



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"BUSQUEDA DE VARIANTES POLIMORFICAS DEL GEN NEUROD1/BETA2 EN POBLACION MEXICANA"

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

NOMBRE: Sánchez Pozos Katy Alejandra
FECHA: 12/Mar/04
FIRMA: [Firma manuscrita]

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

KATY ALEJANDRA SANCHEZ POZOS



MEXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

Jurado Asignado

Presidente **Prof. José Pedraza Chaverri**

Vocal **Profa. Ma. de los Angeles Granados Silvestre**

Secretario **Profa. Marta Alicia Menjívar Iraheta**

1er. Suplente **Profa. Ma. Guadalupe Ortiz López**

2°. Suplente **Prof. Antonio Ulises López Gutiérrez**

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Química Clínica, Departamento de Biología, Edificio B. Facultad de Química, UNAM.

Laboratorio de Endocrinología molecular, Hospital Juárez de México, México, D. F.

Asesor: Dra. Marta Alicia Menjívar Iraheta

Supervisor Técnico: Dra. María Guadalupe Ortiz López

Sustentante: Katy Alejandra Sánchez Pozos



The image shows three handwritten signatures, each written on a horizontal line. The top signature is the most legible and appears to be 'Marta Alicia Menjívar Iraheta'. The middle signature is 'María Guadalupe Ortiz López'. The bottom signature is less legible but appears to be 'Katy Alejandra Sánchez Pozos'.

*A mis padres y
a mi hermano*

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de tesis se realizó gracias al apoyo de CONACYT, proyecto 40518.

Agradezco a la Dra. Marta Menjívar por todo su apoyo, paciencia y comprensión.

Agradezco a la Dra. Guadalupe Ortiz, también por su apoyo, por su paciencia, por los jalones de orejas y por su comprensión.

Agradezco a todos mis compañeros del Laboratorio de Endocrinología Molecular del Hospital Juárez de México, por su apoyo y ayuda en todo momento.

Agradezco a mis padres, por su apoyo, no sólo para la realización de mis estudios y mis sueños, sino por todo lo que me han dado, porque sin ellos no sería la persona que soy.

Agradezco a mi hermano y hermana Liz, por su cariño y por su tiempo.

Agradezco a mi tía Martha, a mi tío Fernando, a mi tía Josefina y a mi tía Eugenia, por su ayuda, por su apoyo y por su cariño.

Agradezco en especial a mi tía Argely, porque mucho de lo que soy y de lo que anhelo se lo debo a ella.

Agradezco a mis amigos: Tomás, Rosario, Hebe, Adriana, Alejandro, Alfredo, Rodolfo, Paola, Emilio, Jaime, Juan, Luz, Dulce Islas, Norma, Ovidio y los que me faltan, por su cariño, comprensión y tolerancia en todo momento.

INDICE

RESUMEN.....	1
ANTECEDENTES.....	4
Páncreas.....	5
Embriología.....	6
Factores de Transcripción.....	7
Metabolismo de Carbohidratos.....	14
Insulina.....	14
Diabetes Mellitus.....	16
Complicaciones.....	17
Clasificación.....	17
NeuroD1/BETA2.....	21
HIPÓTESIS.....	24
OBJETIVO.....	26
MATERIAL Y METODOS.....	28
RESULTADOS.....	42
DISCUSIÓN.....	58
CONCLUSIONES.....	63
BIBLIOGRAFÍA.....	65
APENDICE 1.....	76
APENDICE 2.....	82

I. RESUMEN

I. RESUMEN

La diabetes mellitus se caracteriza por una alteración en el metabolismo de carbohidratos, cuya principal manifestación es la hiperglicemia.

La diabetes mellitus se puede clasificar como diabetes insulino dependiente o tipo I y diabetes tipo 2 o no insulino dependiente. Dentro de la diabetes mellitus tipo 2, se encuentra una variedad conocida como MODY (del inglés Maturity Onset Diabetes of the Young), una forma monogénica de la diabetes, que se caracteriza por tener un patrón de herencia autosómico dominante y una edad de aparición temprana (por lo general por debajo de los 25 años). Se han identificado seis genes relacionados con la diabetes tipo MODY, entre los que se encuentran: el de la enzima glucocinasa (MODY2), los factores de transcripción, tales como el factor nuclear hepático 4 α (HNF-4 α) (MODY1) y el factor nuclear hepático 1 α (HNF-1 α) (MODY3); el factor promotor de insulina-1 (IPF1) (MODY4), el factor nuclear hepático 1- β (HNF-1 β) (MODY5) y el factor 1 de neurodiferenciación (NEUROD1) (MODY6).

El factor de transcripción NeuroD1/BETA2, forma parte de la familia hélice-asa-hélice (bHLH), contiene dos exones y se encuentra en la banda 2q32 del cromosoma humano. Se expresa en el sistema nervioso central, intestino y páncreas. Asimismo, se ha demostrado en estudios con ratones que una deficiencia de este factor de transcripción causa defectos en la morfología del islote, reducción del número de células β , desarrollo de hiperglicemia y diabetes.

En varios países se han realizado estudios que han demostrado que mutaciones en el gen NeuroD1/BETA2 están relacionadas con el desarrollo de diabetes tipo MODY6. En Japón se encontró, que el cambio A45T estaba relacionado con la aparición de diabetes mellitus tipo 1, mientras que en otros países, como en el caso de Polonia se relacionó con diabetes mellitus tipo 2.

Por todo lo mencionado anteriormente, se considera importante llevar a cabo un estudio, que nos permita saber si la variabilidad genética de NeuroD1/BETA2 juega un papel en la aparición de diabetes mellitus tipo 2 en la población mexicana.

El estudio se llevó a cabo con 20 controles, ocho hombres y doce mujeres. Con una edad igual o mayor a 50 años, un IMC ≤ 25 Kg/m² y además no contaban con antecedentes heredo familiares de diabetes de al menos dos generaciones. Se les tomó una muestra de sangre para la extracción del ADN. Se diseñaron los oligonucleótidos y se realizó el PCR correspondiente para cada exón en cada una de las muestras. Los productos de PCR se desnaturalizaron y se sometieron a una electroforesis, en un gel de poliacrilamida a diferentes concentraciones de ésta, para detectar los polimorfismos mediante el patrón de migración del ADN. Las muestras que tuvieron un patrón de migración diferente fueron secuenciadas, encontrándose el cambio de una guanina por una adenina en el exón 2-1 del gen NeuroD1/BETA2, de la muestra C11, lo cual corresponde a una sustitución de una alanina por una treonina en el codón 45 (A45T). Asimismo, se encontraron otros dos cambios de base, para la muestra C3 en el exón 2-2 una guanina cambiaba por una adenina; mientras que para la muestra C17 en el exón 2-3, el cambio fue de una citosina por una guanina, no obstante ninguno de estos cambios produjo alteración en la secuencia de aminoácidos de la proteína.

En resumen, la evaluación molecular del gen NeuroD1/BETA2, mostró la presencia de una única variante, un cambio de alanina por treonina en el codón 45 y dado que los resultados fueron obtenidos de personas sanas, esto indica que se trata de un polimorfismo. Asimismo, el hecho de que sólo se haya encontrado una variante polimórfica presente en la mitad de las personas evaluadas, sugiere que este gen presenta poca variabilidad, aunque alta prevalencia en la población. Por otro lado, dado que el cambio A45T ya había sido reportado en otras poblaciones, se puede decir que se trata de una variante polimórfica ampliamente distribuida en el mundo.

II. ANTECEDENTES

II. ANTECEDENTES

EL PÁNCREAS

El páncreas es una glándula de secreción, que se encuentra recubierta por una capa de tejido conectivo, de la que parten septos y tabiques que contienen los vasos de irrigación, los colectores de secreción exocrina y las fibras nerviosas (1).

El páncreas está alojado entre la primera, segunda y tercera porción del duodeno. Se dirige oblicuamente a la izquierda y su longitud oscila entre 15 y 20 cm, tiene una anchura de unos 3.8 cm y un grosor de 1.3 a 2.5 cm (Fig. 1) (1).

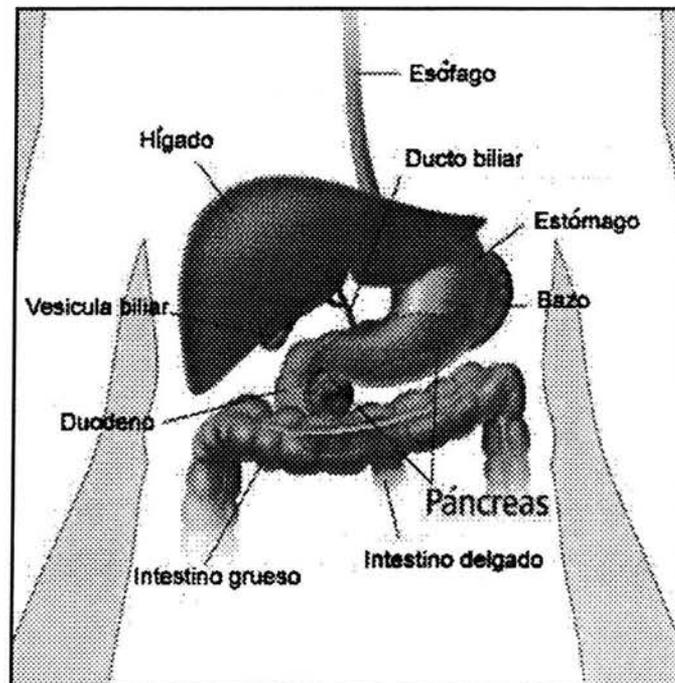


Fig. 1 Localización del páncreas en el humano.

El páncreas consta de dos porciones una exocrina y una endocrina. La porción exocrina se encarga de la excreción de un conjunto de enzimas digestivas (jugo pancreático) que se liberan en el intestino para ayudar en la digestión. Mientras que la porción endocrina está formada por los islotes de Langerhans, que contienen cuatro diferentes tipos de células: las células α (productoras de glucagon), las células β (productoras de insulina), las células δ (productoras somatostatina) y las células PP (productoras del polipéptido pancreático), las

células α y β tienen un papel muy importante en la regulación de la homeostasis de glucosa (2).

El buen funcionamiento del páncreas es esencial en la regulación de la homeostasis de la glucosa, la cual se encuentra relacionada con enfermedades tan importantes como la diabetes. Es de este modo, que se despertó el interés de muchos científicos por estudiar el páncreas, llevando así al descubrimiento de factores de transcripción, involucrados en la regulación del desarrollo y buen funcionamiento de éste.

Embriología del páncreas

Existen muchas similitudes entre el desarrollo del páncreas en ratón y en humanos, sin embargo es en el ratón, en el que se han realizado un mayor número de estudios, y del que se tiene más información. De esta manera, se sabe que una vez que se producen las señales inductivas apropiadas, se inicia la morfogénesis del páncreas, la cual en el ratón, es alrededor del día 9.5 (Fig. 2) y en el humano es alrededor del día 26, a partir de la aparición de dos brotes (el páncreas ventral y el páncreas dorsal) provenientes del endodermo del intestino (3, 4). Una vez formados dichos brotes, los epitelios pancreáticos proliferan, hasta formar una estructura ramificada. Finalmente durante la sexta semana en el humano y entre los días 15 y 19 en el ratón, estos dos brotes se desarrollan de manera independiente, para formar el tejido exocrino y endocrino, rotando y fusionándose para formar el páncreas (5).

Cabe mencionar que durante el desarrollo del páncreas, se han identificado un subconjunto de células, denominadas células progenitoras, las cuales proliferan y se diferencian dando como resultado los islotes de Langerhans (Fig. 2) (6).

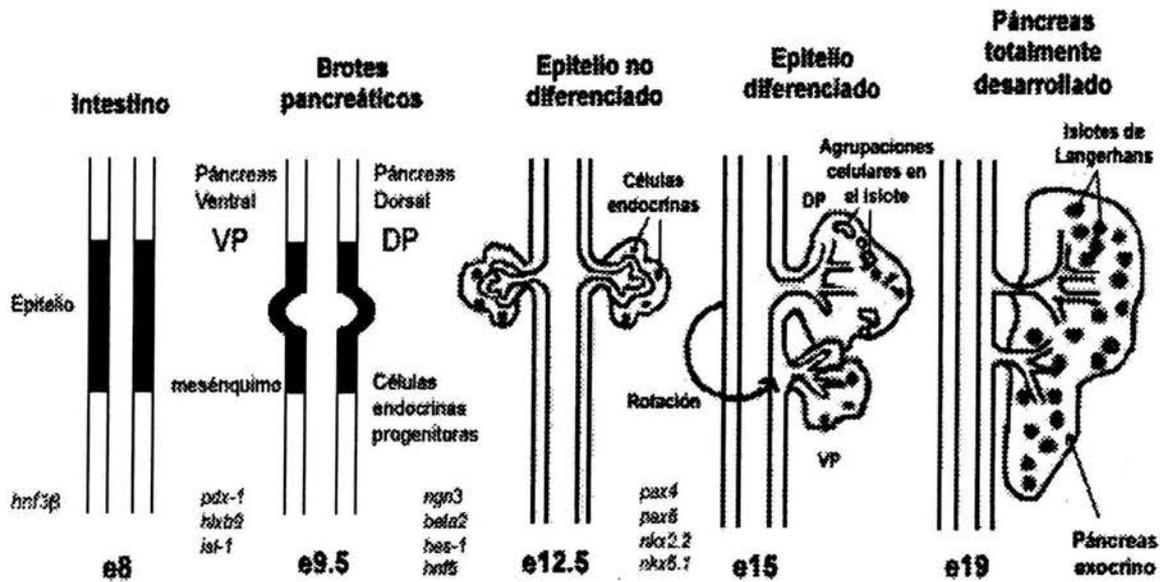


Fig.2. Desarrollo del páncreas en ratón embrionario.

A partir de estudios recientes, se descubrió que la regulación de la diferenciación y proliferación de las células del páncreas dependen de factores de transcripción, que se hacen presentes a lo largo de su desarrollo (6). Un ejemplo de la importancia de dichos factores de transcripción fue el descubrimiento de una mutación en el gen PDX1 en un paciente que presentó aplasia del páncreas (7).

Factores de transcripción

Estudios realizados con virus que utilizan la maquinaria celular para replicarse, llevaron al descubrimiento de la existencia de elementos cis-control, responsables de la regulación de la transcripción de genes, que codifican para proteínas del complejo de la ARN polimerasa II (8). Esto llevó al reconocimiento de arreglos complejos de secuencias de ADN, que podían asociarse con las regiones promotoras y participar en la definición de patrones específicos de expresión (9). Estas secuencias son lo que actualmente conocemos como factores de transcripción.

Los factores de transcripción son estructuras modulares con al menos dos dominios funcionales: uno que se une a secuencias de ADN de los promotores y de los intensificadores (dominio de unión al ADN), y otra que activa la transcripción mediante interacciones proteína-proteína (dominio de activación en trans) (10).

La especialización de las ARN polimerasas eucarióticas para transcribir sólo determinados genes, está determinada por la regulación de estos genes por secuencias promotoras y factores de transcripción diferentes. Se distingue así, entre promotores para genes de la clase I, de la clase II y de la clase III (10).

Tabla 1. Clasificación de las diferentes ARN polimerasas.

Polimerasa (enzima)	Genes que transcribe (ADN)	Producto génico (ARN o proteína)	Promotores (ADN)	Factores de transcripción (proteínas)
ARNpol-I	De clase I	rARNs de 28S, 18S y 5, 8S	De clase I	TFI
ARNpol-II	De clase II	Proteínas y snARNs	De clase II	TFII
ARNpol-III	De clase III	tARNs, rARN-5S y ARNs pequeños	De clase III	TFIII

Puesto que los genes de clase II son responsables de la síntesis de todos los mRNA de células eucarióticas, y por tanto, de la síntesis de las proteínas, su regulación es de gran importancia.

De esta manera, se han realizado numerosos estudios para elucidar la forma en que se lleva a cabo la transcripción en las células eucarióticas, encontrándose que existe una familia de activadores de secuencia específicos (por ejemplo Sp1, AP-1, C/EBP, etc.), así como también factores de transcripción (ejemplo: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF y TFIIH) necesarios para el correcto funcionamiento del complejo de la ARN Pol II, pues de otro modo, ésta no puede llevar a cabo la transcripción por sí misma (11).

Así pues, debido al papel de los factores de transcripción en la activación y regulación de la transcripción, se han estudiado las secuencias de diferentes factores, lo que ha llevado al descubrimiento de motivos, responsables de la unión del factor de transcripción al ADN. De acuerdo a esto, es que se han clasificado a los factores de transcripción en (12):

- a) **Dedo de Zinc.** Esta familia comprende a los factores con un dominio de unión al ADN que contiene zinc.

- b) **Hélice-giro-hélice.** Una de las hélices α se encuentra en la parte más ancha del ADN, la otra se encuentra de manera perpendicular a éste.
- c) **Hélice-asa-hélice.** Cada hélice presenta un lado de residuos hidrofóbicos y otro lado de residuos cargados. Este motivo, permite que dos factores se dimericen, y que la parte básica de la proteína interactúe con el ADN.
- d) **Cremallera.** Consiste en una cadena de aminoácidos con un residuo de leucina por cada siete aminoácidos. Una leucina en un polipéptido interactúa con otra perteneciente a otro polipéptido, formando de esta manera un dímero.

Factores de transcripción implicados en el desarrollo y función de las células β del páncreas

Las células β pancreáticas son de gran importancia, pues están implicadas en la transcripción de los genes que codifican para insulina y el subsecuente procesamiento y secreción de ésta última. Es por tanto relevante el hecho de que una disfunción en dichas células pueda ocasionar serios problemas metabólicos, llevando a una hiperglicemia e inclusive a una diabetes mellitus. De esta manera son necesarios factores reguladores de la expresión de los genes que codifican para insulina. Como se mencionó anteriormente estos factores reguladores, son proteínas que ejercen su función mediante su unión a determinadas secuencias del ADN río arriba de los elementos regulatorios de genes específicos, controlando así la transcripción de dichos genes (13).

A continuación se presentan los principales factores de transcripción que regulan los genes que intervienen en el desarrollo y función de las células β del páncreas.

Tabla 2. Principales factores de transcripción pancreáticos.

