaese R. **Gene therapy for cancer.** Sci. Am. 276:111-115. 1997.
381. Brown P.; Botstein D. **Exploring the new world of the genome with DNA microarrays.** Nat. Genet. 21:33-37. 1999. Mahowald M.; Verp M.; Anderson R. Genetic counseling: clinical and ethical challenges. Annu. Rev. Genet. 32:547-559. 1998.
382. Celis J.; Gromova I.; Frederiksen C.; Ostergaard M.; Thykjaer T. **Gene expression profiling: Monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics.** FEBS. 480:2-16. 2000.
383. Webb G.; Akbar M., Zhao C.; Steiner D. **Expression profiling of pancreatic beta cells: Glucose regulation of secretory and metabolic pathway genes.** Proc Natl Acad Sci. 97:5773-5778. 2000.