



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

IDENTIFICACION DE POLIMORFISMOS EN EL GEN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCION Nkx2.2. EN SUJETOS SANOS DE LA CIUDAD DE MEXICO

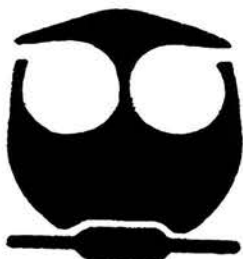
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

CABRERA WROOMAN ALEJANDRO



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

MEXICO, D.F.

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

Resolución de la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el trabajo de recepción: Women
Autor: Alejandro Cabrera
Fecha: 25-Mayo-04
Firma: Cabrera

Jurado asignado:

- Presidente Prof. Elena Zambrano González
- Vocal Prof. Ma. De Los Ángeles Granados Silvestre
- Secretario Prof. Marta Alicia Menjívar Iraheta
- 1er Suplente Prof. Perla Deyanira Maldonado Jiménez
- 2do Suplente Prof. Antonio Ulises López Gutiérrez

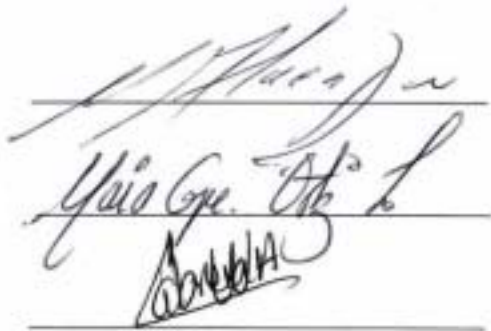
Sitio donde se desarrolló el tema

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: Marta Alicia Menjívar Iraheta

Supervisor Técnico: Guadalupe Ortiz López

Sustentante: Alejandro Cabrera Wrooman



**A mis padres por ser los mejores padres, por que sin su apoyo y ayuda
no lo hubiera logrado.**

A mis hermanos por su cariño y sus buenos consejos.

A Brenda por su apoyo incondicional y por la ayuda en la redacción.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) proyecto 40518 por el apoyo económico brindado para la realización del presente trabajo de tesis.

Al laboratorio de Endocrinología Molecular del Hospital Juárez de México, al laboratorio de Química Clínica del departamento de biología de la facultad de Química UNAM, por las facilidades para la realización de esta tesis.

A la Dra. Marta Menjivar Iraheta por dejarme participar en su grupo de trabajo, por su enseñanza y consejos para la realización de esta tesis y para mi formación profesional.

A la Dra. María Guadalupe Ortiz López por la enseñanza para el trabajo en el laboratorio y por el apoyo recibido.

A los miembros del jurado: Dra. Elena Zambrano González y M. en C. María de los Angeles Granados Silvestre por sus sugerencias para el mejoramiento de este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio: Miguel, Isela, Verónica y Luz.

ÍNDICE

	PAG
RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Factores de Transcripción	4
1.1.1. Motivos estructurales de los factores de transcripción	5
1.1.2. Papel de los factores de transcripción en la embriogénesis del páncreas	7
1.2. Metabolismo de carbohidratos	9
1.2.1. Aparato sensor de la glucosa	10
1.2.2. Insulina	11
1.2.3. Glucagón	12
1.3. Diabetes mellitus	12
1.3.1. Clasificación	13
1.3.2. Diabetes Mellitus tipo 1	13
1.3.3. Diabetes mellitus tipo 2	14
1.3.4. Complicaciones	16
1.4. Nkx2.2	17
1.4.1. Participación del gen Nkx2.2 en el desarrollo del páncreas	17
1.4.2. Interacción con otros genes en otros sistemas	18
1.5. Variaciones genéticas	19
1.5.1. Polimorfismo	20
2. HIPÓTESIS	22
3. OBJETIVOS	23
3.1. General	23
3.2. Particulares	23
4. Material y Métodos	24
4.1. Diseño Experimental	24
4.2. Reclutamiento de controles	24
4.3. Determinaciones Bioquímicas	24

4.2.1. Colesterol total	24
4.2.2. Glucosa	25
4.2.3. Triglicéridos	25
4.3. Determinaciones hormonales	26
4.3.1. Insulina	26
4.3.2. Glucagón	27
4.3.3. Péptido C	28
4.4. Extracción de ADN	28
4.5. Diseño de oligonucleótidos de los exónes del gen Nkx2.2	30
4.6. Reacción en cadena de la polimerasa	30
4.7. Polimorfismo conformacional de cadena simple	31
4.8. Purificación de DNA	31
4.9. Secuenciación manual	32
4.9.1. Secuenciación automática	33
5. RESULTADOS	34
5.1. Índice de masa corporal y cintura cadera	34
5.2. Bioquímicas	35
5.3. Hormonas	36
5.4. Reacción en cadena de la Polimerasa	37
5.5. Polimorfismo Conformacional de Cadena Simple	37
5.6. Secuenciación	44
6. DISCUSIÓN	50
7. CONCLUSIONES	54
8. BIBLIOGRAFÍA	55
9. APÉNDICE	63
8.1. Apéndice I	63

RESUMEN

La diabetes *mellitus* es un síndrome caracterizado por una alteración en el metabolismo de carbohidratos, que conduce al estado de hiperglucemia, la cual incrementa el riesgo de aterosclerosis y desarrollo de complicaciones microvasculares y neurológicas específicas. Es el desorden metabólico más ampliamente distribuido en el mundo, presentándose con una incidencia promedio del 5% en la mayoría de países. Sin embargo en México esta incidencia es mayor que el promedio mundial, llegando a un 10.9% y presentándose cada día a menor edad, actualmente un alto porcentaje de pacientes fluctúa entre los 20-40 años de edad, a esta diabetes se le denomina de aparición temprana. El gen *Nkx2.2* es un gen que pertenece a la familia *Nk2* y es un factor que contiene un homeodominio. Los miembros de esta familia de factores de transcripción han sido nombrados como elementos clave que regulan la organogénesis de muchos sistemas. Este gen es requerido para la diferenciación final de las células beta y para la producción de insulina, es expresado en los precursores de las células del islote durante el desarrollo pancreático y persiste en células maduras incluyendo a todas las células beta. En este estudio se examinó al gen *Nkx2.2* en 20 sujetos (40 alelos), sanos de la ciudad de México, con una edad mayor a 50 años que no tuvieran en al menos 3 generaciones diabetes *mellitus*. El análisis de las variaciones polimórficas, fue en los 2 exones, se diseñaron los oligonucleótidos correspondientes a cada exón, amplificando por PCR, posteriormente se realizó SSCP y secuenciación, revelando dos posibles variaciones heterocigotas, una en el exón 1 la L32P, y la otra en el exón 2-1 G131R.

Los resultados nos muestran dos variantes en el gen *Nkx2.2* en personas sanas de la ciudad de México.

1. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años se ha demostrado como los factores de transcripción están involucrados en el desarrollo de órganos, tales como el páncreas, mostrándonos como un cambio en la secuencia del ADN de dichos factores de transcripción trae como consecuencia una alteración en la expresión y funcionamiento de las células del páncreas. Esto conlleva a una variación en el metabolismo de carbohidratos, dando como resultado la aparición de la Diabetes *mellitus*. Debido a esta perturbación del metabolismo, en el presente trabajo se realizó el estudio molecular del gen Nkx2.2, uno de los factores de transcripción involucrado en la embriogénesis del páncreas.

1.1 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

En las últimas décadas se ha generado un abundante conocimiento relacionado con la regulación transcripcional tejido-específica de los genes. Dicha regulación genética está mediada a través de interacciones entre secuencias reguladoras específicas en el ADN (ácido desoxirribonucleico) y factores transcripcionales específicos de un tejido o de una etapa, del desarrollo, en el cual debe de expresarse un gen (1,2).

Los factores de transcripción son proteínas que reconocen e interactúan con secuencias concretas del DNA, regulando la expresión génica. Estos factores también son llamados "factores *trans*" ya que sus genes están en posición alejada y no relacionada con la región regulada, a la cual se unen mediante numerosos contactos de tipo iónico, hidrofóbico y enlaces de hidrógeno. Aunque todos ellos individualmente son enlaces débiles, juntos dan una interacción específica y muy fuerte entre las proteínas y el ADN (3).