Factor de transcripción	Sitio de expresión	Función	Ref.
Factores Forkhead box			
Foxa2	Endodermo embrionario y en todos los tipos de células del islote.	Necesario para la formación apropiada del endodermo y expresión de Pdx1. También es necesario para la secreción de insulina controlada en células β maduras.	14, 15, 16
Factores LIM de homeodominio			
Isl1	Mesénquimo embrionario y en todos los tipos de células del islote.	Necesario para la diferenciación temprana celular endocrina.	17
Factores básicos hélice-asa-hélice			
Hes1	Células progenitoras de células no endocrinas	Dirige la diferenciación de las células precursoras pancreáticas hacia líneas no endocrinas.	18
Ngn3	Células progenitoras de células endocrinas	Dirige la diferenciación de células precursoras pancreáticas hacia líneas endocrinas.	19, 20, 21
NeuroD1	En todo tipo de células del islote	Necesario para proliferación y crecimiento del islote. También es importante para la activación de <i>Ins</i> en las células β maduras. Mutaciones heterocigotas ocasionan MODY en el humano.	22
Factores HNF			
HNF-1 α	Células β	Activa a <i>Ins</i> y <i>Pdx1</i> . Mutaciones heterocigotas ocasionan MODY en humanos.	23

Factor de transcripción	Sitio de expresión	Función	Ref.
HNF-4 α	Células β	Activa a HNF-1 α , a Glut2 y a Ins. Mutaciones heterocigotas ocasionan MODY en humanos.	24, 25
HNF-1 β	Endodermo embrionario joven y en todos los tipos celulares del islote.	Necesario para la formación del endodermo joven. Mutaciones heterocigotas ocasionan MODY en humanos.	26, 27
HNF6	Todo tipo de células pancreáticas durante el desarrollo.	Necesario para el desarrollo normal de las células endocrinas. Activa la expresión de Ngn3.	28
Factores Homeobox			
Pdx1	Células β de páncreas maduro.	Su ausencia da como resultado una escasa formación del páncreas. Importante activador de Ins. Mutaciones heterocigotas causan MODY en humanos.	29, 30, 31
Hb9	Células progenitoras pancreáticas	Necesario para el desarrollo del páncreas dorsal.	32, 33
Nkx2.2	Células α , β y PP	Necesario para la expresión de Nkx6.1 e Ins en las células β precursoras.	34
Nkx6.1	Células β	Necesario para la diferenciación final de las células β	35

Factor de transcripción	Sitio de expresión	Función	Ref.
Factores Pax			
Pax4	Células endocrinas progenitoras	Dirige la formación de células α y β . Inhibe la transcripción de Gcg.	36, 37
Pax6	En todo tipo de células del islote	Necesario para la formación de las células α . Activa la transcripción de Gcg	38, 39, 40
Misceláneos			
Bm4	Células α	Dirige el desarrollo de las células α y activa la transcripción de Gcg.	41

Abreviaciones: Bm4, cerebro 4; Foxa, forkhead box A; Gcg, glucagon; Glut2, transportador de glucosa tipo 2; Hb9, factor homeobox 9; HNF, factor nuclear de hepatocitos; Ins, insulina; Isl1, Islet-1; MODY, maturity onset diabetes of the young; NeuroD1, factor de neurodiferenciación 1; Ngn3, naurogenina 3; Nkx, homeobox NK; Pbx1, factor de transcripción leucémico célula pre-B; Pdx1, factor homeobox pancreático y duodenal 1; PP, polipéptido pancreático.

Los estudios en ratones transgénicos y knockout han permitido estudiar la presencia de estos factores de transcripción durante el desarrollo del páncreas, asimismo han demostrado su importancia en la regulación de su desarrollo y su función. Gracias a todo lo mencionado anteriormente, se ha propuesto un modelo (Fig. 3) de los factores de transcripción involucrados en la diferenciación de las células endocrinas del páncreas, de acuerdo a su aparición cronológica.

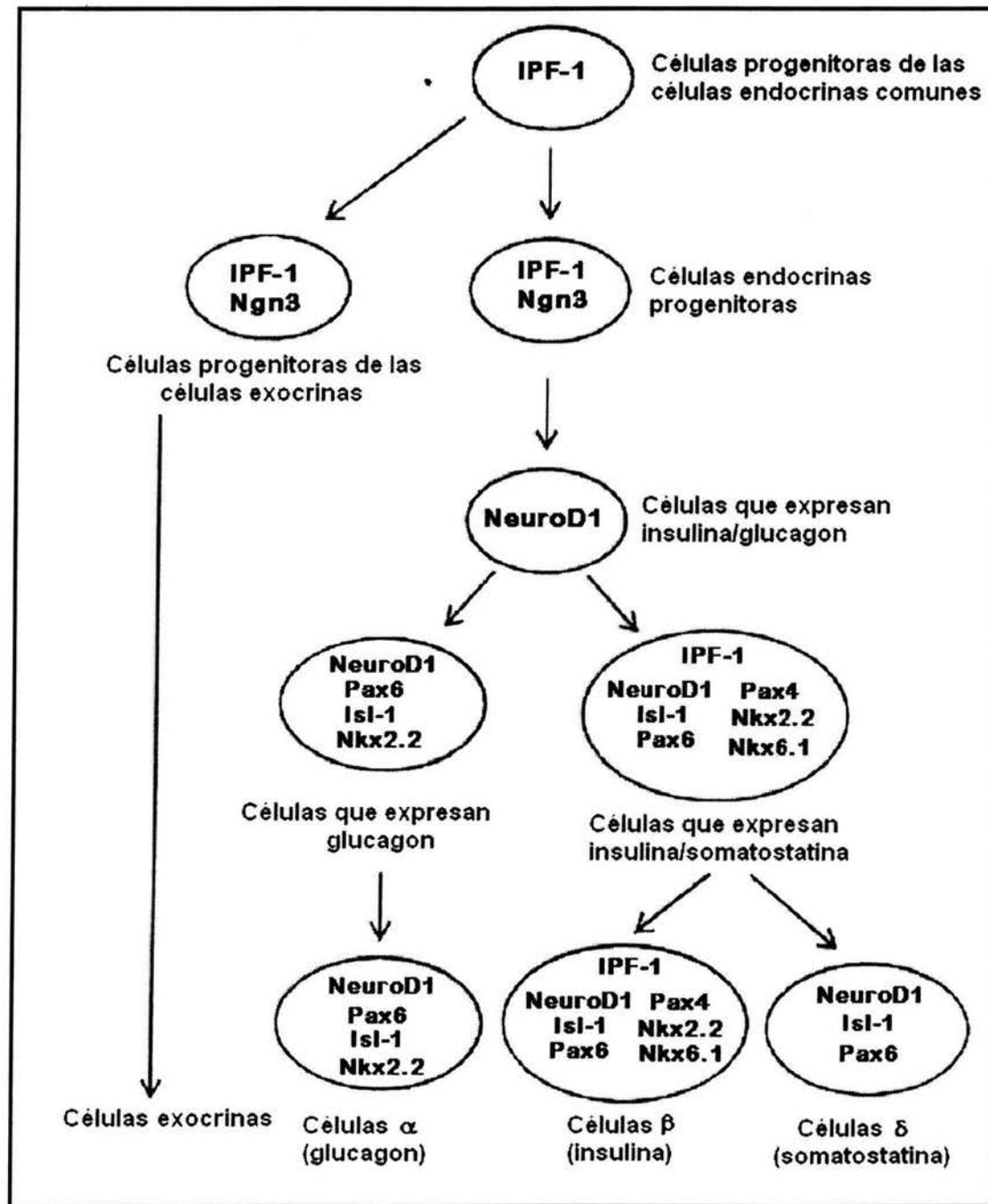


Fig. 3. Modelo esquemático de los factores involucrados en la diferenciación de las células endocrinas del páncreas de ratón. Los círculos representan a las células endocrinas en varios estadios de diferenciación. Los factores de transcripción dentro de los círculos son aquellos que podrían estar afectados. Las flechas representan los pasos en la diferenciación celular (*J Biomed Sci* 7: 27-34; 2000).

METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS

La regulación de glucosa en el organismo es de gran importancia, pues cualquier desequilibrio en ésta, es causa de hiperglicemia o diabetes, la cual a su vez está acompañada de complicaciones micro y macrovasculares, retinopatía, neuropatía, entre otras (42).

Así pues, cualquier carbohidrato que es digerido y metabolizado llega al intestino, donde es absorbido, para pasar a la circulación.

La glucosa que entra en el hígado es fosforilada por la glucocinasa para dar glucosa-6-fosfato. La fructosa, la galactosa y la manosa absorbidas en el intestino delgado, también son convertidas a glucosa-6-fosfato, mediante diversas rutas enzimáticas. La glucosa-6-fosfato se desfosforila por la glucosa-6-fosfatasa para dar la glucosa libre, que se lleva a la circulación sanguínea para mantener los niveles de glucosa. Mientras que la glucosa que no se utiliza es transformada en glucógeno, como forma de almacenamiento, en el mismo hígado (43).

La insulina es una de las hormonas encargadas de regular la concentración de glucosa en la sangre, pues al detectarse una concentración alta de glucosa en circulación, el exceso de ésta es transformado por el hígado en compuestos de almacenamiento como glucógeno y triacilgliceroles. Cuando los niveles de glucosa son bajos, los tejidos producen glucosa a partir de la degradación de glucógeno y de la gluconeogénesis (43).

Insulina

La insulina es una pequeña proteína con dos cadenas polipeptídicas, A (21 aminoácidos) y B (30 aminoácidos), unidas por dos puentes de disulfuro. Es sintetizada en las células β del páncreas, en forma de precursor inactivo de cadena única, en el que las cadenas A y B se encuentran conectadas por el péptido C. Dicho precursor inactivo, denominado preproinsulina (Fig. 4), contiene una secuencia de 24 aminoácidos fijos a un amino terminal de la cadena B, esta secuencia señal facilita el paso de la preproinsulina del citoplasma (donde se inicia la síntesis) a través de la membrana del retículo endoplásmico (44). La eliminación mediante proteólisis del péptido señal la transforma en la proinsulina, que se

almacena en las células β . De este modo, cuando los niveles de glucosa son elevados, la proinsulina se convierte en insulina activa, gracias a la acción de peptidasas específicas, que se encargan de la eliminación de cuatro aminoácidos básicos (tres arginina y una lisina) y del péptido C (43), liberándose en la circulación cantidades equimolares de éste último, el cual es utilizado en la clínica como un índice de la secreción de insulina (45).

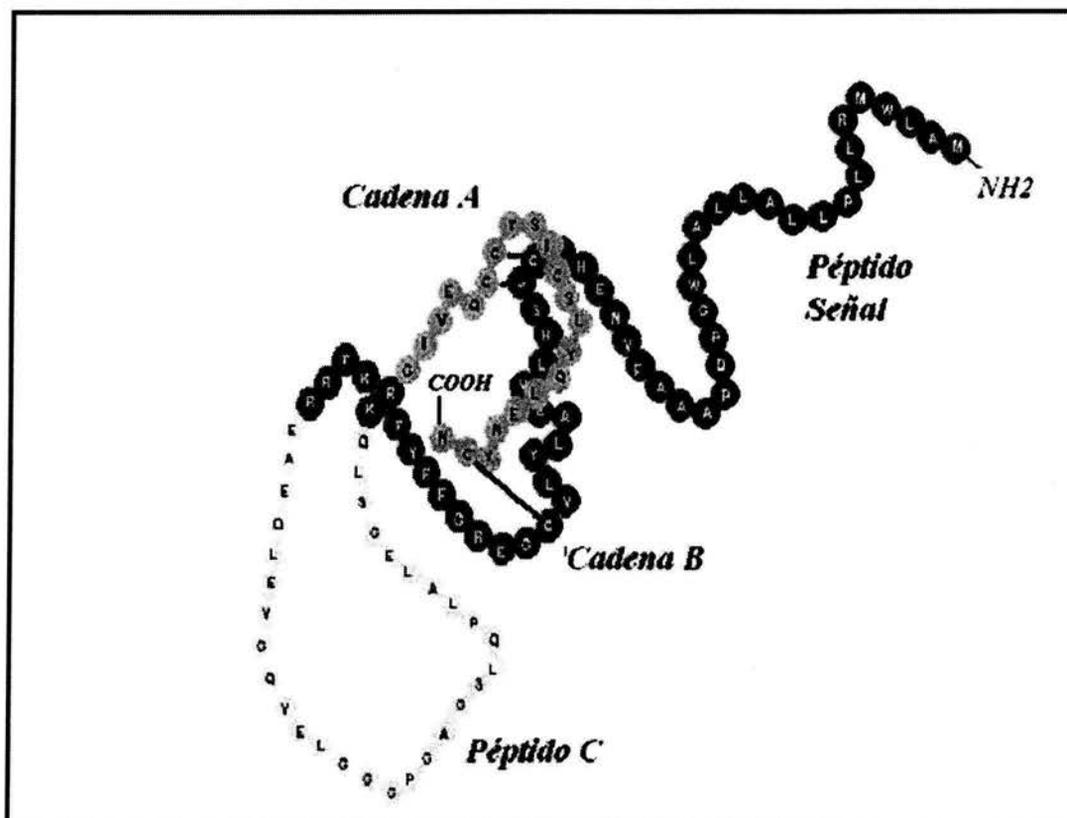


Fig. 4. Molécula de preproinsulina humana.

Alteraciones en la secreción de insulina

Se ha reportado, que sujetos obesos por lo regular tienen resistencia a la insulina e hiperinsulinemia (46). La hiperinsulinemia asociada a la resistencia a la insulina es resultado de la combinación de un aumento en la secreción de insulina y de la reducción de la tasa de aclaramiento de ésta (47). La secreción aumentada de insulina en individuos resistentes a ésta, específicamente obesos, es debido a un aumento en la masa celular y a alteraciones en la expresión de enzimas claves del metabolismo de la glucosa. De esta

manera, se cree que la hiperinsulinemia es una consecuencia de una mayor afinidad de la hexocinasa (100 veces más que la glucocinasa) por la glucosa ocasionando la secreción de insulina a niveles de glucosa más bajos (48).

Otra de las alteraciones en la insulina, que se presentan en diabéticos, puede deberse a problemas de autoinmunidad, factores genéticos (mutaciones en algún gen, relacionado con el desarrollo del páncreas o la activación del gen de insulina) y factores no genéticos (ambientales, por ejemplo: estilo de vida).

DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus se define como un síndrome caracterizado por la alteración en el metabolismo de carbohidratos, cuya principal manifestación es la hiperglicemia. La diabetes mellitus es uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial; según la Organización Mundial de la Salud el promedio de prevalencia de diabetes es de aproximadamente el 5%, mientras que en México, según la Encuesta Nacional de Salud representa un 10.9% en personas mayores de 20 años (49).

Los diez países con más casos en el mundo son por orden de frecuencia India, China, EUA, Rusia, Japón, Brasil, Indonesia, Pakistán, México y Ucrania, y se cree, que de continuar con esta tendencia, para el año 2025 México se encontrará en el séptimo lugar (50).

Otro aspecto epidemiológico digno de mencionarse de la diabetes mellitus en México, es la proporción de individuos que desarrollan la enfermedad antes de los 40 años de edad, pues éstos tienen mayor riesgo al desarrollo de complicaciones, debido a que se encuentran expuestos a hiperglicemia por un periodo más prolongado comparado con aquellos que desarrollan la enfermedad a los 50 o 60 años (51).

La principal causa por la que miembros inferiores por razones no traumáticas son amputados, es la diabetes, asimismo ésta es causa de complicaciones como la retinopatía e insuficiencia renal. La presencia de daños vasculares y macrovasculares, incrementa el costo del tratamiento de los pacientes más de tres veces y medio (51).

El costo anual de tratamiento para un diabético bajo control, es entre \$1,960 y \$4,500 pesos, basado en la compra de medicamentos, en 9 glucemias en laboratorio, 156

monitoreos de glucosa capilar, 12 consultas de médico general y 2 con especialista, y una serie de exámenes de laboratorio (CT, T, HDL y EGO) (52).

Complicaciones

Como se mencionó anteriormente, las principales complicaciones que acompañan a la diabetes mellitus son la retinopatía, la nefropatía y complicaciones micro y macrovasculares.

En el caso de la retinopatía se ha observado que durante los periodos de hiperglicemia, la excesiva producción y acumulación de polioles trae como consecuencia el desarrollo del tejido en el nervio óptico y cristalino del ojo. El desarrollo de la retinopatía diabética comprende cinco pasos: a) la formación de una microaneurisma (formación de redes y ramificaciones rojas de 15 a 60 μm de diámetro); b) aumento excesivo de la permeabilidad vascular; c) oclusión vascular; d) proliferación de nuevos vasos sanguíneos y tejido fibroso en la retina; y e) contracción de la proliferación fibrovascular y del humor vítreo. En el último paso, se presentan las hemorragias, cuya presencia reduce la posibilidad de llevar a cabo una cirugía de láser óptima (53).

La nefropatía diabética se caracteriza por la presencia persistente de proteinuria. Existen diversos mecanismos que se han propuesto para explicar el desarrollo de la nefropatía, entre estos se encuentran, la generación de una toxicidad debido a la glucosa, la glicosilación no enzimática de proteínas celulares, reabsorción aumentada de sodio y el metabolismo anormal de lípidos (54).

Entre los problemas que acompañan a la diabetes, las complicaciones micro y macrovasculares (incluyendo la enfermedad coronaria del corazón, paro cardíaco y enfermedad periférica vascular) son de gran importancia, pues son una de las principales causas de mortalidad entre pacientes con diabetes mellitus (55).

Clasificación

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Grupo Nacional de Datos de Diabetes (NDDG) han dividido a la diabetes mellitus en dos grandes grupos denominados insulino dependiente (DM tipo 1) y no insulino dependiente (DM tipo 2) (56).

Diabetes mellitus tipo 1

La diabetes mellitus tipo 1 es causada por la destrucción de células β , con frecuencia por autoinmunidad, dando como resultado una deficiencia de insulina. Los agentes etiológicos que causan el proceso de autoinmunidad y destrucción de células β no se han establecido (54).

Una de las primeras manifestaciones de este tipo de diabetes es la cetoacidosis, así como una moderada hiperglicemia que se puede convertir rápidamente en hiperglicemia severa, éstas en presencia de alguna infección (42).

La diabetes mellitus tipo 1 se ha subdividido en dos clases, una autoinmune y una idiopática. La forma autoinmune, es crónica que se caracteriza por la destrucción celular autoinmune de las células β del páncreas. La diabetes mellitus tipo 1 tiene dos etapas: una primera denominada insulitis, que consiste en la invasión de leucocitos a los islotes; y la segunda etapa, la diabetes, cuando la mayoría de las células han sido destruidas, y no hay suficiente producción de insulina para regular los niveles de glucosa en sangre, dando como resultado la hiperglicemia (57).

Los marcadores de la destrucción celular, que son cruciales para el diagnóstico de este tipo de diabetes incluyen una serie de proteínas del islote que son blanco del sistema inmune, entre éstas se encuentran la insulina, la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD) y las proteínas de membrana homólogas a las tirosin fosfatasas, IA-2 y IA-2 β (58).

Diabetes mellitus tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2 se caracteriza por un aumento constante de los niveles de glucosa en sangre, causada por una combinación de factores genéticos y no genéticos, que dan como resultado resistencia a la insulina y/ o deficiencia de la misma (54).

En este tipo de diabetes es raro observar cetoacidosis, sin embargo, siempre está acompañada de alguna infección. Uno de los mayores problemas de la diabetes mellitus tipo 2 es que el tiempo estimado entre la aparición de la hiperglicemia y el diagnóstico es entre 9 y 12 años, pues en sus primeras etapas las concentraciones de glucosa no son lo

suficientemente elevadas para que se presenten los síntomas de una diabetes no controlada (59).

Dentro de la diabetes mellitus tipo 2, se encuentra una variedad conocida como MODY (del inglés Maturity Onset Diabetes of the Young), la cual es genética y metabólicamente un tipo heterogéneo de diabetes mellitus no insulino-dependiente, entre cuyas características se encuentran: un patrón de herencia autosómico dominante, una edad de aparición temprana (por lo general por debajo de los 25 años) y un defecto en la secreción de insulina estimulada por la glucosa, además es una condición monogénica, es decir, la herencia de una mutación simple en un gen puede causar diabetes tipo 2 (60).

Dentro de los factores no genéticos de riesgo se encuentran el aumento de la edad, elevada ingesta calórica, sobrepeso, un estilo de vida sedentario; y últimamente el bajo peso del recién nacido ha recibido considerable atención; pues se ha encontrado una relación entre el crecimiento intrauterino y la aparición de diabetes, obesidad y varios factores de riesgo cardiovascular; así, bebés de bajo peso al nacer desarrollan una intolerancia a la glucosa y un aumento en la prevalencia de la diabetes tipo 2 posteriormente (61,62).

En la actualidad han sido identificadas mutaciones en seis genes diferentes en pacientes con MODY (63), uno de los cuales corresponde a la enzima glucocinasa (MODY2). Los cinco restantes son factores de transcripción que controlan la expresión de los genes involucrados en la diferenciación del páncreas, el factor nuclear 4α de hepatocitos (HNF- 4α /MODY1); el factor nuclear 1α de hepatocitos (HNF- 1α /MODY3); el factor 1 promotor de insulina (IPF-1/MODY4); el factor nuclear 1β de hepatocitos (HNF- 1β /MODY5) y por último el factor 1 de neurodiferenciación (NeuroD1/MODY6) (64).

HNF- 4α /MODY1

Este factor de transcripción es un miembro de la superfamilia de receptores de hormonas esteroideas/tiroideas (65). Con seis dominios entre los que están el dominio central de unión al ADN con una estructura del tipo dedos de zinc y el dominio de unión al ligando ubicado en el extremo carboxilo terminal (66). El factor HNF- 4α es un regulador corriente arriba (upstream) de la expresión de HNF- 1α (67), que se expresa en el hígado, riñón, intestino e islotes de Langerhans, además es un regulador positivo de genes involucrados en el

metabolismo de glucosa como el transportador de la glucosa 2 (GLUT2), la aldolasa B, la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y la piruvato cinasa (25). La deficiencia de HNF-4 α en humanos, afecta la biosíntesis de triglicéridos y apolipoproteínas y está asociada con una reducción del 50% de triglicéridos en suero y una reducción del 25% de la concentración en suero de apolipoproteínas AII, CIII y lipoproteína Lp(a) (68).

Las mutaciones en este gen dan como resultado alteración en la síntesis y secreción de insulina, produciendo hiperglicemia severa, frecuente requerimiento de insulina, nefropatía y retinopatía, requiriendo frecuente suministro de insulina (69).

Glucocinasa/MODY2

La glucocinasa es una enzima que se expresa en las células pancreáticas y del hígado. Cataliza la transferencia de un grupo fosfato del ATP a la glucosa para producir glucosa-6-fosfato, primer paso en el metabolismo de la glucosa. Controla la tasa de entrada de glucosa a la ruta glicolítica (70). Mutaciones heterocigotas en esta enzima llevan a alteraciones en la secreción de insulina asociadas con MODY, mientras que mutaciones homocigotas producen una deficiencia completa de la enzima dando como resultado diabetes mellitus neonatal (71).

HNF-1 α /MODY3

El factor de transcripción HNF-1 α es miembro de la familia de factores de transcripción tipo homeodominio. Se expresa en hígado, intestino, riñón y páncreas, regulando en éste último la expresión de insulina (72). Pacientes con mutaciones en el gen que codifica para este factor nacen euglicémicos y desarrollan células β defectuosas (73). Al igual que en la diabetes mellitus tipo 1, los pacientes presentan complicaciones micro y macrovasculares con retinopatía y nefropatía (74).

IPF1/MODY4

Es un factor de transcripción de tipo homeodominio que se encuentra involucrado en el desarrollo del páncreas y en la regulación de la transcripción de varios genes entre los que se está el de insulina, el de la glucocinasa, el del polipéptido amiloide y el transportador de glucosa (75). Mutaciones heterocigotas son asociadas con MODY, manifestándose por

medio de la reducción de la respuesta de secreción de insulina a glucosa, que tiene que ver con un defecto en las rutas de señalización que regulan la secreción de insulina (76).

HNF-1 β /MODY5

Es un factor de transcripción de tipo homeodominio que funciona como homodímero o heterodímero con HNF-1 α . Mutaciones en el gen que codifica para este factor de transcripción producen alteración en la síntesis y secreción de insulina, manifestándose como hiperglicemia severa con nefropatía y retinopatía asociadas (77).

NEUROD1 /BETA2 (MODY 6)

El factor de transcripción NeuroD1/BETA2 es una proteína básica hélice-asa-hélice (bHLH), que se expresa en el sistema nervioso central, intestino y páncreas. En el intestino NeuroD1/BETA2 activa la transcripción del gen que codifica para la hormona secretina (78). Asimismo, diversos estudios realizados en embriones de rana revelaron que NeuroD1/BETA2 es un factor de diferenciación en el desarrollo del sistema nervioso (79). También se ha demostrado que es un activador importante de la transcripción del gen de insulina y de glucagon, por lo que se encuentra involucrado en la regulación de éstas dos hormonas (80). NeuroD1/BETA2 es expresado durante el desarrollo del páncreas y en el páncreas adulto, principalmente en las células β .

Tamimi y colaboradores clonaron el gen NeuroD a partir del cADN de cerebro fetal, utilizando al gen de ratón como base de comparación. El polipéptido de 357 aminoácidos compartía el 97% de identidad con el gen del ratón (era 100% en la región bHLH). De esta manera ellos encontraron que el gen NeuroD era idéntico al gen BETA2 de hámster que había sido clonado como gen de transcripción regulador de la producción de insulina (81).

El papel de NeuroD1/BETA2 en el desarrollo pancreático es de gran importancia, y esto se ha confirmado en estudios con ratones, en los cuales se observó que aquellos con delección homocigota nacen con displasia de las células β y falla severa del páncreas endocrino, desarrollando hiperglicemia y diabetes, muriendo finalmente por deshidratación. Mientras que aquellos ratones con delección heterocigota mostraban una morfología del

islote alterada y defectos neuromotores, así como una reducción del número de células β (22).

El gen NeuroD1/BETA2 se localiza en el cromosoma 2q32 en humanos (81). Contiene dos exones, el exón 1 que codifica parte de una región 5'-no traducida y el exón 2 que codifica para 11 nucleótidos de la región 5'-no traducida y para los 356 aminoácidos de la proteína NeuroD1, que tiene un peso de 45kDa (82). Estudios realizados por diferentes grupos en varias partes del mundo acerca del gen, han llevado al hallazgo de dos polimorfismos relacionados con éste (Tabla 3). El más común de estos polimorfismos es el atribuido a una conversión en la posición 45 de una alanina por una treonina (A45T), la cual ha sido asociada con diabetes tipo 1 en poblaciones japonesas (84, 85), mientras que en población francesa no se encontró alguna asociación entre dicho cambio y algunos de los dos tipos de diabetes (88). No obstante, en poblaciones americanas se encontraron dos mutaciones, la primera debida a la conversión de una arginina en la posición 111 por una leucina (R111L) en el dominio de unión al ADN, y la segunda por una inserción de una citosina en el tracto poli C en el codon 206 (histidina), dando como resultado un codón de paro en el aminoácido 242 (H206+C), ambas mutaciones han sido asociadas con diabetes tipo 2 en dicha población (87). De este modo en la tabla 3 también se puede observar, que las diferencias entre las diversas poblaciones son notables, pues mientras en Dinamarca se demostró por medio de la eficiencia transactivacional del gen NeuroD1/BETA2, que las variantes A45T y P197H son mutaciones (86), en otros países como Checoslovaquia y Japón, tomando en cuenta las frecuencias alélicas, se encontró que éstas no variaban entre diabéticos y controles, concluyendo que las variantes A45T y P197H no se asociaban con la aparición de diabetes mellitus ya sea tipo 1 o 2 (90) en el caso de Checoslovaquia, mientras en Japón se relacionó la variante A45T con la aparición de diabetes mellitus tipo 1(85, 84).

Tabla 3. Polimorfismos identificados en el gen NeuroD1/BETA2.

País		Variante	Tipo de Diabetes	Referencia por año (cita)
Polonia	Polimorfismo	A45T	2	<i>Malecki y col. 2003 (89)</i>
Checoslovaquia	Polimorfismo Polimorfismo	A45T P197H	NA NA	<i>Cinek y col. 2003 (90)</i>
Japón	Polimorfismo Polimorfismo Mutación	A45T	1	<i>Mochizuki y col. 2002 (85)</i> <i>Yamada y col. 2001(84)</i> <i>Iwata y col. 1999 (83)</i>
Dinamarca	Mutación Mutación	A45T P197H	1 NA	<i>Hansen y col. 2000 (86)</i>
Estados Unidos	Mutación Mutación Polimorfismo Polimorfismo	R111L H206+C A45T P197H	2 2 NA2 NA2	<i>Malecki y col. 1999 (87)</i>
Francia	Polimorfismo	A45T	NA	<i>Dupont y col. 1999 (88)</i>

Abreviaciones: NA, no se encontró asociación alguna con ninguno de los dos tipos de diabetes; NA2, no se encontró relación con la diabetes mellitus tipo 2. Nota: en los casos en los que solo se menciona un tipo de diabetes, es porque no se han realizado los estudios para determinar la relación entre el polimorfismo o la mutación ya sea el caso, y el tipo de diabetes en cuestión.

Como ya se explicó anteriormente la diabetes mellitus es uno de los principales problemas de salud, sobretodo debido a las complicaciones que la acompañan y a los costos que conlleva. Aunado a esto, la prevalencia de los diferentes subtipos de MODY varían enormemente entre las diferentes poblaciones. Es por todo lo mencionado anteriormente, que es necesario llevar a cabo estudios que nos permitan prevenir y tratar dicha enfermedad, ya sea implementando sistemas biológicos de evaluación farmacológica o diseños de manejo terapéutico. Asimismo, el conocimiento de la etiología que ocasiona la diabetes mellitus nos permitirá darle una mejor calidad de vida al paciente.

III. HIPÓTESIS

III. HIPÓTESIS

Debido a que el fondo genético de las poblaciones es variable en las diferentes latitudes, se espera que el gen NeuroD1/BETA2 presente variantes polimórficas propias de la población mexicana.

IV. OBJETIVO

IV. OBJETIVO

Evaluar la variabilidad genética del gen NeuroD1/BETA2 en población mexicana.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar molecularmente el gen NeuroD1 en 20 sujetos control (40 alelos).
2. Efectuar la correlación entre los resultados obtenidos con las variantes polimórficas y mutaciones reportadas en la literatura.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

V. MATERIAL Y MÉTODOS

CONTROLES

Se recolectaron muestras de sangre de sujetos que servirían como controles, dichos sujetos se seleccionaron en base a las siguientes características:

1. Edad mayor o igual a 50 años, sin distinción de sexo.
2. Índice de Masa Corporal (IMC) ≤ 25
3. No tener antecedentes familiares de diabetes de al menos dos generaciones.

Todos los controles llenaron una carta de aceptación, en la que daban su consentimiento de participación voluntaria en el proyecto (apéndice 2).

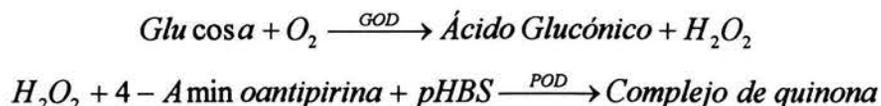
El protocolo fue aprobado por el comité de Ética de Investigación en Humanos del Hospital Juárez de México.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Para asegurar que los sujetos control contaban con valores normales para las pruebas bioquímicas, se les realizaron pruebas de glucosa, triglicéridos y colesterol, para las cuales se utilizaron estuches comerciales de Stanbio Laboratory.

Glucosa

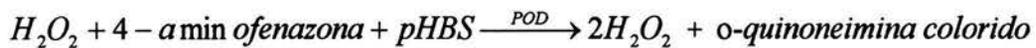
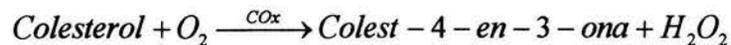
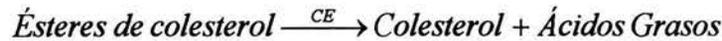
La glucosa es oxidada en presencia de glucosa oxidasa (GOD) a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno formado, reacciona bajo la influencia de peroxidasa (POD) y 4-aminoantipirina para formar un complejo rojo violeta de quinona. La intensidad del color es proporcional a la concentración de glucosa. Las reacciones llevadas a cabo son las siguientes:



Colesterol total

El método utilizado se en basa la capacidad de la colesterol esterasa (CE) para hidrolizar los ésteres, produciendo colesterol libre y ácidos grasos. El colesterol libre así producido

más el colesterol preformado se oxidan en presencia de colesterol oxidasa (Cox) para dar colest-4-en-3-ona y peróxido de hidrógeno. Un cromógeno quinonaimina, con absorción máxima de 500nm, se produce cuando el fenol se acopla oxidativamente con 4-aminofenazona, en presencia de peroxidasa (POD) con peróxido de hidrógeno. La intensidad del color rojo final es proporcional a la concentración total de colesterol. A continuación se muestran las reacciones:

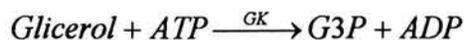


Triglicéridos

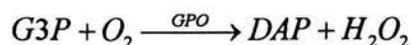
La determinación de los niveles de triglicéridos, cuando se lleva a cabo en conjunto con otros ensayos de lípidos, proporciona una ayuda en el diagnóstico de hiperlipoproteinemia primaria y secundaria. También es útil para dar seguimiento a la diabetes mellitus, nefrosis, obstrucción biliar y varias anomalías metabólicas que resultan de disturbios endocrinos.

Esta prueba se basa en la acción de la lipasa sobre los triglicéridos produciendo glicerol y los ácidos grasos.

En una segunda etapa el glicerol se fosforila por el adenosin-5'-trifosfato (ATP) para producir glicerol-3 fosfato (G3P) y adenosin-5'-difosfato (ADP) en una reacción catalizada por la glicerol-cinasa (GK), de tal manera que:



La G3P es oxidada por la glicerolfosfato oxidasa (GPO) produciendo dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrógeno.



Los peróxidos reaccionan con 4-aminoantipirina y 4-clorofenol bajo la influencia catalítica de la peroxidasa (POD) para formar una quinoneimina de color rojo.



DETERMINACIÓN DE HORMONAS

Insulina

Para la determinación de esta hormona se utilizó el estuche comercial de Diagnostic Systems Laboratories Inc.

Se llevó a cabo un radioinmunoanálisis de fase sólida, donde la insulina marcada con ^{125}I compete durante un tiempo fijo con la insulina de la muestra del paciente por sitios de unión al anticuerpo específico para la insulina. Debido a que el anticuerpo está inmovilizado en la pared de un tubo de polipropileno, la simple decantación de sobrenadante es suficiente para terminar la competencia y aislar la fracción de anticuerpo unido de la insulina marcada con el isótopo. La lectura del tubo en un contador gama, proporciona entonces, un número que se convierte por medio de una curva de calibración en una medida de la insulina presente en la muestra del paciente.

Cálculos

Primero se calcula la media de las cuentas de los tubos de unión no específica corregidas por minuto:

$$\text{Cuentas netas} = (\text{Media CPM}) - (\text{Media de CPM de unión no específica})$$

Posteriormente se determina la unión de cada pareja de tubos como un porcentaje de la unión máxima, tomando las cuentas corregidas:

$$\text{Porcentaje de unión} = \frac{\text{Cuentas netas}}{\text{Cuentas netas de unión máxima}} \times 100$$

Utilizando papel gráfico logarítmico se representa el porcentaje de unión en el eje vertical frente a la concentración en el eje horizontal (logarítmico) para cada calibrador y se dibuja la línea que pase por los puntos. Los resultados de las muestras se pueden leer en la curva por interpolación. Los datos fueron graficados y calculados por el contador de radioactividad modelo Palkard.

Glucagon

Para la determinación de esta hormona se utilizó el estuche comercial de Diagnostic Products Corporation.

Para esta hormona se realizó un radioinmunoanálisis secuencial. Después de preincubar la muestra del paciente con un anticuerpo anti-glucagon, el glucagon marcado con ^{125}I compete con el glucagon de la muestra por los sitios de unión de los anticuerpos. Después de incubar por un tiempo determinado, la separación del glucagon unido del glucagon libre se logra mediante un método de doble anticuerpo acelerado por PEG, seguido de una centrifugación. Luego el precipitado que contiene la fracción unida al anticuerpo se lee en un contador gama y las concentraciones del paciente se leen de una curva de calibración.

Cálculos

Primero se calcula la media de las cuentas de los tubos de unión no específica corregidas por minuto:

$$\text{Cuentas netas} = (\text{Media CPM}) - (\text{Media de CPM de unión no específica})$$

Posteriormente se determina la unión de cada pareja de tubos como un porcentaje de la unión máxima, tomando las cuentas corregidas:

$$\text{Porcentaje de unión} = \frac{\text{Cuentas netas}}{\text{Cuentas netas de unión máxima}} \times 100$$

Utilizando papel gráfico logarítmico se representa el porcentaje de unión en el eje vertical frente a la concentración en el eje horizontal (logarítmico) para cada calibrador y se dibuja la línea que pase por los puntos. Los resultados de las muestras se pueden leer en la curva

por interpolación. Los datos fueron graficados y calculados por el contador de radioactividad modelo Palkard.