Como elementos básicos de regulación se han definido los promotores que representan regiones en el ADN cercanas al sitio de inicio de la transcripción de un gen, donde la acción coordinada de múltiples factores proteicos colabora para reclutar a las diferentes ARN polimerasas, formando el complejo de iniciación y,

así, transcribir un gen. En los organismos eucariontes existen tres tipos de ARN polimerasas. En particular, la ARN polimerasa II es la responsable de la transcripción de la mayoría de los genes que codifican para proteínas (4).

Por otra parte, además de los promotores existen otros elementos dentro del ADN que tienen capacidad de modular la actividad transcripcional de un gen. Estos elementos son capaces de modular positiva o negativamente la acción de un promotor y, consecuentemente regular la tasa de expresión de un gen. Estos elementos han sido denominados estimuladores (enhancers) y silenciadores (silencers), siendo los primeros fomentadores de la transcripción, mientras que los segundos abaten la expresión de un gen (5).

En diversos sistemas genéticos se han identificado regiones de regulación a distancia. El caso más estudiado es el de los genes de la globina en humano, en el cual, un grupo de genes se expresan en tiempo y espacio por elementos de regulación situados a gran distancia. De los elementos de regulación a distancia, se propone que los sitios de hipersensibilidad que pueden tener funciones reguladoras tipo estimulador o silenciador ejercen su acción sobre el promotor del gen a regular mediante la formación de asas cromatinianas, es decir, mediante la generación de estructuras tridimensionales que acercan estos elementos de regulación localizados a distancia con los promotores individuales, y mediante una combinación de factores de transcripción, se pueda regular de manera específica la expresión de un gen en cuestión. Por lo tanto, la estructuración del DNA en cromatina puede claramente ser considerada como un mecanismo fino de regulación, previo al proceso transcripcional, y que debe desempeñar un papel particular en la especificidad de expresión de un gen (6,7).

1.1.1. MOTIVOS ESTRUCTURALES DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Las comparaciones entre las secuencias de muchos factores de transcripción sugieren que se pueden encontrar tipos comunes de motivos responsables de la unión al ADN. Los motivos suelen ser generalmente bastante cortos y comprenden solamente una pequeña parte de la estructura proteínica. Los motivos han sido

también identificados como responsables de la activación de la transcripción, a través de su interacción con proteínas del aparato de transcripción (8).

Los dominios o motivos de unión al DNA de los factores transcripcionales más frecuentes son:

a) Hélice-giro-hélice (HLH)

Esta región consiste en 2 hélices alfa separadas por una vuelta no helicoidal. Interviene en la dimerización proteica con formación de homodímeros y de heterodímeros. También facilita la unión de la región vecina formada por aminoácidos básicos cargados positivamente a sitios específicos de secuencias regula doras en el ADN (9).

b) Hélice-bucle-hélice (HTH)

Se ha señalado que estos motivos están formados por una hélice alfa seguida de una vuelta de tipo beta y después otra hélice alfa que constituyen un sitio de unión al ADN mediante el contacto de una o más hélices con sitios específicos existentes en la molécula de ADN al nivel de la hendidura mayor o menor (10).

c) Cremallera de leucina

Existe en una familia de proteínas que se une al ADN después de la formación de dímeros. La estructura en el polipéptido está constituida por una larga hélice alfa en la que aparece una leucina cada 7 aminoácidos. Esto da lugar a la existencia de una formación periódica de leucinas situadas a lo largo de una misma zona de la hélice alfa de la proteína que lleva a la formación de proyecciones laterales que pueden unirse con una estructura similar en otro polipéptido, unión que se ha comparado con la cremallera de un zipper, y que produce la formación estable de homo dímeros y heterodímeros (11).

d) Dedo de Zinc

Esta estructura está constituida por la unión de una molécula de zinc con 2 pares de cisteínas o con la combinación de un par de cisteínas con un par de histidinas, lo que da lugar a una figura que sobresale en la superficie de la proteína con la forma de un dedo (12).

e) Homeodominio

Esta región consiste en 3 hélices alfas contiguas con la estructura HTH, una de las cuales interactúa con el ADN en múltiples sitios (Figura 1). En muchos de estos factores las secuencias contiguas al homeodominio tienen funciones reguladoras de la activación génica, ya que modulan su afinidad por la unión al ADN y su especificidad por secuencias de bases específicas (13).

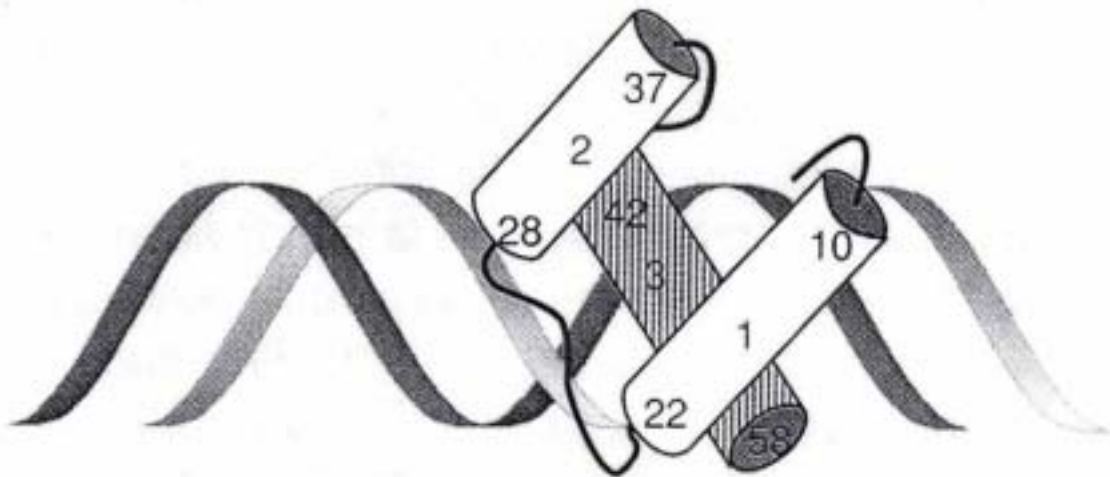


Figura 1. Motivo Homeodominio.

1.1.2. PAPEL DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN EN LA EMBRIOGÉNESIS DEL PÁNCREAS

Los factores de transcripción organizan un complejo de rutas de crecimiento y diferenciación celular mediante la regulación de la tasa de transcripción de un conjunto de genes. Los estudios bioquímicos y genéticos han empezado a revelar la compleja cascada de factores que controla la proliferación y diferenciación de células en el desarrollo del páncreas (14).

El páncreas de los mamíferos inicia su desarrollo como brotes dorsal y ventral que emana de la capa endodérmica embrionaria, que es destinada a formar el intestino. En humano al día 22 es formado el intestino primitivo como un saco de yema dorsal, dentro de pocos días el tubo del intestino inicia la formación del páncreas, a la semana 12 se empiezan a desarrollar las células epiteliales

formando así el páncreas (15). En el ratón, esto sucede a la mitad de la gestación, en el día 9.5. Una vez formados, los dos brotes rotan y se fusionan, formando el órgano sencillo visto en mamíferos adultos. A nivel celular, entre el punto medio y el final de la gestación (del día 9.5 hasta aprox. el día 18.5), hay una proliferación y diferenciación celular rápida dentro de los componentes exócrinos (secreción de enzimas hidrolíticas) y endocrinos (secreción de hormonas). La masa celular endocrina se incrementa agudamente al día 13.5 y, para el final de la gestación, es claramente dividida en las células α , β , δ (secretando glucagón, insulina, somatostatina respectivamente) y polipéptido pancreático (16).

En el páncreas maduro estas células ocurren en grupos circunscritos que comprenden los islotes de Langerhans. Muchos factores de transcripción dentro del desarrollo del páncreas desarrollan este proceso de diferenciación celular. En adición a señales transcripcionales que son intrínsecas al desarrollo pancreático, señales del tejido conectivo embrionario que rodean al mesénquimo son necesarios para asegurar que ocurra una diferenciación específica para cada tipo de células (17,18). Recientemente se han identificado un grupo de factores de transcripción entre los que se incluyen Pdx1, Isl-1, Pax4, Pax6, NeuroD1, Nkx2.2 Nkx6.1 y Hlxb9, los cuales regulan el desarrollo de las células del islotes en diferentes estados, pero el mecanismo molecular que controla la diferenciación de las células pancreáticas endocrinas es desconocido (19).

El gen Nkx2.2 muestra una diferenciación apropiada del tejido exócrino y del tejido endocrino, sin embargo el desarrollo del páncreas solo involucra interacciones entre el epitelio pancreático y el mesenquimo (20). Los factores de transcripción involucrados en la embriogénesis del páncreas se muestran en la Figura 2.

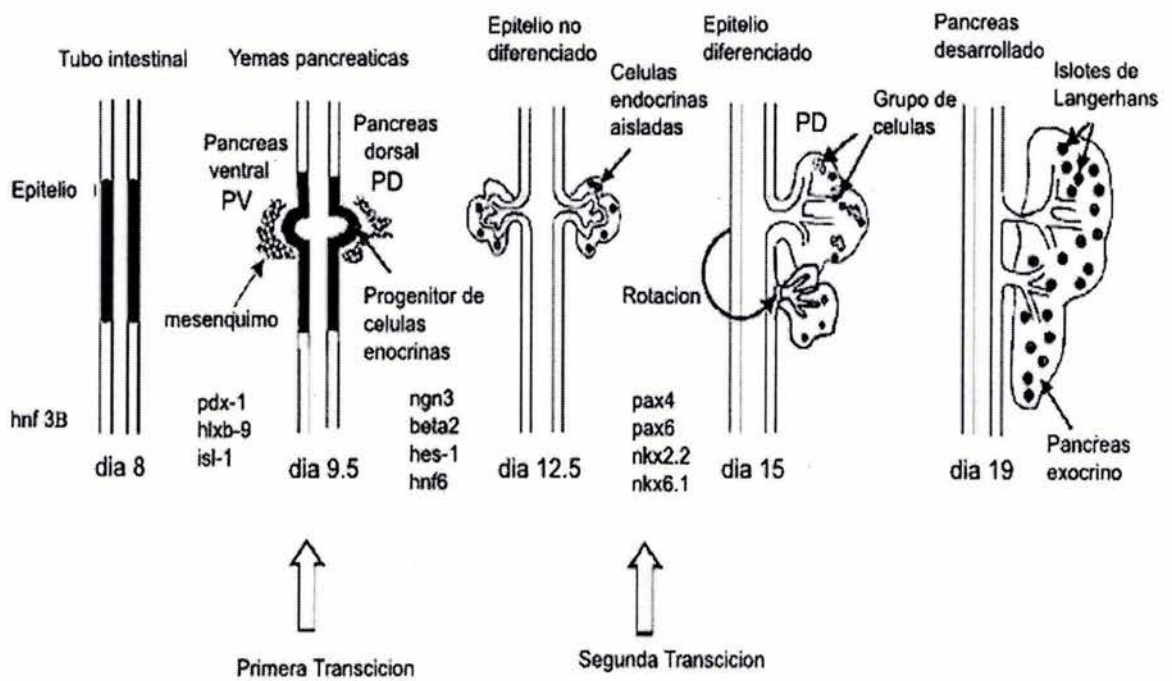


FIGURA 2. Factores de Transcripción implicados en la embriogénesis del páncreas de ratón (2).

El páncreas es el órgano encargado de secretar la insulina y el glucagón, hormonas que regulan la homeostasis de la glucosa en sangre y por tanto el metabolismo de carbohidratos.

1.2. METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS

El mantenimiento de los niveles normales de glucosa en sangre es, una tarea primordial del organismo, por lo que diversos mecanismos han evolucionado con esta finalidad. Entre los reguladores más importantes se hallan las hormonas insulina, glucagón y adrenalina. Los ajustes constantes que mantienen de forma precisa los niveles de glucosa en sangre, son el resultado de la combinación de la insulina, glucagón y la adrenalina en los procesos metabólicos que tienen lugar en

muchos tejidos corporales, pero especialmente en el hígado, músculo y tejido adiposo. La insulina indica a estos tejidos que la concentración de glucosa en sangre esta elevada, como consecuencia, el exceso de glucosa en la sangre es captado por las células y se transforma en los compuestos de almacenamiento glicógeno y triacilgliceroles, mediante las vías involucradas en la síntesis y degradación de glucosa (21) (Figura 3).

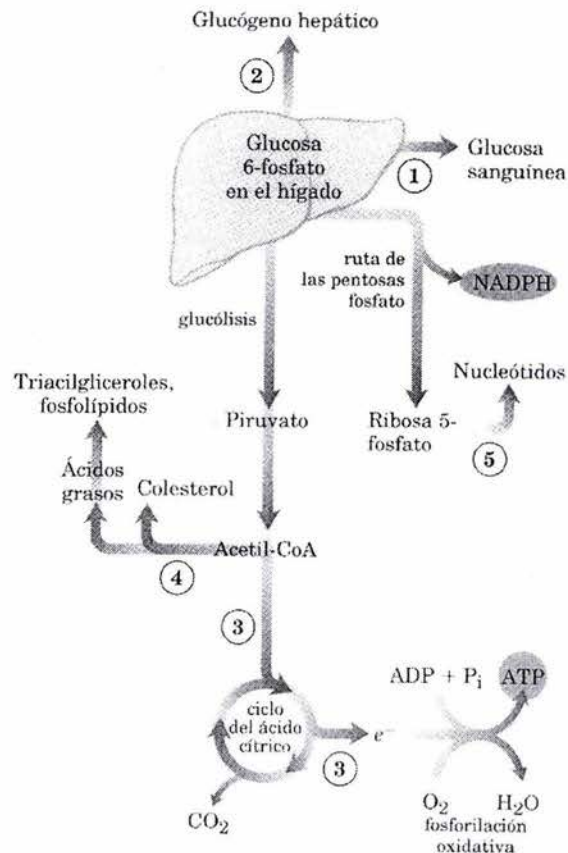


Figura 3. Vías metabólicas implicadas en la síntesis y degradación de glucosa (21).

1.2.1. Aparato sensor de la glucosa.

La glucosa entra a la célula por medio del transportador de la glucosa Glut2, la glucosa es fosforilada por la glucocinasa y convertida a piruvato por la glucólisis. El piruvato entra a al mitocondria y es el combustible del ácido cítrico, resultando

en la transferencia de equivalentes reductores a la cadena respiratoria, llevando a una hiperpolarización de la membrana mitocondrial y generando ATP. Subsecuentemente, los canales de la membrana celular son despolarizados, cerrando los canales de potasio y abriendo los canales de calcio, secretando gránulos de insulina (22).

1.2.2. Insulina

Hormona que se produce por las células β de los islotes de Langerhans en el páncreas como respuesta directa de hiperglucemia. La célula del islote es libremente permeable a la glucosa mediante el transportador de glucosa GLUT2 y la glucosa se fosforila por la glucocinasa. Por tanto la concentración de la glucosa sanguínea determina el flujo a través de la glucólisis, del ciclo del ácido cítrico y de la generación de ATP (23).

Cuando la glucosa llega a la sangre desde el intestino, después de una comida rica en carbohidratos, el aumento de glucosa en sangre provoca un aumento de la secreción de insulina y una disminución de la secreción de glucagón. La insulina estimula la captación de glucosa por el tejido muscular, donde la glucosa se convierte en glucosa 6-fosfato. La insulina también activa la glucógeno sintasa e inactiva la glucógeno fosforilasa, de manera que buena parte de la glucosa 6-fosfato se canaliza hacia la formación de glucógeno. Debido a la captación acelerada de la glucosa sanguínea, la concentración de glucosa en sangre disminuye hasta niveles normales, y la tasa de liberación de insulina por el páncreas disminuye. La insulina también estimula el almacenamiento del exceso de combustibles en forma de grasa(24).

El receptor de insulina es requerido para mediar la acción de la insulina. Este receptor es producto de una copia única del gen localizado en el cromosoma 19 (banda citogenética 19p13), es sintetizado inicialmente como un precursor polipeptídico de cadena única. Este precursor sobrelleva un clivaje post-transcripcional hacia dos unidades separadas α y β , seguido de dimerización y exportación de la membrana plasmática. El receptor también es glicosilado y acilado en el camino hacia al membrana plasmática (25).

El receptor maduro es un homeodominio compuesto por dos subunidades α y β . La subunidad α es completamente extracelular y contiene el dominio al ligando localizado en el extremo amino-terminal de la proteína. La subunidad β tiene un dominio extracelular unido por medio de puentes disulfuro e interacciones no covalentes. La parte intracelular de la subunidad β contiene un dominio proteincinasa tirosina específico. La ligadura de la insulina al dominio extracelular causa una modificación conformacional en el dominio intracelular de tal modo que el receptor sobrelleva una autofosforilación y puede ligar ATP (26).