EXTRACCIÓN DE ADN

1. Se tomaron 20 mL de sangre y se dividieron en dos alícuotas de 10 mL cada una, en tubos con 200 μ L de EDTA (0.5M pH 8.0).
2. Sobre hielo, cada tubo se llevó a 35 mL con solución Sacarosa Tritón 2X.
3. Posteriormente se llevaron a 50 mL con agua desionizada estéril.
4. Se mezclaron por inversión y se dejaron reposar en hielo durante 10 minutos.
5. Se centrifugaron (rotor Sorvall RT7) a 1000 g (aproximadamente 2000 rpm) 15 minutos a 4°C.
6. Se decantó el sobrenadante y se desechó.
7. El botón obtenido se lavó con 5 mL de solución Sacarosa Tritón 1X.
8. Se centrifugó 15 minutos a 4°C (se vio un pellet rosado).
9. Al botón obtenido se le adicionaron 3 mL de buffer de lisis nuclear, y se resuspendió el pellet con una pipeta Pasteur sellada.
10. Se adicionaron 108 μ L de SDS al 20% más 100 μ L de Proteínasa K (5 mg/mL), y se mezcló con la pipeta.
11. Se incubó a 37°C toda la noche (Incubadora BT23, American Scientific Products)
12. La mezcla anterior se transfirió a tubos cónicos estériles de 15 mL y se le agregó 1 mL de Cloruro de sodio saturado, agitando por 15 segundos vigorosamente.
13. Se centrifugó a 1000 g (aproximadamente 2000 rpm) 15 minutos.
14. Se volvió a transferir con cuidado el sobrenadante a otro tubo cónico de 15 mL.
15. Se adicionaron dos volúmenes de etanol al 100% moviendo suavemente la pipeta.
16. El ADN precipitado se extrajo con una pipeta Pasteur sellada y se lavó con etanol al 70%, moviendo suavemente la pipeta.
17. Se dejó secar completamente el ADN en la pipeta Pasteur (boca arriba)
18. El ADN se depositó en aproximadamente 200 μ L de buffer TE en un tubo eppendorff.
19. Se dejó disolver el ADN a 37°C por 30 minutos.
20. El ADN se cuantificó espectrofotométricamente (260/280nm).

DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligos empleados se diseñaron de acuerdo a la secuencia reportada por Furuta y col. (82).

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del exón 2 del gen NeuroD1/BETA2.

Región	Oligo (5'-3')	Oligo (3'-5')	Talla
Exón 2-1	ACTTTTCGCAAGCATTGTACAGG	CGCGTTCAGTCCGTGCATGC	483pb
Exón 2-2	ATGACTAAGGCTCGCCTGGA	GGAGGCTTAACGTGGAAGAC	464pb
Exón 2-3	AGTCCGCCTTACGGTACCATG	GACAGTCACTGTAAGCACAG	447pb

1. Los oligos diseñados se centrifugaron por 15 segundos.
2. Se reconstituyeron con 500 μ L de agua dd.
3. Finalmente se hizo una dilución 1:200 y se cuantificaron espectrofotométricamente (260/280 nm), en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/ VIS Lambda 20.
4. La talla de los oligos se comprobó por medio de un PCR, utilizando un marcador de 100 pb en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (1 μ L en 50 mL).

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Esta técnica es utilizada para amplificar un segmento de ADN específico *in vitro*, utilizando una ADN polimerasa, un templado de ADN genómico y oligonucleótidos específicos que flanquean el segmento a ser amplificado.

La reacción consiste en una serie de ciclos, los que a su vez constan de tres pasos, cada uno:

- 1) Desnaturalización del templado de ADN por medio de una elevación de la temperatura (94°C, 30 segundos).
- 2) Alineamiento, en el cual los oligonucleótidos se hibridan específicamente con el templado de ADN (60°C, 30 segundos)
- 3) Polimerización, los oligonucleótidos son extendidos mediante una ADN polimerasa (72°C, 30 segundos).

Metodología

1. En un tubo eppendorff de 0.5 mL se mezclaron en el siguiente orden:

Solución dNTP 1mM	25 μ M
Buffer 10X	25 μ M
Oligo 5'	20 μ M
Oligo 3'	20 μ M
ADN genómico humano	1.0 μ g
ADN polimerasa termoestable	2.5 U
DMSO	1.0 μ L
Agua dd	15.5 μ L

2. Se colocaron los tubos con la mezcla de reacción en un termociclador (Mastercycler gradient Eppendorff). Corriéndose el programa para los tres exones.
3. Los ácidos nucleicos se amplificaron mediante su desnaturalización, alineamiento y polimerización. En la tabla siguiente se muestra el número de ciclos y las temperaturas a las que se llevó a cabo.

Número de ciclos	Tiempo y temperatura de desnaturalización	Tiempo y temperatura de alineamiento	Tiempo y temperatura de polimerización
30 ciclos	30 s a 94°C	30 s a 60°C	1 min a 72°C
Ciclo final	1 min a 94°C	30 s a 60°C	1 min a 72°C

4. Se tomó una muestra del ADN amplificado (5 μ L) a la que se le añadieron 3 μ L de buffer de carga (ver apéndice 1), y se analizó mediante una electroforesis, en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, utilizando un marcador de 100 pb.

ANÁLISIS POLIMÓRFICO CONFORMACIONAL DE CADENA SIMPLE (SSCP).

Para llevar a cabo los experimentos de la técnica de análisis polimórfico conformacional de cadena simple (SSCPs) se tomó como base lo reportado por Orita y col. (91).

La sustitución de una sola base es suficiente para alterar la movilidad de una sola cadena de ADN que es sometida a electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturizantes. Dicha movilidad es atribuida a cambios conformacionales, resultantes de sustituciones, inserciones o deleciones en una cadena del ADN. De este modo, se espera que la conformación de la cadena simple del ADN se vea afectada por factores como la temperatura del gel durante la electroforesis, la concentración del amortiguador y la presencia de agentes desnaturizantes; es debido a esto que se pueden observar un número de bandas variable, por ejemplo dependiendo del porcentaje de glicerol que contenga el gel. No obstante, se dice que esta técnica es empírica, ya que el número de bandas que se pueden observar es variable como se mencionó anteriormente (de 1-4 bandas), dependiendo de las condiciones a las que se lleve a cabo la electroforesis, y sin seguir un patrón, así pues aunque se utilice siempre la misma concentración de glicerol, el número de bandas es diferente entre exones.

El método se basa en la digestión del ADN por medio de enzimas de restricción, su desnaturización y electroforesis en un gel de poliacrilamida.

El análisis SSCP implica tres pasos:

1. Amplificación de la región de interés mediante PCR
2. Desnaturización de los productos obtenidos en el PCR
3. Electroforesis del ADN de cadena simple por medio de un gel a pH neutro.

Metodología

1. Las muestras de ADN se amplificaron mediante un PCR, agregando a cada tubo los reactivos y cantidades indicadas a continuación:

Solución dNTP	25 μ M
Buffer 10X	25 μ M
Oligo 5'	20 μ M
Oligo 3'	20 μ M
$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP	0.5 μ L
ADN genómico humano	1.0 μ g
ADN polimerasa termoestable	2.5 U
DMSO	1.0 μ L
Agua dd	15.0 μ L

2. El PCR se verificó corriendo alicuotas de 5 μ L con 3 μ L de buffer de carga (apéndice 1) en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (1 μ L para 50 mL). Todas las muestras debieron haber amplificado.
3. Se tomaron 2 μ L de cada muestra y a cada una se le agregaron 28 μ L de solución de carga (apéndice 1) para SSCP.
4. Se desnaturalizaron las muestras a 95°C durante cinco minutos y se dejaron reposar otros cinco minutos en hielo (éstas debieron desnaturalizarse una vez que los geles se encontraban polimerizados).
5. Se prepararon los geles de poliacrilamida, con los reactivos y cantidades indicados en la tabla I del apéndice 1.
6. Los vidrios se ensamblaron y se vertió el gel de poliacrilamida.
7. Se dejaron polimerizar por 60 minutos a temperatura ambiente.
8. Una vez pasado el tiempo de polimerización, se monta la cámara de electroforesis.
9. Las cámaras se llenaron con buffer TBE 1X, preparada a partir de la solución stock 10X (apéndice 1).
10. Se colocaron 3 μ L de cada muestra desnaturalizada en los pozos del gel, y se aplicó una corriente de 190V por 18 horas para geles sin glicerol y de 22 horas para geles que contenían glicerol.

11. Al término de la electroforesis, se transfirió el gel a un papel filtro Whatman 3MM, el cual se secó en un desecador (Gel Dryer GD2A, Labnet) por 60 minutos a 75°C.
12. Finalmente, el gel se colocó en un cassette con pantallas intensificadoras y se expuso a una placa radiográfica Kodak (14 x 17 pulgadas) durante 4-16 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se reveló la placa y se analizaron los resultados. Las muestras que mostraron un cambio de corrimiento electroforético fueron secuenciadas.

SECUENCIACIÓN

La técnica de Sanger utiliza la síntesis de ADN para generar fragmentos terminales en puntos específicos a lo largo de una secuencia blanco (Sanger y col. 1977) (92).

El rompimiento de la secuencia de ADN va seguido de la introducción de dideoxynucleósidos trifosfatos (ddNTPs), análogos de nucleósidos, los cuales pueden ser sustituidos por deoxynucleósidos en una posición al azar durante la etapa de copiado de una de las hebras del ADN, así como también terminar la síntesis del ADN de manera específica. Utilizando los ddNTPs correspondientes a las bases nucleotídicas por separado en reacciones de síntesis, se pueden generar cuatro poblaciones de oligonucleótidos, que determinan cada posición en la hebra del ADN. Las bandas de ADN, por tanto pueden ser corridas en un gel por medio de una electroforesis, y la secuencia ser deducida a partir del orden de corrimiento de las bandas.

Purificación de ADN

Metodología

1. Se amplificaron las muestras de ADN por medio de un PCR, a continuación se muestra una tabla con los reactivos y cantidades agregadas.

Solución dNTP	1mM
Buffer 10X	25 μ M
Oligo 5'	40 μ M
Oligo 3'	40 μ M
DMSO	2.0 μ L
ADN genómico humano	1.0 μ g
ADN polimerasa termoestable	5.0U
Agua dd	31.5 μ L

- 2.El ADN obtenido se purificó en columnas Centricon 30 (Amicon), para lo cual se colocó la muestra en la columna y se llevó a 1mL.
- 3.Las muestras se centrifugaron a 7 500 rpm (rotor Sorvall RC-5B) durante 30 min a 4°C.
- 4.Se agregó 1 mL de agua dd a la columna y se centrífugo en las mismas condiciones.
- 5.La columna se invirtió sobre un tubo cónico y se centrífugo a 4 000 rpm durante cinco minutos.
- 6.El producto obtenido se cuantificó espectrofotométricamente, y se corrió una alícuota de 5 μ L en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Secuenciación

Metodología

- 1.Para llevar a cabo la secuenciación se utilizó el estuche de secuenciación de Termosecuensasa (α -³³P) de Amersham. En cada tubo de reacción se colocaron los siguientes reactivos:

Didesoxinucleótidos marcados reactivamente (α - ^{33}P) (ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP a 0.225 μCi)	7.5 μM
ADN purificado	3.0 fmol
Termosecuensasa ADN polimerasa	8 U
Buffer reactivo	25 μM
DITP Master Mix	7.5 μM
Oligonucleótido cebador L	20 μM
Agua dd	12.2 μL

2. En la siguiente tabla se muestra las temperaturas y tiempo a las que fueron sometidas las reacciones.

Paso	Tiempo	Temperatura
1	30 s	95°C
2	30 s	60°C
3	1 min	72°C

Nota: En cada ciclo se repiten estos tres pasos.
El número de ciclos es de 35.

- Al finalizar las reacciones, se adicionaron a cada tubo 4 μL de solución stop (apéndice 1) para detener la reacción.
- Las muestras se desnaturalizaron a 70°C durante cinco minutos.
- Se prepararon geles de acrilamida-urea y se dejaron polimerizar por 60 min (la preparación de los geles se encuentra en el apéndice)
- Los geles se montaron en las cámaras de electroforesis, utilizándose buffer TTE (apéndice 1) para correrlos, precalentando las cámaras a 1 800V, hasta llegar a 50°C.
- Se tomaron 3 μL de cada muestra y se depositaron en cada pozo de los geles. Se corrió la electroforesis a 1 800V por hora y media en cada corrida, realizándose dos corridas.
- Los geles se transfirieron a papel Whatman 3MM, y se secaron durante 60 min a 75°C.

9. Los geles adheridos al papel se expusieron a placas de rayos X en cartuchos con pantallas intensificadoras. Se dejaron a temperatura ambiente de 12-16 horas y se revelaron las placas.
10. Se leyeron las secuencias del exón y se compararon con la secuencia reportada en el banco de genes, reportada por Furuta y col. (82).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas se les realizó el análisis de t de student, considerándose un valor de p menor o igual a 0.05 significativo.

VI. RESULTADOS

VI. RESULTADOS

A cada uno de los sujetos controles se les tomó la medida de cintura y cadera (índice cintura/cadera), ya que según literatura reportada, podría existir una tendencia en la aparición de diabetes tipo 2 en sujetos obesos, dependiendo de este índice. También se calculó el IMC para cada sujeto, a partir de su peso y su estatura. A continuación se presenta la tabla con los resultados para cada control.

Tabla 5. Datos de sujetos control.

Característica	$\bar{X} \pm SD$	No. de sujetos (N)
Edad (años)	59.9 ± 10.05	20
Peso (Kg)	62.20 ± 7.74	20
Talla (m)	1.592 ± 0.07	20
IMC (Kg/cm ²)	24.53 ± 2.46	20
ICC	0.859 ± 0.06	20

Abreviaciones: IMC, índice de masa corporal; ICC, índice cintura cadera.

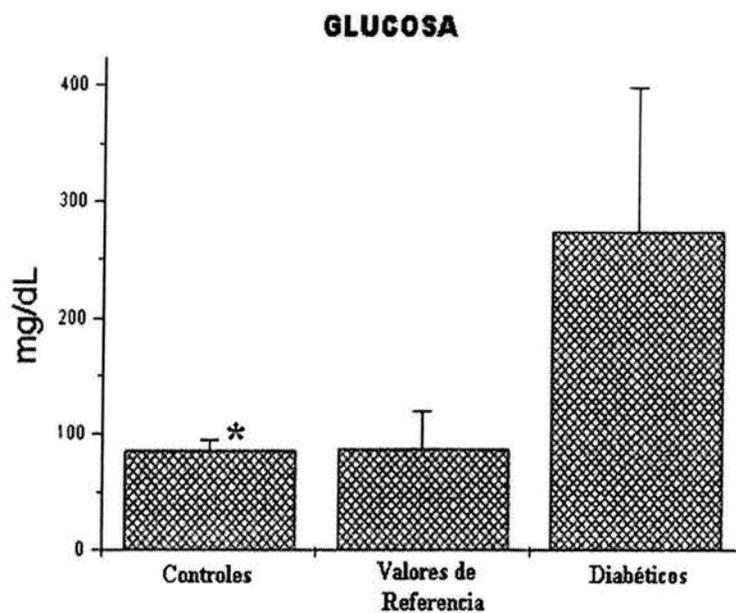
Posterior a esto a todos los sujetos control se les realizaron las pruebas bioquímicas, en la siguiente tabla se muestran los resultados.

Tabla 6. Perfil bioquímico de los sujetos control

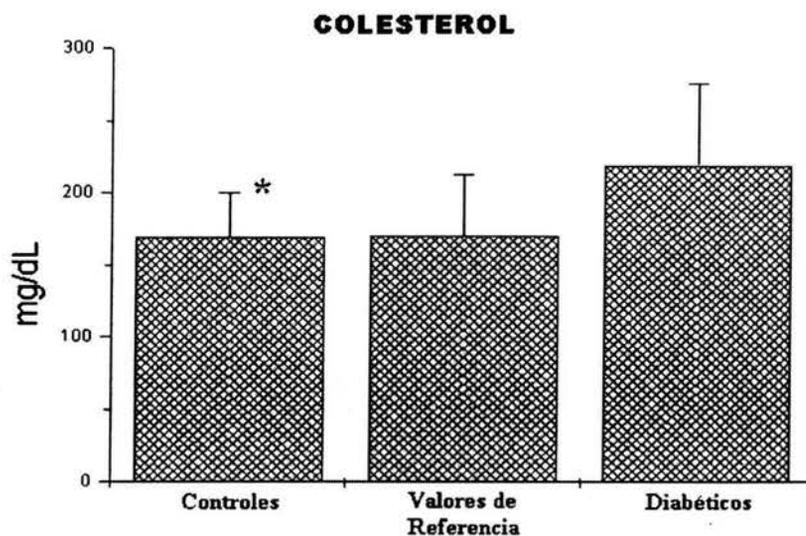
Prueba Bioquímica	$\bar{X} \pm SD$	No. de Sujetos (N)	Valores de Referencia
Glucosa (mg/dL)	85.84 ± 9.58	20	110-65 (mg/dL)
Colesterol (mg/dL)	169.18 ± 31.00	20	140-200 (mg/dL)
Triglicéridos (mg/dL)	167.17 ± 66.23	20	50-200 (mg/dL)

En las figuras que se presentan a continuación, se muestra una comparación hecha con los valores obtenidos de las pruebas bioquímicas para los controles, los valores de referencia y los resultados de veinte diabéticos tomados al azar (los valores de referencia y

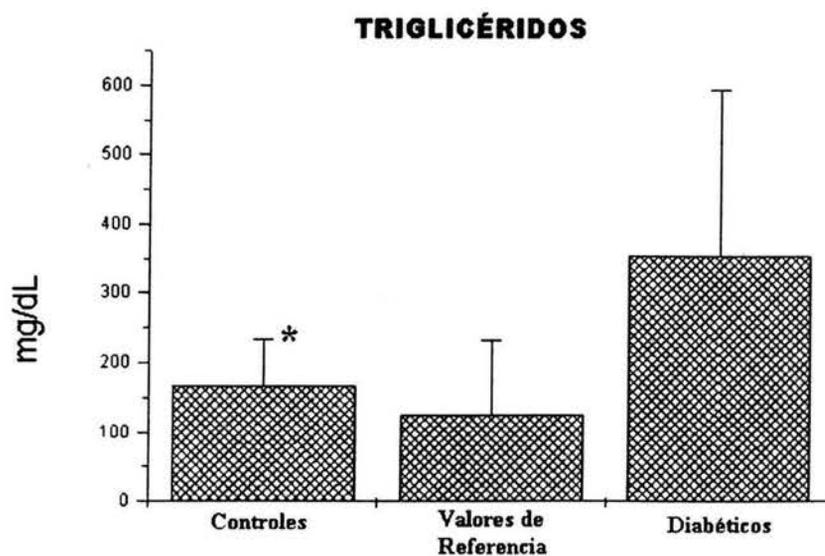
de diabéticos fueron tomados del Hospital Juárez de México). Las figura 5, 6 y 7 muestran las concentraciones para glucosa, colesterol y triglicéridos respectivamente, obtenidos en los grupos evaluados, así, como se puede observar, para los tres casos, la diferencia entre los valores de los sujetos control y los valores de referencia no es significativa, mientras la diferencia entre los valores de los sujetos control y los valores de diabéticos, la diferencia sí es significativa.