1.2.3. Glucagón

Esta hormona se produce en las células α de los islotes de Langerhans pancreáticos; su secreción se estimula por la hipoglucemia(1). El glucagón provoca un aumento en la concentración de la glucosa en sangre por varias vías. Al igual que la adrenalina, estimula la degradación neta del glucógeno hepático al activar la glucógeno fosforilasa e inactivar la glucógeno sintasa; ambos efectos son el resultado de la fosforilación, inducida por cAMP de las enzimas regulables. No obstante, inhibe la degradación de la glucosa por la vía glucolítica en el hígado y estimula la síntesis de glucosa por la vía gluconeogénica (22).

La principal enfermedad que se presenta, cuando existe una alteración en el metabolismo de carbohidratos es la Diabetes *mellitus*.

1.3. DIABETES MELLITUS

La diabetes *mellitus* es un síndrome caracterizado por una alteración en el metabolismo de carbohidratos, básicamente hiperglucemia, la cual incrementa el riesgo de aterosclerosis y desarrollo de complicaciones microvasculares y neurológicas específicas (27,28).

La diabetes *mellitus* es el desorden metabólico mas ampliamente distribuido en el mundo, presentándose con una incidencia promedio de 5% en la mayoría de países. Sin embargo en México esta incidencia es mayor que el promedio mundial, llegando a un 10.9% y presentándose entre los 20-40años de edad, lo que indica que se trata de diabetes de aparición temprana. Al momento no se han definido

las razones por las que la prevalencia de este padecimiento en México es superior al promedio mundial, sin embargo, varios factores como el estilo de vida, el medio ambiente y la susceptibilidad de los genes podrían estar influenciando para que esta prevalencia haya aumentado(29).

1.3.1. Clasificación (30):

PRIMARIA:

1. Diabetes mellitus autoinmunitaria (tipo 1).
 - 1.1. Diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID tipo 1, transitoria).
 - 1.2. Diabetes mellitus insulino dependiente (DMID tipo 1).
2. Diabetes mellitus no autoinmunitaria (tipo 2):
 - 2.1. Diabetes mellitus insulino dependiente (DMNID tipo 2, transitoria).
 - 2.2. Diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID tipo 2)
 - 2.3. Diabetes del adulto de aparición en el joven (MODY) (Maturity Onset Diabetes of the Young).

SECUNDARIA

1. Enfermedades pancreáticas
2. Alteraciones hormonales.
3. Inducida por fármacos o sustancias químicas.
4. Por alteraciones en los receptores de insulina.
5. Asociadas a síndromes genéticos.
6. Otras causas.

1.3.2. DIABETES MELLITUS TIPO I

Está condicionada por una destrucción progresiva de la célula β que conlleva a un déficit absoluto de la secreción de insulina. Este tipo de diabetes comprende el 15% de los diabéticos(31).

Dentro de éste tipo de diabetes existen dos subtipos. La primera es la no insulino dependiente, la cual es muy rara ya que afecta a la población no caucásica (africana o asiática). Presenta un importante componente hereditario y no se asocia con los antígenos de histocompatibilidad (HLA) (32).

La segunda es la insulino dependiente, asociada a determinados antígenos de histocompatibilidad (25), que intervienen en su patogenia mecanismos autoinmunes humorales y celulares. Se han identificado marcadores de la lesión autoinmune, como el ICA (Islet-Cell Autoantibodies), IIA (Insulin Autoantibodies), anticuerpos anti-GAD (Glutamic Acid Descarboxylase) y anti tirosina-fosfatasa (IA-2 o ICA-512). Este tipo de diabetes es más frecuente en niños o adolescentes, pero también pueden surgir en adultos o ancianos. En estos últimos se presenta un curso evolutivo lento denominándose diabetes del tipo LADA (Latent Autoimmune Diabetes in Adults), que raramente se acompaña de obesidad y otras patologías del sistema autoinmune (33,34,35).

1.3.3. DIABETES MELLITUS TIPO 2

La diabetes mellitus tipo 2 corresponde del 80-90% de todos los diabéticos en la mayoría de los países (36)

Presenta un mayor componentes hereditario que la diabetes tipo 1, muestra un origen poligénico y multifactorial y aparece en la edad adulta. Se asocia con frecuencia a obesidad, generalmente con distribución visceral o abdominal de la grasa corporal. Otros factores condicionantes de su aparición son la edad, inactividad física, hipertensión arterial o diabetes gestacional previa, así como pertenecer a determinados grupos étnicos (indios pima e indígenas nauru) (37).

Los niveles de insulina en sangre pueden estar entre los rangos normales o elevados. Pueden presentarse ocasionalmente cuadros de descompensación metabólica en forma de situaciones hiperglicémicas hiperosmolares no cetónicas (33).

Dentro de la diabetes tipo 2 se encuentra el subtipo MODY (por sus siglas en inglés "Maturiy Onset Diabetes of the Young"), es un grupo clínico heterogéneo de desordenes caracterizado por diabetes mellitus no cetónica, con una herencia autosómica dominante, una aparición antes de los 25 años de edad y un defecto primario en la función de las células beta del páncreas (38).

Los MODY resultan de mutaciones en uno de al menos 6 genes diferentes que se muestra en la Tabla 1

Tabla 1. Clasificación de la diabetes tipo2 subtipo MODY (32).

MODY	GEN AFECTADO	CROMOSOMA	CODIFICA PARA:
1	TCF14	20	FT HNF4 α
2	GCK	7	Glucocinasa
3	TCF1	12	FT HNF1 α
4	IPF-1	13	FT IPF-1
5	TCF2	17	FT HNF1 β
6	NeuroD	20	NeuroD1

Hay una última categoría, el MODY X que son familias que tienen el fenotipo correspondiente a MODY pero no muestran una herencia con genes MODY (39,40,41).

La presentación clínica más común del MODY es apacible con hiperglicemia asintomática en niños no obesos, adolescentes y adultos jóvenes quienes tienen una familia con historia de diabetes frecuentemente en generaciones sucesivas con un patrón de herencia autosómica dominante (42).

La Tabla 2. nos muestra las diferencias entre la diabetes *mellitus* tipo 2 y los MODY.

Tabla 2. Diferencias clínicas entre la diabetes tipo 2 y tipo MODY.

Característica	MODY	Diabetes tipo 2
Herencia	Monogénica, autosómica dominante	Poligénica
Edad de aparición	Niñez, adolescencia o edad adulta joven menor de 25 años	Edad adulta usualmente entre los 40 a 60 años ocasionalmente adolescente si la persona es obesa
Pedigree	Usualmente Multigeneracional	Raro que sea multigeneracional
Penetrancia	80-95%	Variable (posiblemente entre 10-40%)
Complejión	No obeso	Usualmente obeso
Síndrome metabólico	Ausente	Usualmente presente

Los factores que afectan la sensibilidad de insulina, tales como infección, pubertad, embarazo y la obesidad, pueden aumentar la aparición de la diabetes e incrementar la severidad de hiperglicemia en pacientes MODY. Estudios sobre los pacientes MODY han dejado un mejor entendimiento de las causas genéticas de la disfunción de las células beta (43).

1.3.4. Complicaciones de la diabetes

En la diabetes, la disfunción endotelial esta presente desde el diagnóstico, pudiendo aparecer en pacientes con excreción urinaria normal de albúmina (33).

Microvasculares: La diabetes se relaciona con el daño endotelial en la microcirculación y los trastornos se presentan en forma de nefropatía, retinopatía y neuropatía. El daño por hiperglucemia se ha asociado por aumento de la actividad de la proteincinasa-C, la acumulación de sorbitol y la formación y depósito de productos de glicosilación no enzimática de proteínas (41). Estas complicaciones llevan a una insuficiencia renal crónica en 40% de los casos o incluso a la ceguera. Se estima que hasta el 70% de los diabéticos sufren alguna forma clínica de neuropatía, y que los sujetos con antecedentes familiares de hipertensión arterial desarrollan de manera mas temprana complicaciones microvasculares (44).

Macrovasculares: Se asocian con un trastorno metabólico profundo que se correlaciona con resistencia a la insulina y no con la hiperglucemia (45,46). La enfermedad cardiovascular está vinculada a un estado de arteriosclerosis acelerada y un mayor riesgo de trombosis (47).

1.4. Nkx2.2

El gen Nkx2.2 es un miembro de la familia Nk2, que representa al grupo de factores de transcripción del tipo homeodominio. Los miembros de esta familia de factores de transcripción han sido nombrados como elementos clave que regulan la organogénesis de muchos sistemas (48).