*Fig. 5. Gráfico con los valores de glucosa de controles, diabéticos y valores de referencia. A los datos se les hizo una t de student, * $p < 0.05$ Controles vs. Diabéticos.*



*Fig. 6. Gráfico con los valores de colesterol de controles, diabéticos y valores de referencia. A los datos se les hizo una t de student, * $p < 0.05$ Controles vs. Diabéticos.*



*Fig. 7. Gráfico con los valores de triglicéridos de controles, diabéticos y valores de referencia. A los datos se les hizo una t de student, * $p < 0.05$ Controles vs. Diabéticos.*

Respecto a las determinaciones hormonales a cada sujeto control se le determinó la concentración circulante de insulina y glucagon. Los resultados se muestran a continuación.

Tabla 7. Perfil hormonal de los sujetos control

Hormona	$\bar{X} \pm SD$	No. de Sujetos (N)	Valores de Referencia
Insulina (pg/mL)	5.05 \pm 3.37	20	3-6 (pg/mL)
Glucagon (pg/mL)	70.3 \pm 23.81	20	59-177 (pg/mL)

EXTRACCIÓN DE ADN

Al ADN extraído se le determinó la pureza y la concentración espectrofotométricamente, dando los valores mostrados en la tabla que se presenta a continuación:

	$\bar{X} \pm SD$
Pureza	1.864 \pm 0.09
Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	1.139 \pm 0.46

CUANTIFICACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Se comprobó la talla de los oligonucleótidos, mediante un PCR, los productos de la reacción se corrieron en un gel de agarosa al 1%, utilizando un marcador de 100 pb. La figura 8 muestra un ejemplo tipo de la foto (el gel se observó por medio de luz UV) del corrimiento electroforético de los productos del PCR al que se sometieron los oligonucleótidos. En el carril 1 y 2 se depositó el producto de la reacción del exón 2-1 (483 pb), mientras que en el carril 3 y 4, el producto de la reacción del exón 2-2 (464 pb) y, finalmente en los carriles 5 y 6, se depositó el producto de la reacción correspondiente al exón 2-3 (447 pb).

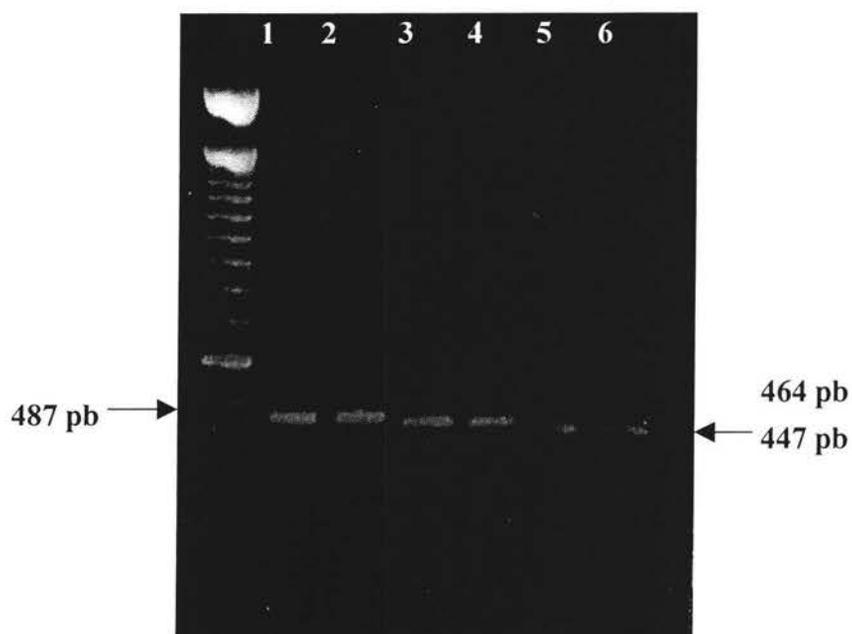


Fig. 8. PCR para probar la talla de los exones. La figura muestra en los carriles 1 y 2 la talla correspondiente al exón 2-1 (487 pb); en los carriles 3 y 4 la talla correspondiente al exón 2-2 (464 pb); y por último, en los carriles 5 y 6 la talla correspondiente al exón 2-3 (447 pb).

AMPLIFICACIÓN DE MUESTRAS CONTROL

Se llevó a cabo la amplificación de las muestras para cada exón, en la figura 9 se observa un ejemplo tipo de una foto del corrimiento electroforético de los productos de la reacción del PCR para cada una de las muestras amplificadas (muestras C-6 a la C-20). Los productos fueron corridos en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

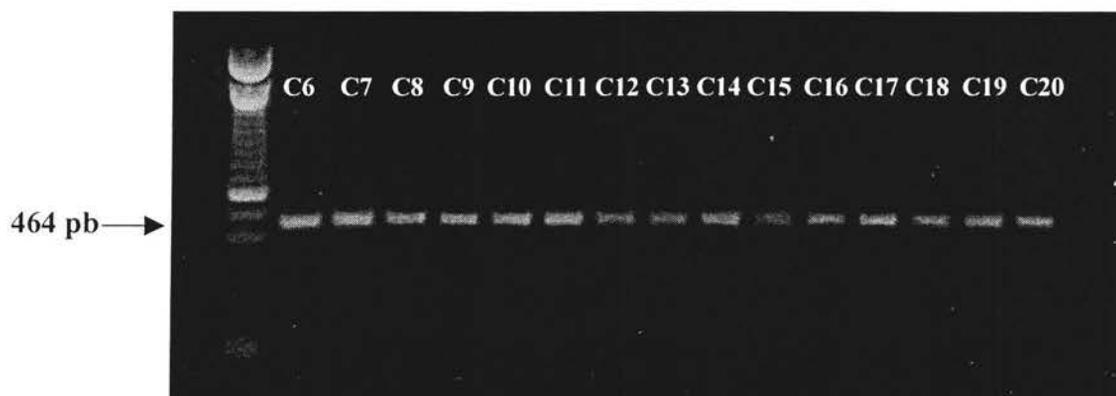


Fig. 9. Amplificación del exón 2-2 para las muestras de los controles.

ANÁLISIS POLIMÓRFICO CONFORMACIONAL DE CADENA SIMPLE (SSCP)

Para cada exón se realizaron cuatro SSCPs, variando la concentración de acrilamida del gel: con 5.4% de acrilamida con y sin glicerol, y con 8.0% de acrilamida con y sin glicerol. Los geles que no contenían glicerol corrieron por 18 h a 200V, mientras que los que contenían glicerol corrieron por 22 h a 200V.

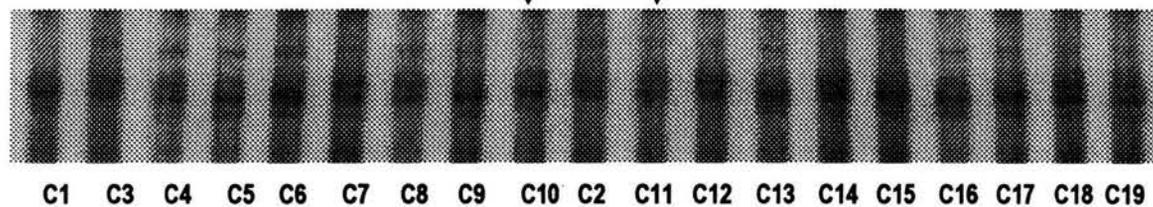
Para el exón 2-1 se observan (Fig. 10 panel A) claramente dos patrones de migración diferentes, éstos se encuentran indicados por las flechas; así, en el carril correspondiente a la muestra del control C11 se observan tres bandas, mientras que en el correspondiente al control C10 sólo se observan dos bandas. En el panel B también se observan dos patrones de migración, presentándose dos y tres bandas, las flechas indican los dos patrones presentes. En el panel C y D no se observan cambios, es decir, todas las muestras tienen el mismo patrón de migración.

Con respecto al exón 2-2 en la figura 11 se muestran las placas de las SSCPs realizadas. Los carriles indicados por las flechas (panel A y C) correspondientes a la muestra C3, muestran un patrón de migración diferente, indicando con ello un cambio en una base. No obstante, en los paneles B y D las muestras presentan el mismo corrimiento electroforético.

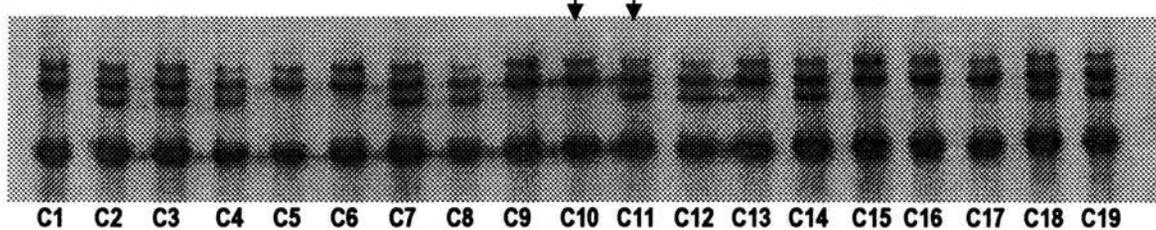
La figura 12 muestra los resultados de las SSCPs obtenidas para el exón 2-3, presentándose un patrón de migración diferente en el carril correspondiente a la muestra C17 (panel A y B) indicado por la flecha (la segunda banda es más ancha que las demás). Las SSCPs realizadas en un gel al 8.0% de acrilamida con y sin glicerol no mostraron cambios en el patrón de migración (paneles C y D).

SSCP, Exón 2-1

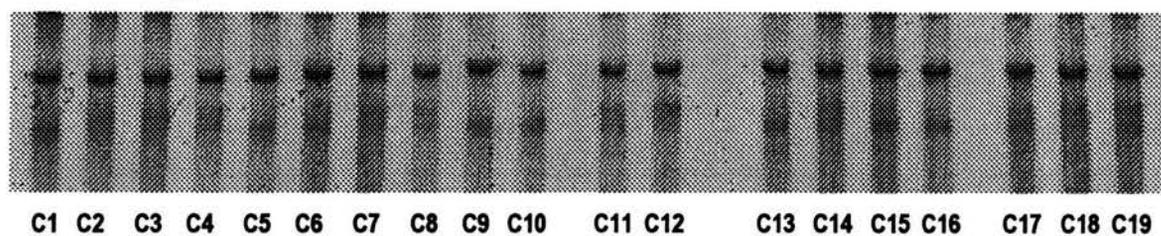
5.4% con glicerol



5.4% sin glicerol



8.0% con glicerol



8.0% sin glicerol

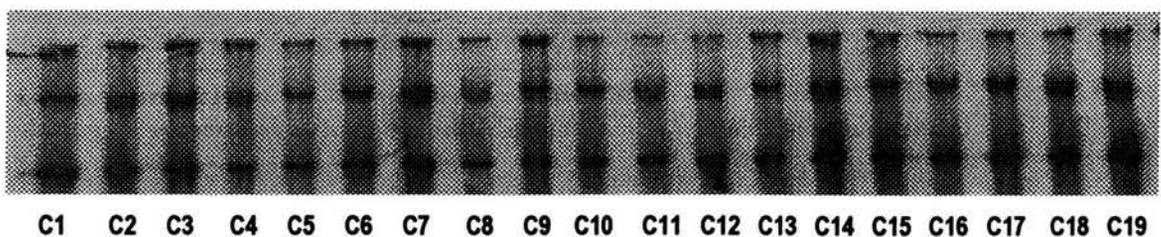


Fig. 10. Análisis SSCP del ADN de los controles correspondiente al exón 2-1 del gen NeuroD1. En la figura se muestran las SSCPs obtenidas: (A) 5.4% con glicerol. (B) 5.4% sin glicerol. (C) 8.0% con glicerol. (D) 8.0% sin glicerol. Las flechas indican los diferentes patrones de migración.

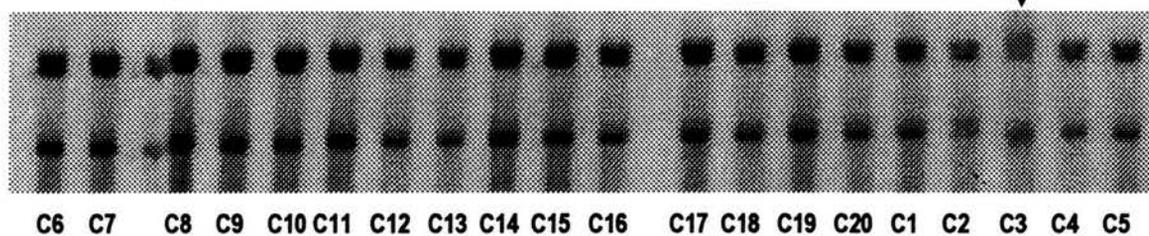
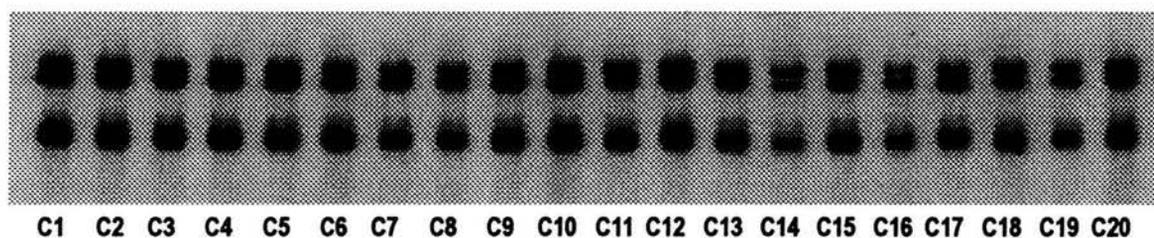
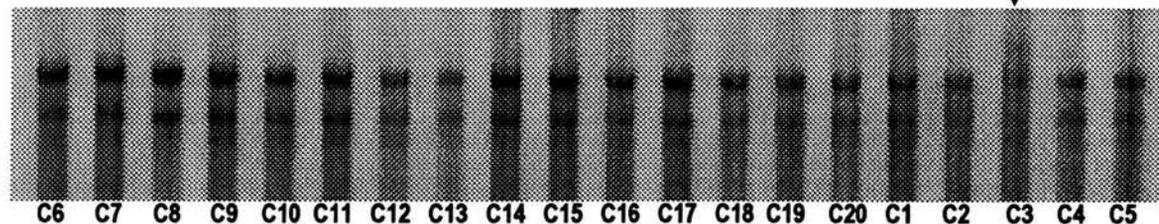
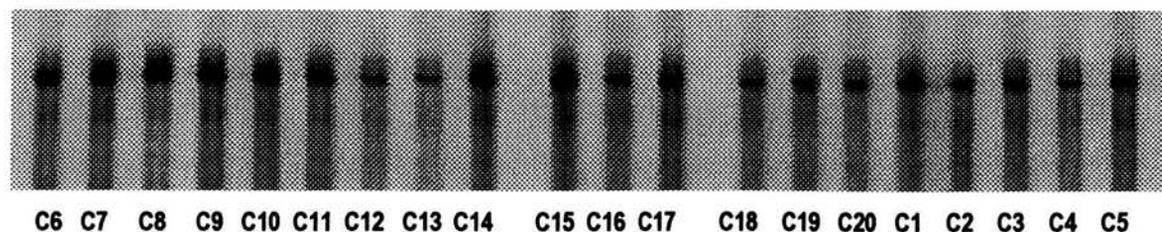
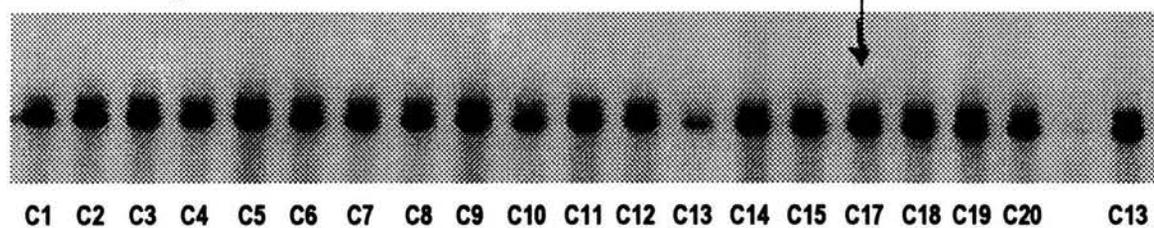
SSCP, Exón 2-2**5.4% con glicerol****5.4% sin glicerol****8.0% con glicerol****8.0% sin glicerol**

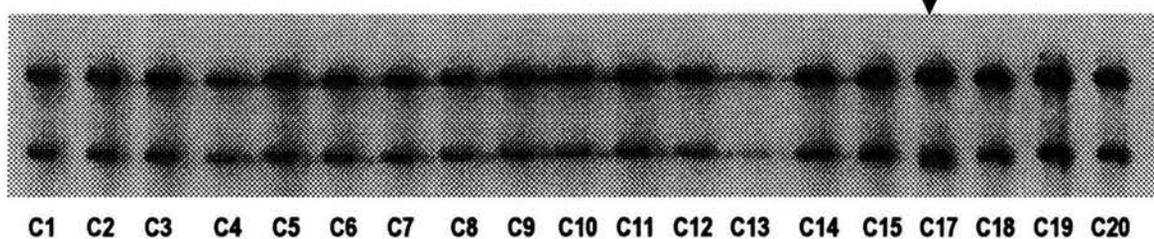
Fig. 11. Análisis SSCP del ADN de los controles correspondiente al exón 2-2 del gen *NeuroD1*. En la figura se muestran las SSCPs obtenidas: (A) 5.4% con glicerol. (B) 5.4% sin glicerol. (C) 8.0% con glicerol. (D) 8.0% sin glicerol. Las flechas indican el patrón de migración diferente.