1.4.1. Participación del gen Nkx2.2 en el desarrollo del páncreas.

La exploración de la participación de este gen en la patogenia de la diabetes *mellitus*, ha encontrado que, ratones deficientes en la expresión de este gen, desarrollan una diabetes severa y mueren a los pocos días de nacimiento con una hiperglicemia severa (49). Aunque el gen Nkx2.2 se expresa muy temprano en el desarrollo del páncreas, los ratones nulos para Nkx2.2 muestran defectos en el desarrollo del páncreas, resultando de una falta completa de células que expresan insulina. La presencia de un número elevado de genes para las células β sugiere que Nkx2.2 es necesario para la diferenciación final de las células β pancreática. Números reducidos de células α y Polipéptido Pancreático acompañado de un incremento en el número de células δ solo es evidente en ratones knockout para Nkx2.2 (50,51). Nkx2.2 también es expresado en los precursores de las células del islote durante el desarrollo pancreático y persiste en células maduras incluyendo a todas las células beta (52,53).

Estudios inmunohistoquímicos exponen una falta de maduración de células beta provocando la disminución en el número de células alfa y en polipéptido pancreático (48,49). En contraste, el número de células δ y la expresión de la somatostatina no afecta (54). En otros estudios realizados por inmunoprecipitación de cromatina se observa que Nkx2.2 afecta la expresión del gen de la insulina, y nos revela una amplia aplicación de diferentes factores de transcripción Pdx-1,

BETA-2, Pax6, y Nkx2.2, en regulación de los genes que se expresan en las células β (55).

Estudios con ratones del tipo Psammomys obeso que es un modelo para la diabetes tipo 2, muestran una marcada deficiencia en el almacén de insulina cuando se les da una dieta alta en energía. A pesar de la hiperglicemia que presentan, los niveles del RNAm de la insulina inicialmente no muestran cambios y después muestra una disminución gradual del 15% de los niveles basales por 3 semanas. Por otra parte la expresión del gen de la insulina no incrementa cuando son aislados los islotes del Psammomys obeso siendo expuestos a concentraciones elevadas de glucosa, sin embargo los factores ISL-1, Nkx2.2 y Nkx6.1 si se expresan en los islotes del Psammomys obeso (56,57).

1.4.2. Interacción con otros genes y en otros sistemas

La familia Nk-2 ha sido identificada como reguladores importantes del crecimiento y desarrollo del cerebro frontal ventral, corazón pulmón, y tiroides (58). Otro gen que pertenece esta familia es el gen Nkx6.1 el cual se expresa en las células beta, y se encuentra río arriba del gen Nkx2.2 en la diferenciación de las células beta pancreáticas (51,59).

Otra participación del gen Nkx2.2 es que se co-expresa con Nkx2.9 en la parte posterior del Sistema nervioso central (60,61). Se ha encontrado que Nkx2.2 esta asociado con la expresión del gen de la mielina, sugiriendo un rol cooperativo en el control de la diferenciación del oligodendrocito (62). El gen CRB1 se expresa en el desarrollo del ojo y en el sistema nervioso central, en el desarrollo del tubo neural la expresión del gen CRB1 coincide con la expresión del gen Nkx2.2 (63). Un subtipo de neuronas llamadas (Sonic hedgehog) expresan al gen Nkx2.2 o Pax6 que son responsables de la señal, aquí se provee la evidencia de que Nkx2.2 tiene un rol primario en la neurona ventral y en la selectividad de la neurona (64,65).

Tabla 3. Estudios realizados sobre el gen Nkx2.2

Estudio	Hallazgo	Autor	Ref.
Secuenciación del gen	Polimorfismo A42Ten región no codificante en sujetos japoneses no diabéticos.	Furuta, <i>et.al.</i> , 1998	49
Ratones homocigotos	Hiperglicemia severa con muerte a los pocos días del nacimiento.	Sussel, <i>et.al.</i> , 1998	48
Ratones tipo <i>Psammomys obesus</i>	Expresión del gen en los islotes del ratón.	Leibowitz, <i>et.al.</i> , 2001	57
Ratones heterocigotos para Hnf-3 β y Pdx-1	Disminución de la expresión del gen	Shih, <i>et.al.</i> , 2002	70
Infección con adenovirus de neurogenina3	Inducción de la expresión del gen y/o proteína	Heremans, <i>et.al.</i> , 2002	71
Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina	Presente en la región promotora de insulina	Cissell, <i>et.al.</i> , 2003	55
Ratones transgénicos	Interacciones en exón 1a, entre ngn3 o NeuroD1	Watada, <i>et.al.</i> , 2003	52

1.5 VARIACIONES GENÉTICAS

La variación normal es de dos tipos, continua y discontinua. La variación continua es aquella que nos da los caracteres mensurables, tales como la altura o el peso. Por otro lado los caracteres que varían de forma discontinua pueden distinguirse de forma diferentes fenotipos, existen muchos ejemplos de caracteres discontinuos en los seres humanos, como ojos azules o castaños, pelo negro o rubio. Una serie de dos o más fenotipos alternativos normales y comunes se llama polimorfismo, palabra derivada del griego que significa muchas formas. Los fenotipos alternativos los denominaremos *morfos*. Los tipos más simples de polimorfismo llamados dimorfismos. Con frecuencia los morfos de un polimorfismo

están determinados por alelos de un solo gen, los cuales se heredan de manera mendeliana (66).

1.5.1. Polimorfismo

El DNA genómico nuclear es una entidad extremadamente variable, no solo entre individuos de especies diferentes, sino también entre individuos de una misma especie. Esta diversidad es responsable de fenómenos biológicos de tanta trascendencia como la evolución de las especies y, dentro de cada especie, de las características diferenciales en cada individuo, únicas e irrepetibles. La diversidad o variabilidad genética se debe a variaciones en la secuencia del genoma; por tanto en un sentido amplio el concepto de diversidad se hace sinónimo de polimorfismo. El polimorfismo afecta tanto en regiones codificantes como en regiones no codificantes. En ambos casos puede consistir en la variación de un solo par de bases o menos frecuente, de millones de pares de bases (macromutación). El grado de polimorfismo de una población es tanto mayor cuantos más individuos contenga, viene determinado por el número de alelos distintos existentes para un locus concreto y se refleja en el grado de heterocigotos (67).

Un ejemplo de polimorfismos son los grupos sanguíneos. Los antígenos A, B, Y H sólo difieren en los restos de los azúcares en sus extremos no reductores. Se han determinado las variaciones en las glucosiltransferasas responsables de los tres antígenos diferentes de los grupos sanguíneos ABO(H) mediante secuenciación de los genes correspondientes. Los genes A y B, que codifican una $\alpha(1-3)$ -N-acetilgalactosaminiltransferasa y una $\alpha(1-3)$ -galactosiltransferasa, difieren en unas pocas sustituciones de bases que cambian 4 de los 303 residuos con lo que se altera su especificidad. En el gen O, la delección de una sola base genera un codón de detención espúreo que da lugar a la síntesis de una proteína truncada (115 residuos) y que en consecuencia es enzimáticamente inactiva (68).

Existe evidencia sobre la importancia de las determinantes genéticas, las cuales se manifiestan en los estudios realizados a poblaciones con el mismo fondo genético que viven en ambientes diferentes, tales como, los indios pima residentes en Arizona, quienes consumen dietas de alto contenido calórico, realizan poca actividad física y tienden a la obesidad, 37% de las mujeres y 54% de los hombres presentan diabetes. En contraste, aquellos pima que viven en las montañas del norte de México, con actividad física intensa, dieta baja en calorías y peso corporal normal poseen aproximadamente la misma frecuencia de diabetes que el resto de la población mexicana (10.9% mujeres y 6.3% hombres) (68).

Otros investigadores han demostrado que existen polimorfismos únicos de una comunidad específica como los de Oji-Cree de Canadá, en donde hallaron un SNP en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 en el gen $HNF1\alpha$, en este trabajo se reporta un polimorfismo exclusivo de esta comunidad presente en un 40% de los pacientes; ya que se analizaron otros 990 alelos de 6 diferentes grupos étnicos sin encontrar el polimorfismo G319S reportado en la población Oji-Cree (69). Basándonos en éstos hallazgos, podemos suponer la presencia de variantes polimórficas específicas de cada comunidad y variantes distribuidas en diferentes poblaciones, por lo que es necesario realizar estudios en nuestra población mexicana.

2. HIPÓTESIS

Basándonos en que los genes presentan variantes polimórficas entre personas y entre poblaciones, es de esperarse que en el gen del factor de transcripción Nkx2.2 se encuentren polimorfismos en sujetos sanos de la ciudad de México.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- Identificación de variantes polimórficas en el gen del factor de transcripción Nkx2.2.

3.2. Objetivos particulares

- Seleccionar al grupo de personas sanas.
- Evaluar molecularmente a los sujetos control.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

A los sujetos control se les midió la cintura y la cadera para deducir el Índice Cintura Cadera (ICC), se les midió la talla y se pesaron, obteniendo el Índice de Masa Corporal (IMC), posteriormente se les tomo en ayunas una muestra de sangre de 20ml y esta muestra se dividió en dos alícuotas, una alícuota para extracción del DNA y la otra para obtener el suero y determinar los niveles de colesterol, triglicéridos y glucosa, así como los niveles de insulina, glucagón y péptido C.

RECLUTAMIENTO DE CONTROLES

- Se reclutaran a 20 personas sanas sin ningún tipo de alteraciones como controles.

Criterios de inclusión:

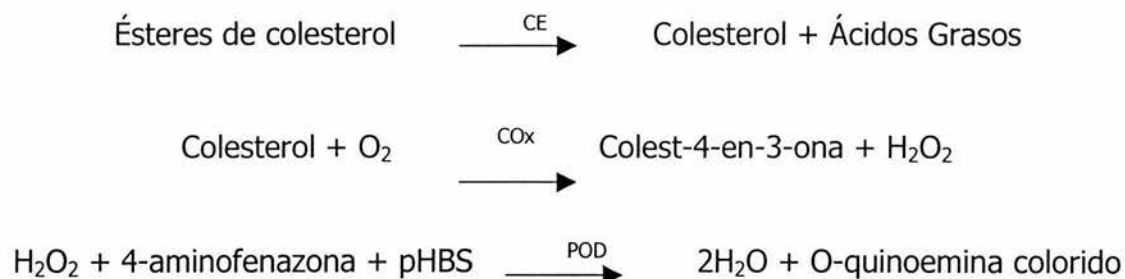
1. Personas sanas sin ningún tipo de diabetes.
2. Mayores de 50 años.
3. Sin antecedentes de diabetes, al menos 2 generaciones atrás.
4. Género indistinto.
5. Índice de masa corporal de 25 a 29.9Kg/m² y un Índice cintura cadera menor de 0.9.

4.2. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

4.2.1. Colesterol Total

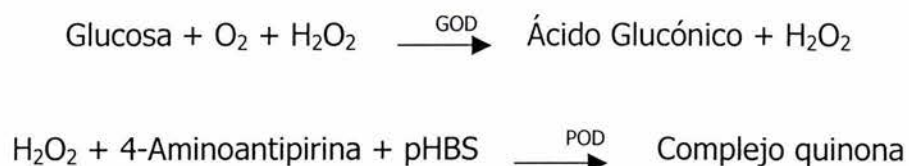
El método utilizado se basa en que la colesterol esterasa (CE) hidroliza los ésteres para originar colesterol libre y ácidos grasos. El colesterol libre así producido más el colesterol preformado se oxidan en presencia de colesterol oxidasa (Cox) para dar colest-4-en-3-ona y peróxido de hidrógeno. Un 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:



4.2.2. 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:



4.2.3. Triglicéridos

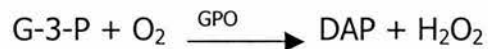
La determinación de los niveles de triglicéridos, cuando se lleva a cabo en conjunto con otros ensayos de lípidos, proporciona una ayuda en el diagnóstico de hiperlipoproteinemia primaria y secundaria. También es útil para dar seguimiento a la diabetes mellitus, nefrosis, obstrucción biliar y varias 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 (G-3-P) y adenosin-5'-difosfato (ADP) en una reacción catalizada por la glicerol-cinasa (GK), de tal manera que:



La g-3-P 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.



4.3 Determinaciones hormonales

4.3.1. Insulina

El procedimiento de insulina Coat-a-Count es un radioinmunoanálisis en fase sólida en donde la insulina marcada con ^{125}I , compite por un tiempo de ensamblaje con la insulina de la muestra problema, por sitios sobre anticuerpos específicos para insulina. El anticuerpo es inmovilizado en la pared del tubo de polipropileno, simplemente decantando el sobrenadante es suficiente para determinar la competición y para aislar la fracción de anticuerpo unida a la insulina marcada.

- a) Se tomaron dos tubos de polipropileno limpios y se marcaron para cuentas totales.
- b) Se tomaron 200 μl de los estándares del A al G con unas concentraciones de 0, 5, 15, 50, 100, 200 y 350 $\mu\text{IU/mL}$ respectivamente y 200 μl de las muestras problemas y se colocaron en tubos preparados con anticuerpos antiinsulina.

- c) A todos los tubos se les agregó 1ml de insulina marcada con ^{125}I .
- d) Se incubaron de 18 a 24 horas a temperatura ambiente.
- e) Después de transcurrido el tiempo de incubación se decantaron sobre papel absorbente.
- f) Se determinaron los valores de la insulina en un contador Gamma.

4.3.2. Glucagón

El procedimiento de doble anticuerpo para glucagón es un radioinmunoanálisis secuencial. Después de la preincubación de la muestra con el anticuerpo antiglucagón, el glucagón marcado con ^{125}I compete con el glucagón en la muestra por sitios de anticuerpo.

- a) Antes del ensayo, diluir 500pg/mL del calibrador F de glucagón en el calibrador cero de glucagón, usando tubos de vidrio.
- b) Se tomaron dos tubos de polipropileno limpios y se marcaron para cuentas totales.
- c) Se tomaron 200 μl de los estándares del A al F con unas concentraciones de 0, 7, 14, 29, 72 y 144 pmol/L respectivamente y 200 μl de las muestras problemas.
- d) Se agregó 100 μl del antisuero de glucagón a todos los tubos, y se mezclaron.
- e) Se cubrieron las muestras y se incubaron durante 24 horas a una temperatura 2-8°C.
- f) A todos los tubos se les agregó 100 μl del ^{125}I de glucagón.
- g) Se cubrieron las muestras y se incubaron durante 24 horas a una temperatura 2-8°C.
- h) Se les agregó 1mL de solución precipitante fría a todos los tubos y se mezclaron.
- i) Se centrifugaron por 15 minutos a 2000RPM.
- j) Se decantaron sobre papel absorbente.
- k) Se determinaron los valores en un contador Gamma.

4.3.3. Péptido-C

El procedimiento sigue el principio básico del radioinmunoanálisis donde hay una competencia entre el antígeno radioactivo y el no-radioactivo, por sitios sobre anticuerpos específicos. La cantidad de péptido-C marcado con ^{125}I unido al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de péptido-C no marcado. La separación del antígeno libre y unido se lleva a cabo fácilmente debido al sistema del doble anticuerpo.

- a) Se tomaron dos tubos de polipropileno limpios y se marcaron para cuentas totales.
- b) Se añadieron 50 μl de los estándares y de las muestras problema a los tubos marcados previamente.
- c) Se agregaron 100 μl del antisuero de péptido-C a todos los tubos excepto a las cuentas totales.
- d) Se les agregó 100 μl del péptido-C marcado con ^{125}I a todos los tubos y se mezclaron.
- e) Se incubaron de 16 a 24 horas a una temperatura de 2-8°C.
- f) Se les agregó 1ml del reactivo precipitante.
- g) Se incubaron a una temperatura aproximadamente de 25°C durante 15-20min.
- h) Se centrifugaron durante 20min a 2000RPM.
- i) Se decantaron sobre papel absorbente.
- j) Se determinaron los valores en un contador Gamma.

4.4. EXTRACCIÓN DE DNA

Se extrajeron 20ml de sangre periférica, de la cual se obtuvo el DNA.

1ª Parte

1. Se tomaron 20ml de sangre, los cuales se dividieron en dos alícuotas de 10ml cada una, y se les agregaron 200 μl de EDTA (0.5M) pH 8.0.
2. Los tubos se pusieron sobre hielo y a cada uno de ellos se les agregó solución sacarosa-tritón 2X fría hasta llevarlo a un volumen de 35ml.