SSCP, Exón 2-3

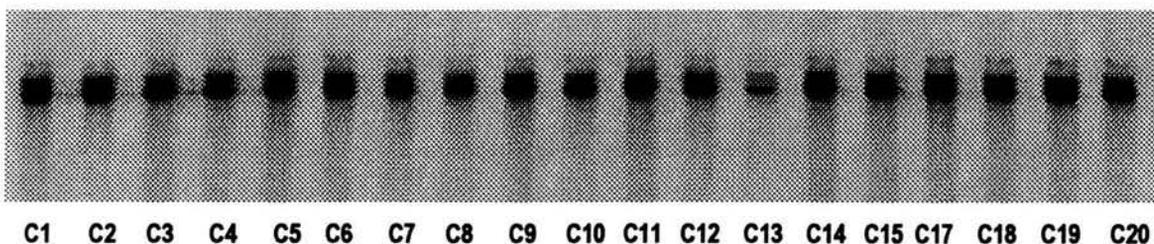
5.4% con glicerol



5.4% sin glicerol



8.0% con glicerol



8.0% sin glicerol

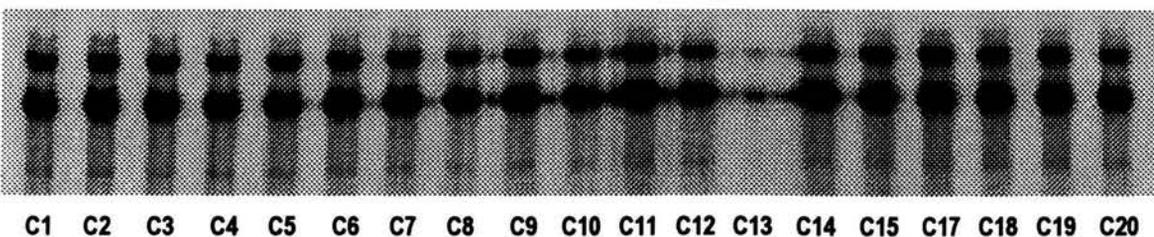


Fig. 12. Análisis SSCP del ADN de los controles correspondiente al exón 2-3 del gen NeuroD1. . En la figura se muestran las SSCPs obtenidas: (A) 5.4% con glicerol. (B) 5.4% sin glicerol. (C) 8.0% con glicerol. (D) 8.0% sin glicerol. Las flechas señalan el patrón de migración diferente.

SECUENCIACIÓN

De acuerdo a los resultados de las SSCPs se seleccionaron aquellas muestras que presentaran un patrón de migración diferente para secuenciarlas y con ello determinar el cambio de base en dichas muestras. En la figura 13 se observa la secuenciación manual, para las muestras C10 y C11 (exón 2-1), C3 (exón 2-2) y por último C17 (exón 2-3). Asimismo se corroboraron los resultados obtenidos por medio de una secuenciación automatizada (figuras 14, 15, 16 y 17), en las cuales se muestra el cambio de base por medio de una N de color rojo encerrada en un rectángulo.

La secuencia obtenida para la muestra C10 (Fig. 14) corresponde a la secuencia listada en el Banco de Genes con número de acceso AF045152, por lo que se puede observar claramente al compararse con la obtenida para la muestra C11 (Fig. 15) el cambio de base en ésta última de una guanina por una adenina en el codón 45.

En el caso de la muestra C3, la secuencia obtenida se comparó con la secuencia listada en el Banco de Genes con número de acceso AF045152, encontrándose el cambio de una guanina por una adenina en el codón 119, que corresponde al exón 2-2 (Fig. 16).

Por último, con respecto a la muestra C17, al compararse la secuencia obtenida con la reportada (ésta listada en el Banco de Genes con número de acceso AF045152), se observó un cambio de una citosina por una guanina en el codón 350 correspondiente al exón 2-3.

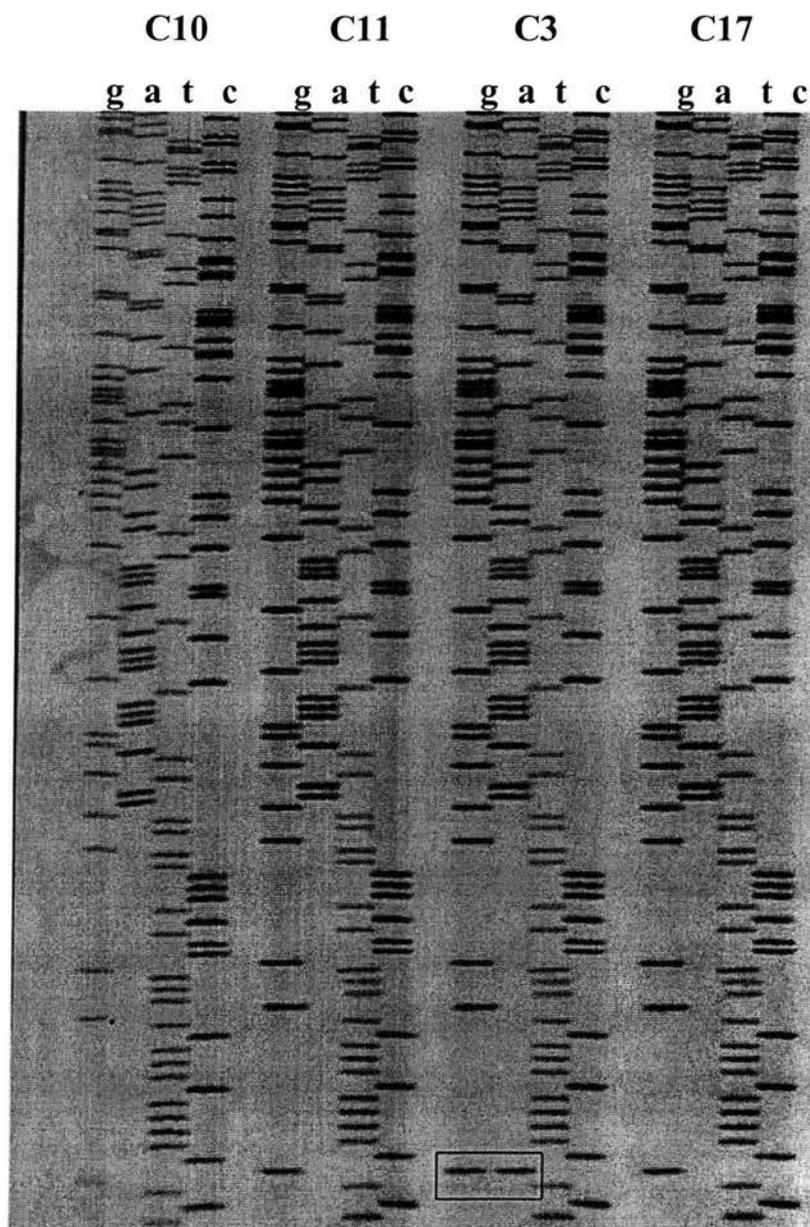


Fig. 13. Secuenciación manual del gen NeuroD1/BETA2. Secuenciación de las muestras que presentaron un cambio electroforético en las SSCPs. El gel al 6% de poliacrilamida se corrió por 3 h a 1800V. Las muestras de los controles 10 y 11, corresponden al exón 2-1 del gen NeuroD1/BETA2. Los controles C-3 y C-17, corresponden a los exones 2-2 y 2-3 respectivamente.



Model 3100
Version 3.7
Basecaller-3100SR.bcp
BC 1.3.0.0

2_NeuroD1 E2-1A.ab1
Katy Sanchez
9035rr
Cap 6

Signal G:1376 A:1591 T:803 C:779
DT3100POP6(BD)v2.mob
demo_3100
Points 509 to 5800 Pk 1 Loc: 509

Page 1 of 1
Fri, Jan 16, 2004 7:42 PM
Fri, Jan 16, 2004 4:55 PM
Spacing: 11.38(11.38)

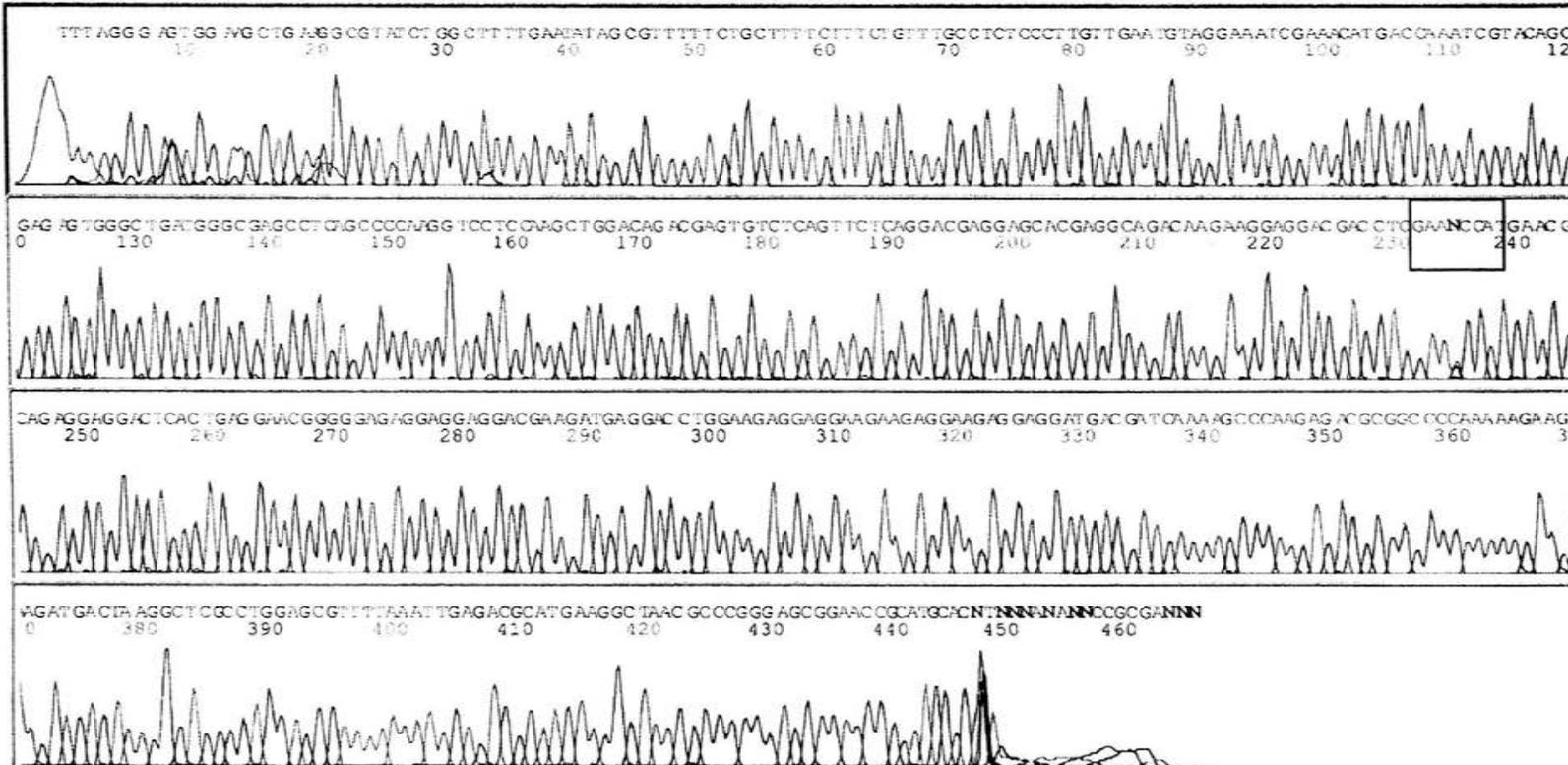


Fig. 15. Secuenciación automatizada de la muestra C11 correspondiente al exón 2-1 del gen NeuroD1/BETA2.



Model 3100
Version 3.7
Basecaller-3100SR.bcp
BC 1.3.0.0

3_NeuroD1Exon2-2A.ab1
Katy Sanchez
9043
Cap 14

Signal G:2593 A:1412 T:1260 C:1448
DT3100POP6(BD)v2.mob
demo_3100
Points 508 to 5650 Pk 1 Loc: 508

Page 1 of 1
Fri, Jan 16, 2004 7:42 PM
Fri, Jan 16, 2004 4:55 PM
Spacing: 11.38(11.38)

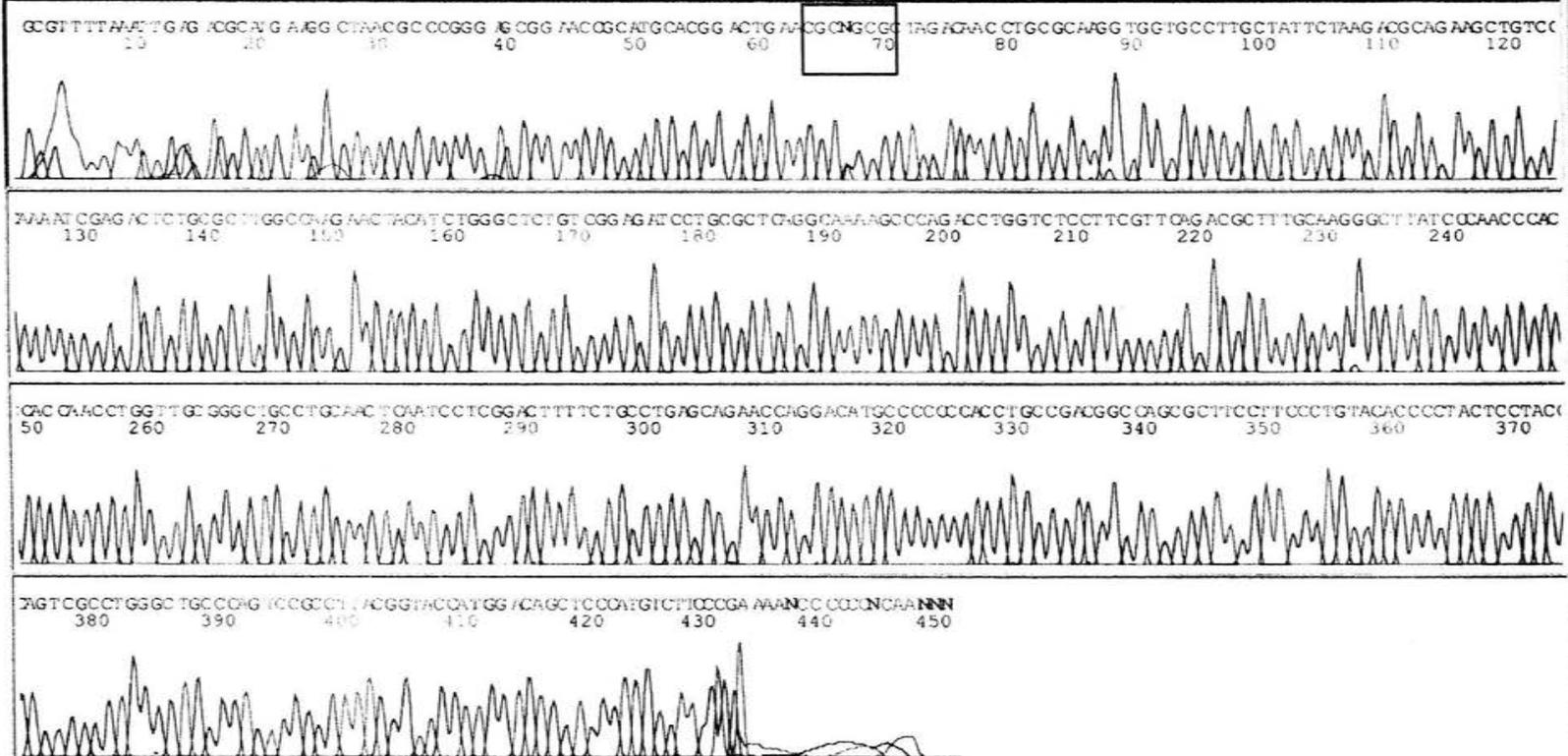


Fig. 16. Secuenciación automatizada de la muestra C3 correspondiente al exón 2-2 del gen NeuroD1/BETA2.



Model 3100
Version 3.7
Basecaller-3100SR.bcp
BC 1.3.0.0

4_NeuroD1 Exon 2-3A.ab1
Katy Sanchez
9044rr
Cap 13

Signal G:1727 A:1774 T:1788 C:1663
DT3100POP6(BD)v2.mob
demo_3100
Points 592 to 5700 Pk 1 Loc: 592

Page 1 of 1
Mon, Jan 19, 2004 5:27 PM
Mon, Jan 19, 2004 1:39 PM
Spacing: 12.34{12.34}

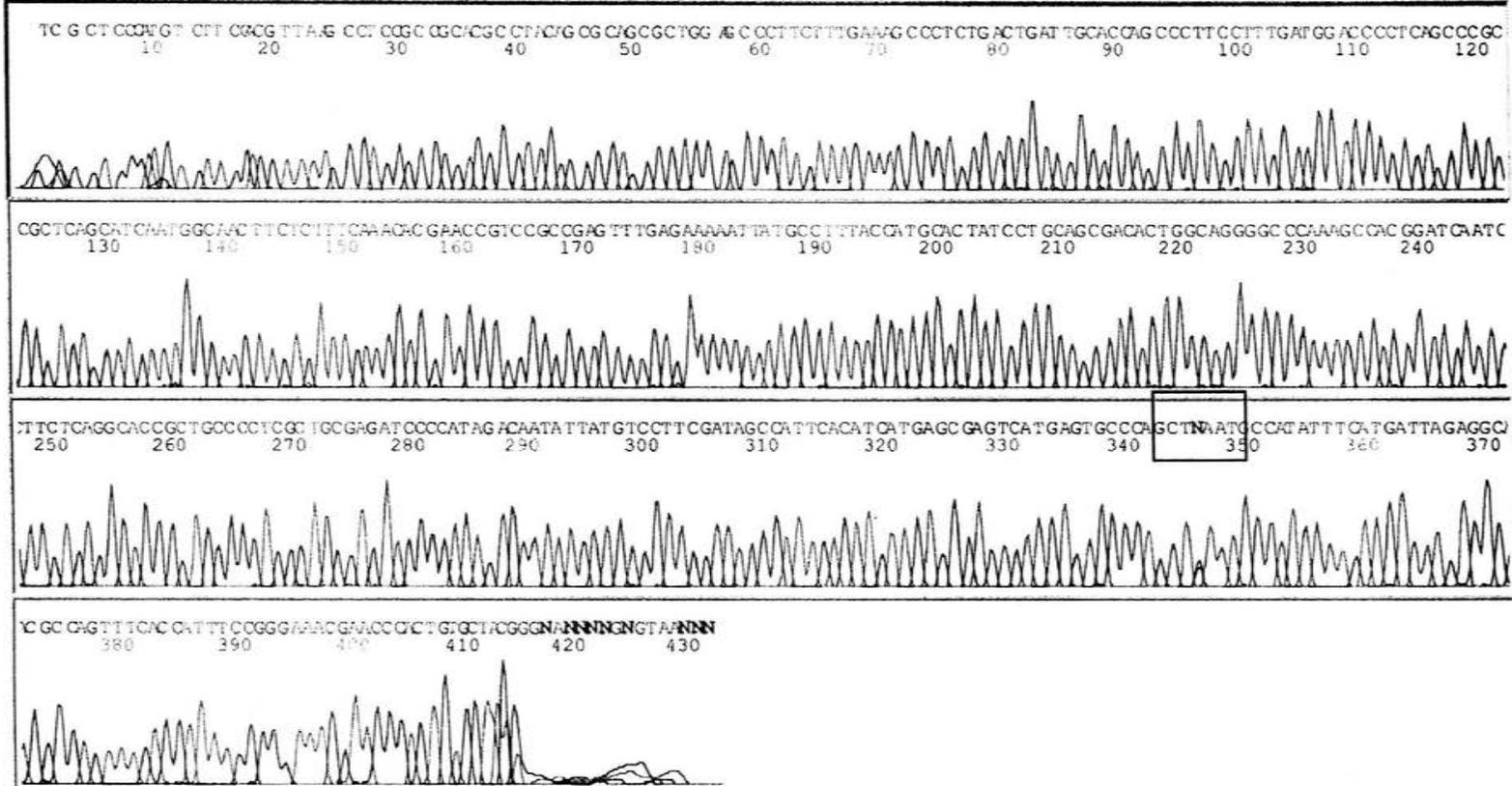


Fig. 17. Secuenciación automatizada de la muestra C17, exón 2-3 del gen NeuroD1/BETA2.

VII. DISCUSIÓN

VII. DISCUSIÓN

Como se sabe, la diabetes mellitus es un problema grave de salud pública, las estadísticas lo muestran, pues las cifras de personas enfermas se incrementa día con día (50). Esto podría deberse principalmente a que el diagnóstico no se realiza de la manera adecuada, debido a que individuos que se encuentran en la etapa inicial de la diabetes mellitus tipo 2 MODY, presentan niveles de glucosa ligeramente altos, pero no lo suficiente como para presentar síntomas clínicos, como consecuencia transcurre un periodo de tiempo prolongado antes de que se diagnostique la enfermedad (51). A esto se le suma la aparición de diabetes a edades cada vez más tempranas y los factores genéticos predisponentes, éstos últimos de gran importancia, pues se sabe que se encuentran directamente relacionados con la aparición de la diabetes mellitus tipo 2. Es por estas razones, que en el presente trabajo se incursionó en el área molecular de la diabetes, pretendiendo con ello, sentar las bases moleculares de dicha enfermedad, esperando lograr una mejor comprensión de los mecanismos de la misma, que ayudará a proponer tratamientos alternativos y de prevención.

Así, como se mencionó anteriormente, lo primero que se realizó fue la recolección de muestras sanguíneas de sujetos que cumplían con ciertas características. El primer criterio de exclusión tomado en cuenta, fue la edad pues sólo se incluyeron en el proyecto personas mayores de 50 años. En la tabla 5, se muestra que la edad promedio de los individuos fue de 59.9 ± 10.05 años, garantizando con ello que los sujetos no presentaron diabetes mellitus tipo 2 MODY, ya que como sabemos, la edad de aparición de este tipo de diabetes es generalmente alrededor de los 25 años o menos (60). El segundo criterio de exclusión fue el IMC, los sujetos con un IMC por arriba de 28 Kg/m^2 no fueron tomados en cuenta, así, se obtuvo un valor promedio de $24.53 \pm 2.46 \text{ Kg/m}^2$. El IMC tiene un papel importante, ya que aquellos individuos con un IMC mayor a 30 Kg/m^2 , presentan obesidad, factor que influye en la manifestación de la diabetes mellitus y que además ocasiona resistencia a la insulina (93), lo cual interferiría con el estudio. El tercer criterio de exclusión, y probablemente el de mayor importancia, fue la herencia familiar, excluyéndose aquellos sujetos que tuvieran padres y abuelos que presentaran diabetes mellitus, pues una de las características principales del tipo MODY es que tiene un carácter hereditario autosómico

dominante (60). Cabe mencionar, que a los sujetos control también se les tomaron medidas de cintura y cadera, con las cuales se calculó el índice cintura-cadera (ICC), pues en estudios recientes, este índice se ha asociado con la aparición de diabetes mellitus tipo 2, específicamente, se ha encontrado que personas con familiares que padecen este tipo de diabetes tienen un ICC mayor, comparado con aquellos sujetos que no tienen familiares que padezcan diabetes mellitus tipo 2 ($ICC > 0.9$) (94). Para este caso el promedio de ICC registrado fue de 0.859 ± 0.06 .

Asimismo para descartar cualquier tipo de desvío en los resultados, a los sujetos control se les realizaron pruebas bioquímicas y hormonales. Con respecto a las pruebas bioquímicas, no se encontraron diferencias significativas entre los valores obtenidos para los controles y los valores de referencia registrados en el hospital. Esto se observa claramente en las figuras 5, 6 y 7, las cuales muestran una comparación entre los valores registrados de diabéticos, los valores de referencia y los valores obtenidos para los sujetos control. Así, se puede observar que la dispersión de los valores de las pruebas de glucosa y colesterol para los sujetos control es menor que la obtenida para los valores de referencia, lo cual se explica debido a que los sujetos control fueron seleccionados bajo criterios más específicos (edad, IMC, ICC). No obstante, es necesario hacer notar que entre los valores de los sujetos control y los valores de diabéticos existe una diferencia significativa, lo que se hace evidente en las gráficas mostradas en las figuras. En cuanto a las pruebas hormonales, en ambos casos se puede observar que el promedio de los valores obtenidos para los sujetos control, se encontró dentro del intervalo de valores de referencia, lo que concuerda con los valores obtenidos para glucosa, pues una alteración en cualquiera de las dos hormonas, daría como consecuencia una variación en dichos valores.

Una vez que se hizo la selección de los sujetos control, se llevaron a cabo los PCRs, correspondientes a cada exón. Posteriormente, se realizó el análisis polimórfico conformacional de cadena simple (SSCP) seguido de una secuenciación, con la finalidad de identificar los polimorfismos presentes en las muestras. La ventaja de estas técnicas es que se pueden identificar polimorfismos y mutaciones puntuales en una variedad de posiciones en fragmentos de ADN (91). Asimismo, la importancia de realizar este experimento radica en el hecho de que los polimorfismos diferencian a un individuo de otro, pues todos tenemos el mismo material genético que codifica para proteínas que llevan a cabo las

mismas funciones en todos los individuos, no obstante esos cambios en una sola base denominados SNPs, son los que nos dan individualidad. De esta manera, los resultados obtenidos de la SSCP se muestran en la figuras 10, 11 y 12, mostrándose en el exón 2-1, dos tipos diferentes de patrones de migración, así en uno de ellos se observan dos bandas, mientras que en el otro se observan tres bandas. Ya que aproximadamente en la mitad de los sujetos control se presentó el mismo patrón de migración, esta variante es de alta prevalencia. En el caso de los exones 2-2 y 2-3, se diferenciaron dos patrones de migración, al igual que en el caso anterior (Fig. 11 y 12), sin embargo, el patrón de migración diferente sólo se observó en una muestra, a diferencia del exón 2-1, por lo que se infiere que éste último tienen una baja prevalencia.

Una vez identificadas las muestras con patrón de migración diferente mediante SSCP, éstas se secuenciaron, para determinar qué base correspondía a cada patrón de migración. Así, para la muestra correspondiente al control C11 del exón 2-1, se encontró un cambio de una guanina por una adenina en el codón 45, hecho que se corroboró con los resultados de la secuenciación automatizada. Dicho cambio se puede observar en la figura 15, la cual, al compararse con la secuencia de la figura 14, que corresponde a la secuencia reportada por el Banco de Genes, hace evidente el polimorfismo encontrado A45T. De este modo, al producirse el cambio de una alanina por una treonina, se altera la secuencia de aminoácidos, sugiriendo con esto además, que puede existir una alteración en la conformación de la proteína, debido a la sustitución de un aminoácido no polar (alanina) por uno polar (treonina). Dado que los resultados se obtuvieron de sujetos sanos, se deduce que el cambio A45T puede ser una variante que confiera susceptibilidad pero no una mutación verdadera como lo mencionan ciertos reportes (83, 86, 87, 90). Así también, debido a que este cambio fue reportado en otros países como se mencionó anteriormente, se puede decir que la variante polimórfica A45T del gen NeuroD1/BETA2 tiene una amplia distribución entre las diferentes poblaciones.

Con respecto a la sustitución de una guanina por una adenina, en el codón 119, que corresponde a la muestra C3 para el exón 2-2, ésta no produce algún cambio en la secuencia de aminoácidos. En cuanto a la muestra C17, para el exón 2-3, se encontró una sustitución de una citosina por una guanina, y al igual que en el caso anterior dicha sustitución no produjo alteraciones en la secuencia de aminoácidos.

Finalmente, para poder definir si la variante polimórfica A45T presente en población mexicana se trata de un producto de migraciones poblacionales o si en realidad está ampliamente distribuida en el mundo, es necesario realizar otros estudios, que involucren a comunidades indígenas mexicanas y a un mayor número de sujetos control, así como también realizar estudios con sujetos diabéticos.

VIII. CONCLUSIONES

VIII. CONCLUSIONES

- En conclusión, se encontraron tres cambios, uno para cada exón. Dos de estas variantes polimórficas, no causaron alteración en la secuencia de aminoácidos de la proteína (exones 2-2 y 2-3). Mientras que el hallado en el exón 2-1, correspondiente a la sustitución de una guanina por una adenina en el codón 45, sí ocasionó una alteración en la secuencia de la proteína, ya que una alanina es sustituida por una treonina.
- Dado que los resultados fueron obtenidos en sujetos control, el cambio A45T corresponde a un polimorfismo que puede o no conferir susceptibilidad. Asimismo, el haber encontrado esta variación aproximadamente en la mitad de la población analizada indica que se trata de una variante polimórfica de alta prevalencia. Adicionalmente, al haberse reportado en diversos países, se puede decir que se trata de una variante polimórfica ampliamente distribuida en el mundo.

IX. BIBLIOGRAFÍA

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Smith Agreda V, Ferrés Torres E, Montesinos Castro-Girona M. Manual de Embriología y anatomía General. Tipografía Artística. España 1992. Pp. 723-726.
2. Huang HP, Tsai MJ. Transcription factors involved in pancreatic islet development. *Journal of Biomedical Science* 7: 27-34; 2000.
3. Deutsch G, Jung J, Zheng M, Lora J, Zares KS. A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development* 128: 871-881; 2001.
4. Larsen William J. Human Embriology. Churchill Livingstone. USA 2001. Pp 241-243.
5. Kemp DM, Thomas MK, Hebener JF. Developmental aspects of the endocrine pancreas. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 4: 5-17; 2003.
6. Chu K, Nemoz-Gaillard E, Tsai MJ. BETA2 and pancreatic islet development. *Recent Progress in Hormone Research* 56: 23-46; 2001.
7. Stoffers DA, Zinkin NT, Stanojevic V, Clarke WL, Habener JF. Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nature Genetics* 15:106-110; 1997.
8. McKnight S, Tjian R. Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. *Cell* 46: 795-805; 1986.
9. Dynan WS. Modularity in promoters and enhancers. *Cell* 58: 1-4; 1989.
10. Luque José, Herráez Ángel. Biología Molecular e Ingeniería Genética, Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud. Harcourt. España 2001. Pp. 265-377.
11. Dynan WS, Tjian R. The promoter-specific factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* 35: 79-87; 1983.
12. Lewin Benjamin. Genes VII. Oxford University Press. USA 2000. Pp. 649-653.
13. Swarup K. Chakrabarti y Raghavendra G. Mirmira. Transcription factors direct the development and function of pancreatic β cells. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 14: 78-84; 2003.

14. Weinstein DC, Ruiz i Altaba A, Chen WS, Hoodless P, Prezioso VR, Jessell TM, Darnell JE Jr. The winged-helix transcription factor HNF-3 β is required for notochord development in the mouse embryo. *Cell* 78: 575-588; 1994.
15. Ang SL, Rossant J. HNF-3 β is essential for node and notochord formation in mouse development. *Cell* 78: 561-574; 1994.
16. Sund NJ, Vatamaniuk MZ, Casey M, Ang SL, Magnuson MA, Stoffers DA, Matschinsky FM, Kaestner KH. Tissue-specific deletion of Foxa2 in pancreatic β cells results in hyperinsulinemic hypoglycemia. *Genes Development* 15: 1706-1715; 2001.
17. Ahlgren U, Pfaff SL, Jessell TM, Edlund T, Edlund H. Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature* 385: 257-260; 1997.
18. Jensen J, Pedersen EE, Galante P, Hald J, Heller RS, Ishibashi M, Kageyama R, Guillemot F, Serup P, Madsen OD. Control of endodermal endocrine development by Hes1. *Nature Genetics*. 24: 36-44; 2000.
19. Schwitzgebel VM, Scheel DW, Conner JR, Kalamaras J, Lee JE, Anderson DJ, Sussel L, Johnson JD, German MS. Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development* 127: 3533-3542; 2000.
20. Gradwohl G, Dierich a, LeMeur M, Guillemot F. Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proceedings of the National Academic of Sciences* 97: 1607-1611; 2000.
21. Apelqvist A, Li H, Sommer L, Beatus P, Anderson DJ, Honjo T, Hrabe de Angelis M, Lendahl U, Edlund H. Notch signaling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* 400: 877-881; 1999.
22. Naya FJ, Huang H-P, Qui Y, Muto H, De Mayo FJ, Leiter AB, Tsai M-J. Diabetes, defective-pancreatic morphogenesis, and abnormal neuroendocrine differentiation in BETA2/NeuroD-deficient mice. *Genes Development* 11: 2323-2334; 1997.

23. Lee YH, Sauer B, Gonzalez FJ. Laron dwarfism and non-insulin-dependent diabetes mellitus in the Hnf-1 α knockout mouse. Laron dwarfism and non-insulin-dependent diabetes mellitus in the Hnf-1 α knockout mouse. *Molecular and Cellular Biology* 18: 3059-3068; 1998.
24. Bartoov-Shifman R, Hertz R, Wang H, Wollheim CB, Bar-Tana J, Walker MD. Activation of the insulin gene promoter through a direct effect of hepatocyte nuclear factor 4 α . *Journal of Biological Chemistry* 277: 25914-25919; 2002.
25. Stoffel M, Duncan SA. The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF-4 α regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 13209-13214; 1997.
26. Barbacci E, Reber M, Ott MO, Breillat C, Huetz F, Cereghini S. Variant hepatocyte nuclear factor 1 is required for visceral endoderm specification. *Development* 126: 4795-4805; 1999.
27. Coffinier C, Barra J, Babinet C, Yaniv M. Essential role for the homeoprotein vHNF1/HNF-1 β in visceral endoderm differentiation. *Development* 126: 4785-4794; 1999.
28. Jacquemin P, Durviaux SM, Jensen J, Godfraind C, Gradwohl G, Guillemot F, Madsen OD, Carmeliet P, Dewerchin M, Collen D, Rousseau GG, Lemaigre FP. Transcription hepatocyte nuclear factor 6 regulates pancreatic endocrine cell differentiation and controls expression of the proendocrine gene Ngn3. *Molecular and Cellular Biology* 20: 4445-4454; 2000.
29. Jonsson J, Carisson L, Edlund T, Edlund H. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371: 606-609; 1994.
30. Offield MF, Jetton TL, Labosky PA, Ray M, Stein RW, Magnuson MA, Hogan BL, Wright CV. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 122: 983-995; 1996.

-
31. Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, Simu K, Edlund H. β -Cell-specific inactivation of the mouse *Ipfl/Pdx1* gene results in loss of the β -cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Development* 12: 1763-1768; 1998.
 32. Harrison KA, Thaler J, Pfaff SL, Gu H, Kehrl JH. Pancreas dorsal lobe agenesis and abnormal islets of Langerhans in *Hlxb9*-deficient mice. *Nature Genetics* 23: 71-75; 1999.
 33. Li H, Arber S, Jessell TM, Edlund H. Selective agenesis of the dorsal pancreas in mice lacking homeobox gene *Hlxb9*. *Nature Genetics* 23: 67-70; 1999.
 34. Sussel L, Kalamaras J, Hartigan-O'Connor DJ, Meneses JJ, Pedersen RA, Rubenstein JL, German MS. Mice lacking the homeodomain transcription factor *Nkx2.2* have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic β cells. *Development* 125: 2213-2221; 1998.
 35. Sander M, Sussel L, Connors J, Scheel D, Kalamaras J, De la Cruz F, Schwitzgebel V, Hayes-Jordan A, German M. Homeobox gene *Nkx6.1* lies downstream of *Nkx2.2* in the major pathway of β -cell formation in the pancreas. *Development* 127: 5533-5540; 2000.
 36. Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Torres M, Oliver G, Gruss P. The *Pax4* gene is essential for differentiation of insulin-producing β cells in the mammalian pancreas. *Nature* 386: 399-402; 1997.
 37. Ritz-Laser B, Estreicher A, Gauthier BR, Mamin A, Edlund H, Philippe J. The pancreatic β -cell specific transcription factor *Pax-4* inhibits glucagon gene expression through *Pax-6*. *Diabetologia* 45: 97-107; 2002.
 38. St-Onge L, Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Mansouri A, Gruss P. *Pax6* is required for differentiation of glucagon-producing α -cells in mouse pancreas. *Nature* 387: 406-409; 1997.
 39. Sander M, Neubuser A, Kalamaras J, Ec HC, Martin GR, German MS. Genetic analysis reveals that *Pax6* is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. *Genes Development* 11: 1662-1673; 1997.