3. Posteriormente se les agregó agua bidestilada estéril hasta llegar a un volumen de 50ml.
4. Se mezclaron por inversión y se dejaron reposar en hielo durante 10min.
5. Se centrifugaron a 2000rpm durante 15min a 4°C.
6. El sobrenadante se decantó y se eliminó.
7. El botón que quedó se lavó con 5 ml de solución sacarosa triton 1X.
8. Se centrifugó durante 15min 4°C (se debe ver un pellet rosado, sino se lava nuevamente).
9. Los pellets se mantuvieron a -70°C hasta su uso.

2ª Parte

10. Se adicionaron 3ml de buffer de lisis nuclear y se resuspendió el pellet con una pipeta pasteur sellada.
11. Se añadieron 108µl de SDS al 20% más 100µl de Proteinasa K (5mg/ml) y se mezclaron con la pipeta.
12. Se incubaron a 37°C toda la noche o 3 horas a 50°C (preferible a 37°C).
13. Se transfirieron a tubos cónicos estériles de 15ml + 1ml de NaCl saturada se agitaron durante 15seg vigorosamente.
14. Se centrifugaron a 1000g (aprox 2000rpm) 15min.
15. Se volvieron a transferir con cuidado el sobrenadante a otro tubo cónico de 15ml.
16. Se adicionaron 2 volúmenes de ETOH al 100% moviendo suave la pipeta.
17. Se sacó el DNA precipitado con una pipeta pasteur sellada.
18. Se lavo el DNA precipitado con ETOH al 70% moviendo suave la pipeta.
19. Se dejaron secar completamente el DNA en la pipeta pasteur (boca arriba).
20. Se deposito el DNA en aproximadamente 200µl de buffer T/E en tubo eppendorf.
21. No agitar fuerte y mover de arriba abajo, o dejar toda la noche. Para que se incorpore el T/E, posteriormente dejar el tubo de 10 a 20min a 37°C.
22. Se cuantificó el DNA en una dilución 1:200.

- La cuantificación de DNA se llevo a cabo midiendo su pureza espectrofotométricamente (260/280nm), teniendo una relación de entre 1.7-2.0.

4.5. DISEÑO DE OLIGONUCLEOTIDOS DE LOS EXONES DEL GEN Nkx2.2.

Tabla 4. Oligonucleótidos usados para la amplificación del gen Nkx2.2.

exón	sentido 5'- 3' antisentido 5'-3'	Pares de bases	Temp. de alineamiento (°C)
1	ACGAATTGACCAAGTGAAGCTAC AACCCGGGCTGCGGCTGCAGGAAT	380	65
2-1	ATCCAGGGTGCTCCGAGTCTGGTGCA CGCGCTTCATCTTGTAGCGGT	377	65
2-2	GAGCGCGAACACCTGGCCAGCCTC GTGGAGCCGAGAGTCAACTCGATC	494	65

El tamaño de los fragmentos del PCR, la temperatura de alineamiento de la reacción y la secuencia, fueron reportados por *Furuta Hiroto et al. 1998*

4.6. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

1. En cada tubo eppendorf se agregó 1µL de DNA, 2.5 µL de Buffer 10X, 20µM de cada oligo y de cada dNTP's, 1µL de DMSO y 5U/ml de Taq polimerasa .
2. Se realizó la reacción en el termociclador (Mastercycler *gradient* eppendorf), con 30 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 95°C durante 30seg, una temperatura alineamiento de 65°C durante 30seg , y una temperatura de extensión de 72°C durante 30seg.
3. Se verificó que la reacción se haya llevado a cabo correctamente, corriendo un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y buffer TBE1X durante 45min a 80 Volts.

4.7. POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE CADENA SIMPLE (SSCP) (Orita1989) (78).

Este método permite detectar alguna alteración del DNA. La sustitución de una sola base es suficiente para alterar la movilidad de una sola cadena de DNA que es sometida a electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizados con o sin glicerol.

1. Se tomaron 2 μ l del PCR y 28 μ l Buffer de carga para SSCP, se desnaturalizo a 95°C durante 5min e inmediatamente después en hielo 5 minutos.
2. Se depositaron 3 μ l de las muestras en el gel de acrilamida.
3. Se corrieron a 190V durante 22horas.
4. Al terminar el gel se pasa a un papel de 3mm, y se secaron en el desecador (Gel Dryer Labnet), durante una hora a 75°C.
5. El gel ya seco se colocó en un cassette y se expuso a una placa radiográfica, durante 24hrs, para después revelarlo.

4.8. Purificación del DNA por medio de columnas Centricon YM-30 para secuenciación manual y automática

1. Se añadió el producto de PCR en el vial con la membrana.
2. A la muestra se le agregó 2ml como máximo de agua bidestilada estéril. Tratando de no tocar la membrana con la pipeta.
3. Se colocó la columna dentro de la ultracentrifuga.
4. Se centrifugaron a 1000-5000g aprox. 7500RPM durante 30min.
5. Se invirtió la columna colocando un cono y centrifugándolo a 300-1000g aprox. 4000RPM por 2min.
6. El producto se cuantificó espectrofotométricamente en una dilución 1:200, y se corrió un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio para verificar la talla, concentración y la pureza.

4.9. Secuenciación manual de acuerdo al método de Sanger (79).

1. Se efectuaron las reacciones con un KIT Secuenciación de Amersham (OH USA) número de catálogo 79760KT. Estas reacciones contenían desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), marcados radiactivamente [α - ^{33}P] número de catálogo AH9539 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).
2. En cada tubo se agregó 0.5 μl de cada uno de los desoxinucleótidos marcados, mastermix dGTP (7.5 μM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 2.0 μl , buffer de reacción (concentrado) 2.0 μl , termosecuenciación DNA polimerasa (4U/ml), oligonucleótido 1.0 μl , ADN a una concentración entre 25-250fmol y ddH₂O hasta alcanzar un volumen total de 20.0 μl .
3. Los tubos se introdujeron en el termociclador (mastercycler gradient eppendorf), en un programa donde se tiene, un ciclo a 95°C durante 30seg, 65°C durante 30seg y 72°C durante 1minuto, repitiéndose estos ciclos 35 veces.
4. Al terminar se adiciono 4 μl de la solución STOP.
5. Se preparó el gel de acrilamida-urea, dejándolo polimerizar al menos 1hora a temperatura ambiente como se indica en el anexo 1.
6. Las muestras antes de ponerlas en el gel, se desnaturalizaron a 70°C durante 5min, y 5min en hielo.
7. Se precalentó la cámara con el gel durante 30min a 1800V hasta llegar a una temperatura de aproximadamente 50°C.
8. Se depositaron 4 μl en cada pozo dejándolo correr 2 horas la primer corrida y una hora y media la segunda corrida a 1800V a 55°C.
9. El gel se transfirió a papel 3MM, y se secaron durante 60min a 75°C con vacío.
10. El gel adherido al papel 3MM se expuso a una placa de rayos X, en un cassette con placas intensificadoras, se dejaron a temperatura ambiente durante 5días y posteriormente se revelaron las placas.

11. Se leyeron las secuencias de las exones estudiados y se compararon con las secuencias ya reportadas en el banco de genes (num de secuencia 10818213).

4.9.1. Secuenciación automática.

1. Se purificó el DNA y se verificó corriendo las muestras en un gel de agarosa al 1%.
2. Se utilizó el Kit Applied Biosystem, se agregó en cada tubo que contenía la muestra de DNA cada base marcada con el fluoróforo, y se introdujo en el termociclador para que se llevara a cabo la reacción.
3. Los tubos se centrifugarón al vacío.
4. Los botones obtenidos se reconstituyeron con formamida .
5. Se pusieron las muestras en una placa que se introdujo al secuenciador automático (AbyPrism).

5. RESULTADOS

5.1. Índice cintura cadera y del índice de masa corporal.

La tabla 5 muestra los datos índice cintura cadera, índice de masa corporal, la edad así como las medidas de cada persona de la cintura, cadera, talla y su peso. El promedio del ICC nos indicó que es menor 0.9 y el IMC es menor a 29.9kg/m².

Tabla 5. Datos del índice cintura cadera y del índice de masa corporal.