40. Ritz-Laser B, Estreicher A, Klages N, Saule S, Philippe J. Pax 6 and Cdx-2/3 interact to activate glucagon gene expression on the G1 control element. *Journal of Biological Chemistry* 274: 4124-4132; 1999.
41. Hussain MA, Miller CP, Habener JF. Brn-4 transcription factor expression targeted to the early developing mouse pancreas induces ectopic glucagon gene expression in insulin-producing β -cells. *Journal of Biological Chemistry* 277: 16028-16032; 2002.
42. Mayer B. Davidson. Diabetes Mellitus, Diagnosis and Treatment. W. B. Saunders Company. USA 1998. Pp. 1-9.
43. Nelson David L, Cox Michael. Principles of Biochemistry Lehninger. Worth Publishers. USA, 2000. Pp. 547-557; 877-883.
44. Pfeffer SR, Rotham JE. Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. *Annual Review of Biochemistry* 56: 829-852; 1987.
45. Polonsky KS, Rubenstein AH. Current approaches to measurement of insulin secretion. *Diabetes Metabolism Reviews* 2: 315-329; 1986.
46. Kissebah AH, Vydellingum N, Murray R, Evans DJ, Hartz AJ, Kalkhoff RK, Adams PW. Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 54: 254-260; 1982.
47. Rosell R, Gomis R, Casamitjana R, Segura R, Vilardell E, Rivera F. Reduced hepatic insulin extraction in obesity; relationship with plasma insulin levels. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 56: 608-611; 1987.
48. Cockburn BN, Ostrega DM, Sturis J, Kubstrup C, Polonsky KS, Bell GI. Changes in pancreatic islet glucokinase and hexokinase activities with increasing age, obesity and the onset of diabetes. *Diabetes* 46: 1434-1439; 1997.
49. Sepúlveda J. Secretaría de Salud. Encuesta Nacional de Salud 2000. México 2000.
50. Estimaciones de Diabetes en el Mundo 1995-2025. WHO 1999 (WHO/OMS, 2000).
51. Velásquez MO, Lara EA, Tusié L MT, González CA. Prevención Primaria de la Diabetes: Una Necesidad para el siglo XXI. Biblioteca Virtual.

52. Manifestación del Impacto Regulatorio de la NOM-SSA-030, para la prevención, tratamiento y control de la hipertensión arterial/Diabetes. México 1999.
53. Kinoshita JH. Aldose reductase in the diabetic eye. *American Journal of Ophthalmology* 102: 685; 1986.
54. Derek LeRoith, Simeon I. Taylor, Jerrold M. Olefsky. Diabetes Mellitus. *A Fundamental and Clinical Text*. Lippincott Williams & Wilkins. USA 2000. Pp. 326-328.
55. Pyorala K, Laakso M, Uusitupa M. Diabetes and atherosclerosis: an epidemiologic view. *Diabetes Metabolism Reviews* 3: 463-524; 1987.
56. World Health Organization. Second Report of the WHO expert committee on diabetes mellitus. Technical report series No. 646. Switzerland, 1980.
57. Mathis D, Vence L, Benoist C. Cell death during progression to diabetes. *Nature* 414: 792-798; 2001.
58. Bingley PJ, Bonifacio E, Williams AJ, Genovese S, Bottazzo GF, Gale EA. Prediction of IDDM in the general population: strategies based on combinations of autoantibody markers. *Diabetes* 46: 1701-1710; 1997.
59. Harris MI, Klein R, Welborn TA, Knudman MW. Onset of NIDDM occurs at least 4-7 yr before clinical diagnosis. *Diabetes Care* 15: 815-819. 1992.
60. Fajans SS. Scope and Heterogeneous Nature of MODY. *Diabetes Care* 13:49-64. 1990
61. Haffner SM. Epidemiology of type 2 diabetes: risk factors. *Diabetes Care* 21[Suppl 3]: C3; 1998
62. Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clarck PM. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 36: 62-67; 1993.
63. Doria A., Plengvidhya N. Recent Advances in the Genetics of Maturity Onset Diabetes of the Young and Others Forms of Autosomal Dominant Diabetes. *Diabetes* 7:203-210, 2000.

-
64. Tusié-Luna MT. La genética de la diabetes mellitus Tipo 2: Genes implicados en la diabetes de aparición temprana. *Revista de Investigación Clínica* 52: 296-305, 2000.
 65. Sladek FM, Zhong W, Lai E, Darnell JE. Liver enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormones receptor superfamily. *Genes Development* 4: 2353-2365; 1990.
 66. Hertz R, Magenheimer J, Berman I, Bar-Tana J. Fatty acyl-Coa thioesters are ligands of nuclear factor-4alpha. *Nature* 392: 512-516; 1998.
 67. Kuo CJ, Conley PB, Chen L, Sladek FM, Darnell JE, Crabtree GR. A transcriptional hierarchy involved in mammalian cell-type specification. *Nature* 355: 457-46; 1992.
 68. Lehto M, Visten PO, Isomaa B, et al. Mutation in the HNF-4 α gene affects insulin secretion and triglyceride metabolism. *Diabetes* 48: 423-425; 1999.
 69. Brownlee M. Glycation and diabetic complications. *Diabetes* 43: 836-844; 1994.
 70. Stryer Lubert. Bioquímica. W. H. Freeman and Company. USA 1988. Pp. 463-467.
 71. Njølstad PR et al. Neonatal diabetes mellitus due to complete glucokinase deficiency. *New England Journal of Medicine* 344: 1588-1592; 2001.
 72. Ryffel GU. Mutations in the human genes encoding the transcription factors of the hepatocyte nuclear factor (HNF) 1 and HNF 4 families: functional and pathological consequences. *Journal of Molecular Endocrinology* 27: 11-29; 2001.
 73. Byrne MM, Sturis J, Menzel S, Yamagata K, Fajans SS, Drosnfield MJ, Bain SC, Hattersley AT, Velho G, Froguel P, Bell GI, Polonsky KS. Altered insulin secretory responses to glucose in diabetic and nondiabetic subjects with mutations in the diabetes susceptibility gene MODY3 on chromosome 12. *Diabetes* 45: 1503-1510; 1996.
 74. Permutt AM, Hattersley AT. Searching for Type 2 Diabetes Genes in the Post-genome Era. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 11: 383-393; 2000.
 75. Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF. Early-onset type II diabetes mellitus (MODY-4) linked to IPF-1. *Nature Genetics* 17: 138-139; 1997.
 76. Clocquet AR, Egan JM, Stoffers DA, Muller DC, Wideman L, Chin GA, Clarke WL, Hanks JB, Habener JF, Elahi D. Impaired insulin secretion and increased insulin sensitivity in familial maturity-onset diabetes of the young 4 (Insulin promoter factor 1 gene). *Diabetes* 49: 1856-1864; 2000.

-
77. Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M et al. Mutation in hepatocyte nuclear factor -1Beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nature Genetics* 17: 384-385; 1997.
 78. Mutoh H, Fung BP, Naya FJ, Tsai MJ, Nishitani J, Leiter AB. The basic helix loop helix transcription factor BETA2/ NeuroD is expressed in enteroendocrine cells and activates secretin gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 3560-3564; 1997.
 79. Lee JL, Hollenberg SM, Snider L, Turner DL, Lipnick N, Wientraub H. Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix loop helix transcription factor. *Science* 268: 836-844; 1995
 80. Naya FJ, Stellrecht CM, Tsai MJ. Tissue specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes Development* 9: 1009-1019; 1995.
 81. Tamimi R, Steingrimsson E, Copeland NG, Dyer-Montgomery K, Lee JE, Hernández R, Jenkins NA, Tapscott SJ. The NEUROD gene maps to human chromosome 2q32 and mouse chromosome 2. *Genomics* 34: 418-421; 1996.
 82. Furuta H, Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M, Sussel L, Le Beau MM, Davis EM, Ogata M, Iwamoto Y, German MS, Bell GI. β -Transcription factors and diabetes. Mutations in the coding region of the BETA2/NeuroD1 (NEUROD1) and Nkx2.2 (NKX2B) genes are not associated with Maturity-Onset Diabetes of the Young in Japanese. *Diabetes* 47: 1356-1358; 1998.
 83. Iwata I, Nagafuchi S, Nakashima H, Kondo S, Koga T, Yokogawa Y, Akashi T, Shibuya T, Umeno Y, Okeda T, Shibata S, Kono S, Yasunami M, Ohkubo H, Niho Y. Association of polymorphism in the NeuroD/BETA2 gene with type 1 diabetes in the Japanese. *Diabetes* 48: 416-419; 1999.
 84. Yamada S, Motohashi Y, Yanagawa T, Muruyama T, Kasuga A, Hirose H, Matsubara K, Shimada A, Saruta T. NeuroD/beta2 gene G→A polymorphism may affect onset pattern of type 1 diabetes in Japanese. *Diabetes Care* 24: 1438-1441; 2001.
 85. Mochizuki M, Amemiya S, Kobayashi K, Ishihara T, Aya M, Kato K, Kasuga A, Nakazawa S. The association of Ala45Thr polymorphism in NeuroD with child-

-
- onset Type 1a diabetes in Japanese. *Diabetes Research and Clinical Practice* 55:11-7; 2002.
86. Hansen L, Jensen JN, Urioste S, Petersen HV, Pociot F, Eiberg H, Kristiansen OP, Hansen T, Serup P, Nerup J, Pedersen O. NeuroD/BETA2 gene variability and diabetes: no associations to late-onset type 2 diabetes but an A45 allele may represent a susceptibility marker for type 1 diabetes among Danes. Danish Study Group of Diabetes in Childhood, and the Danish IDDM Epidemiology and Genetics Group. *Diabetes* 49: 876-878; 2000.
87. Malecki MT, Jhala US, Antonellis A, Fields L, Doria A, Orban T, Saad M, Warran JH, Montminy M, Krolewski AS. Mutations in NeuroD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nature Genetics* 23: 323-328; 1999.
88. Dupont S, Dina C, Hani EH, Froguel P. Absence of replication in the French population of the association between beta2/NeuroD-A45T polymorphism and type 1 diabetes. *Diabetes Metabolism* 25: 516-517; 1999.
89. Malecki MT, Cyganek K, Klupa T, Sieradzki J. The Ala45Thr polymorphism of BETA2/NeuroD1 gene and susceptibility to type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *Acta Diabetológica* 40:109-11; 2003.
90. Cinek O, Drevinek P, Sumnik Z, Bendlova B, Sedlakova P, Kolouskova S, Snajderova M, Vavrinec J. NEUROD polymorphism Ala45Thr is associated with type 1 diabetes mellitus in Czech children. *Diabetes Research and Clinical Practice* 60: 49-56; 2003.
91. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86: 2766-2770; 1989.
92. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with changes determining inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74: 5463-5467; 1977.
93. Cavaghan MK, Ehrmann DA, Polonsky KS. Interactions between insulin resistance and insulin secretion in the development of glucose intolerance. *Journal of Clinical Investigation* 106: 329-33; 2000.
-

94. Groop L, Forsblom C, Lehtovirta M, Tuomi T, Karanko S, Nissén M, Ehrnström BO, Forsén B, Isomaa B, Snickars B, Taskinen MR. Metabolic consequences of a family history of NIDDM (The Botnia Study): evidence for sex-specific parental effects. *Diabetes* 45: 1585-1593; 1996.

APÉNDICE 1

Extracción de ADN***Etanol al 100%******Sacarosa Tritón 2X***

Sacarosa (Gibco BRL)	219 g 0.64 M
Tris-base (USB)	2.42 g 0.02 M
MgCl ₂ (Sigma)	2.03 g 0.01 M
Tritón 100X (Sigma)	10 mL

Llevar a 1L, pH 7.6, filtrar con membrana y almacenar a 4°C.

Buffer de Lisis Nuclear

Tris-base (Sigma)	1.21 g 10 mM
NaCl (Baker)	23.40 g 400 mM
Na ₂ EDTA (Promega)	0.75 g 2 mM

Llevar a 500 mL y esterilizar, almacenar a temperatura ambiente.

Buffer TE

TrisCl (Gibco BRL)	1 mL 10 mM, pH 8.0
EDTA (Gibco BRL)	200 µL 0.5 M, pH 8.0

Aforar a 100mL.

Cloruro de Sodio saturado

Disolver 35 g de cloruro de sodio en 100 mL de agua bidestilada. Solubilizar lo más posible, quedando una capa de al fondo. Almacenar a temperatura ambiente.

Proteinasa K

Se disuelve la cantidad de proteinasa K necesaria para obtener una concentración final de 50 mg/10 mL.

SDS al 20%

SDS (Sigma)	20 g
-------------	------

Disolver en 100 mL de agua bidestilada, almacenar a temperatura ambiente.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Soluciones y Buffers

Buffer 10X

Solución dNTP (20 mM), la cual contiene los cuatro dNTPs (pH 8.0)

Enzimas

DNA polimerasa termoestable (Taq ADN polimerasa)

Geles

Gel de agarosa

Ácidos Nucleicos y Oligonucleótidos

ADN genómico humano (disuelto en solución TE a 10 µg/mL, pH 7.6)

Primers (dirección 5'→3' y 3'→5') a 20 µM cada uno, en solución TE (pH 7.6)

Equipo especial

Termociclador

Solución dNTP

En un tubo eppendorf colocar 25 µL de cada uno de los dNTPs (dCTP, dATP, dTTP y dGTP), aforar a 400 µL. Almacenar a -20°C.

Análisis Polimórfico Conformacional de Cadena Simple (SSCP)

Soluciones y Buffers

Buffer para electroforesis TBE 10X

Solución dNTP (grado PCR), la cual contiene los cuatro dNTPs, cada uno a una concentración de 1 mM (pH 7.0)

Geles

Acrilamida: Bisacrilamida (29: 1% w/v)

Persulfato de Amonio (10% w/v) (USB)
 Glicerol (Gibco BRL)
 TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina)

Compuestos Radioactivos

[α -³²P] dCTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/mL)

Equipo especial

Cámaras de electroforesis
 Termociclador
 Secador de geles
 Papel filtro Whatman 3MM

Buffer TBE 10X

Tris Base	108 g
Ácido Bórico (Gibco BRL)	55 g
EDTA 0.5M (pH 8.0)	40 mL

Aforar a 1000 mL y filtrar. Almacenar a temperatura ambiente.

Acrilamida al 30%

Acrilamida (Gibco BRL)	29 g
Bisacrilamida (Sigma)	1 g
Agua	100 mL

Calentar a 37°C para disolver y filtrar. Almacenar a temperatura ambiente (dura máximo tres meses).

Solución dNTP

En un tubo eppendorf colocar 25 μ L de dATP, dTTP y dGTP, y 12.5 μ L de dCTP, aforar a 400 μ L. Almacenar a -20°C.

Solución de carga para SSCP (para 10 mL)

Azul de bromofenol 0.25% (Golden-Bell) 25 mg

ESTA TESIS NO SALE
 DE LA BIBLIOTECA

Cianol-Xileno 0.25% (E. L.)	25 mg
Ficol 400 000 15%	1.5 g

Aforar a 10 mL con agua dd. Filtrar con flitro de 0.45 μm y hacer alícuotas.

Tabla 8. Reactivos y cantidades necesarias para preparar el gel de acrilamida: bisacrilamida (29:1% w/v) deseado.

Reactivo	Gel al 5.4% con glicerol	Gel al 8.0% con glicerol	Gel al 5.4% sin glicerol	Gel al 8.0% sin glicerol
Agua dd	51.3 mL	42.6 mL	61.3 mL	52.6 mL
Glicerol	10.0 mL	10.0 mL	-----	-----
TBE 5X	20.0 mL	20.0 mL	20.0 mL	20.0 mL
Acrilamida/Bisacrilamida	18.0 mL	26.7 mL	18.0 mL	26.7 mL
Persulfato de amonio	0.7 mL	0.7 mL	0.7 mL	0.7 mL
TEMED	35 μL	35 μL	35 μL	35 μL

Nota: antes de agregar el persulfato de amonio y el TEMED, la solución se tiene que mezclar perfectamente y desgasificar (al vacío) por cinco minutos.

Secuenciación

Solución TTE

Tris Base	108 g
Taurina (Sigma)	36 g
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	2 g

Llevar a 1 L con agua dd y esterilizar por filtración o autoclave.

Gel de acrilamida al 6% para secuenciación

Acrilamida	5.7 g
Bis-Acril	0.3 g
Urea (Gibco BRL)	4.2 g
TTE 10X	10 mL
Agua dd	45 mL

Para 600 mL, se adicionan 600 μ L de PSA al 10% y 15 μ L de TEMED.

Solución Stop

Formamida	95%
EDTA	20 mM
Azul de bromofenol	0.05%
Cianol-Xileno	0.02%

APÉNDICE 2

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA
PARTICIPAR EN LA INVESTIGACIÓN.
EVALUACIÓN DEL POLIMORFISMO DEL GEN NEURO D1 EN
POBLACIÓN MEXICANA.**

México, D. F. _____

A quien corresponda:

Yo, el/ la abajo suscrito/ a _____

de ____ años de edad, en forma libre y voluntaria acepto participar en el estudio “Evaluación de Polimorfismo en el gen Neuro D1 en Población Mexicana” que se llevará a cabo en el Hospital Juárez de México y la Facultad de Química de la UNAM, y cuyo objetivo es identificar el polimorfismo del gen de Neuro D1 en Población Mexicana.

Se me ha informado la importancia del estudio, los motivos, duración y forma en que se llevará a cabo, así como la manera y condiciones en las que se tomará la muestra de sangre, dándome la oportunidad para hacer preguntas sobre el mismo y estando satisfecho(a) de la información y respuestas recibidas.

Firma del Control _____

Nombre y firma del Testigo: _____

Dirección: _____

Nombre y firma del Testigo: _____

Dirección: _____

Firma del Investigador: _____

**EVALUACIÓN DEL POLIMORFISMO DEL GEN NEURO D1 EN
POBLACIÓN MEXICANA.**

Cuestionario

PROPÓSITO:

Datos Personales:

Nombre: _____

Edad: _____ años Sexo: _____ Ocupación: _____

Origen étnico: _____

Dirección: _____

Teléfono particular: _____

Datos de Laboratorio:

Gluc (ayuno) _____ mg/dl Col. _____ mg/dl Creat _____ mg/dl

Datos adicionales:

Peso actual: _____ Kg Talla: _____ Estatura: _____

IMC: _____ Índice Cintura-Cadera: _____

Observaciones