Sujetos Control	EDAD (años)	CINTURA (cm)	CADERA (cm)	ICC	PESO (kg)	TALLA (m)	IMC (kg/m ²)
Promedio	59.25	90.85	101.75	0.88	68.07	1.61	25.9
Desviación estándar	±9.92	±10.45	±7.46	±5.94	±14.32	±0.10	±4.06
Rango Normal				< 0.9			25-29.9 (kg/m ²)
MCRE	52	88	105	0.83	62	1.52	26.83
RCP	64	103	103	1.0	82	1.65	30.11
APA	82	102	111	0.91	68	1.50	30.22
MAV	60	94	107	0.87	63	1.5	28.00
JVR	49	85	98	0.86	65	1.73	21.71
GVZ	50	96	110	0.87	78	1.79	24.96
MITQ	58	89	102	0.87	64.5	1.6	25.19
GSB	66	101	110	0.91	80	1.72	26.94
AMAC	71	81	99	0.81	55	1.49	24.77
ASS	71	89	95	0.93	60	1.68	21.25
VJSM	51	92	101	0.91	75	1.72	25.35
NAV	61	82	99	0.82	70	1.60	27.34
DSM	50	70	90	0.77	53	1.63	19.94
AARE	47	88	100	0.88	65	1.60	25.39
FLS	51	98	110	0.89	76	1.78	23.98
MMS	53	116	117	0.99	111	1.70	38.40
LHR	75	80	92	0.86	45	1.44	21.70
JLGS	53	98	99	0.98	76	1.65	27.91
MCRO	66	81	89	0.91	50	1.48	22.82
FAC	55	84	98	0.85	63	1.58	25.23

5.2. Determinaciones bioquímicas

En la tabla 6 se observan los datos colesterol, triglicéridos, glucosa, HDL y LDL de los 20 sujetos control, así como el promedio, la desviación estándar y los valores de referencia. *El promedio de los resultados analizados nos indican que son personas que se encuentran dentro de los rangos normales que están establecidos.

Tabla 6. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a los sujetos control.

Sujetos control	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)	Colesterol (mg/dl)	Triglicéridos (mg/dl)	Glucosa (mg/dl)
Promedio*	51.85	124.06	206.55	196.26	97.5
Desviación estándar	±13.82	±27.84	±28.21	±181.73	±14.67
Rango Normal	30-80	50-150	140-200	50-200	70-100
MCRE	37.9	148.7	212	213	97
RCP	48.2	112.4	171	138	70
APA	56.4	118	188	137	74
MAV	55.9	94.2	163	144	86
JVR	32	100.3	244	836	101
GVZ	50.9	151.6	214	116	95
MITQ	39.6	178.4	232	153	97
GSB	47	125.8	186	160	115
AMAC	42.4	154.7	211	146	132
ASS	49.8	120.0	261	161	89
VJSM	50.6	168.6	227	88	98
NAV	54.5	142.3	214	165	92
DSM	93.1	115.8	210	62	89
AARE	55	75.5	146	121	104
FLS	65.6	85.7	187	379	101
MMS	39.4	120.5	217	422	112
LHR	62	116.2	185	126	95
JLGS	42.1	122.5	223	441	106
MCRO	71.5	126.5	207	74	81
FAC	43.1	122.3	233	183	116

5.3. Determinaciones hormonales

La tabla 7 nos muestra los valores de Insulina, Glucagón y péptido C, de cada uno de los sujetos control, así como los promedios, desviación estándar y los valores normales.

Tabla 7. Resultados de las pruebas hormonales realizadas a los sujetos control.

Sujetos control	Insulina (pg/ml)	Péptido C (ng/ml)	Glucagón (pg/ml)
Promedio*	7.16	2.35	114.5
Desviación estándar	±4.85	±1.37	±168.9
Rango normal	3 - 6 pg/ml	1.1-3.2 ng/ml	59-177 (pg/ml)
MCRE	5.3	0.92	94.9
RCP	4.7	0.79	67.8
APA	3.7	0.53	44
MAV	4.7	0.48	92.1
JVR	6.2	1.33	821.6
GVZ	4.6	1.78	60.1
MITQ	8.4	2.53	84.3
GSB	13.7	4.32	72.6
AMAC	13.4	1.2	40.8
ASS	4.4	2.32	94.4
VJSM	2.8	1.5	80.8
NAV	4.1	3.4	47.0
DSM	3.8	1.8	63.6
AARE	20.6	4.5	52.2
FLS	3.7	3.4	105.0
MMS	11.9	3.7	160.0
LHR	3.6	2.5	50.1
JLGS	6.7	4.3	116.1
MCRO	3.4	1.4	56.9
FAC	13.5	4.3	87.0

5.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR

La Figura 5 muestra el PCR del exón 1 del gen Nkx2.2, de los sujetos control, en el carril de la izquierda se encuentra el marcador de 100pb, y del carril 1 al 20 las muestras todas corresponden a la talla del exón (380pb).

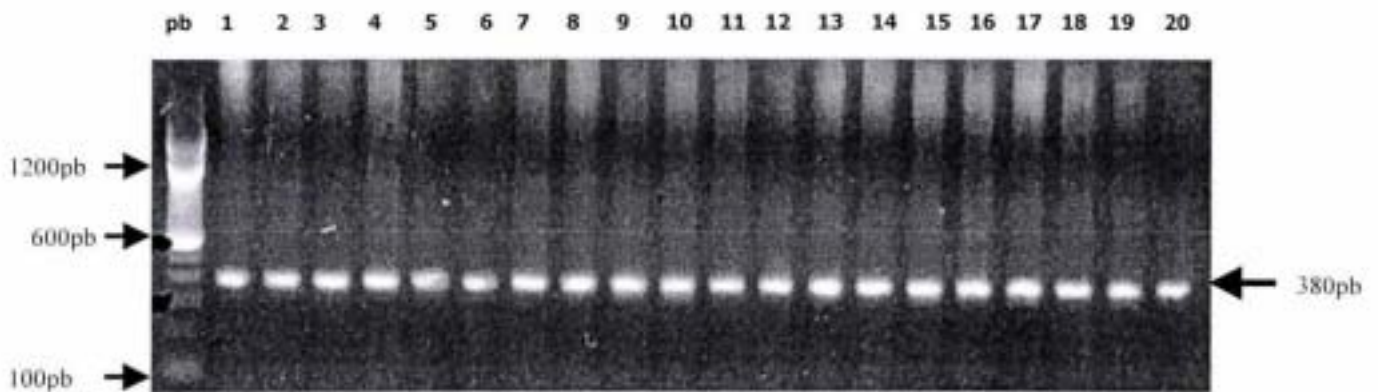
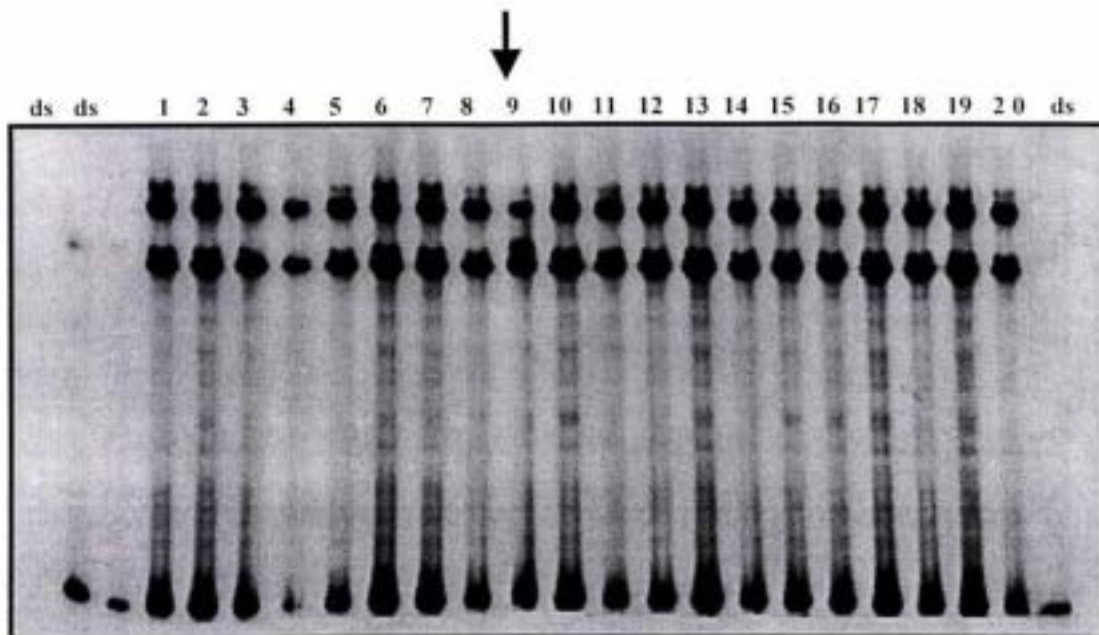


Figura 5. PCR caliente.

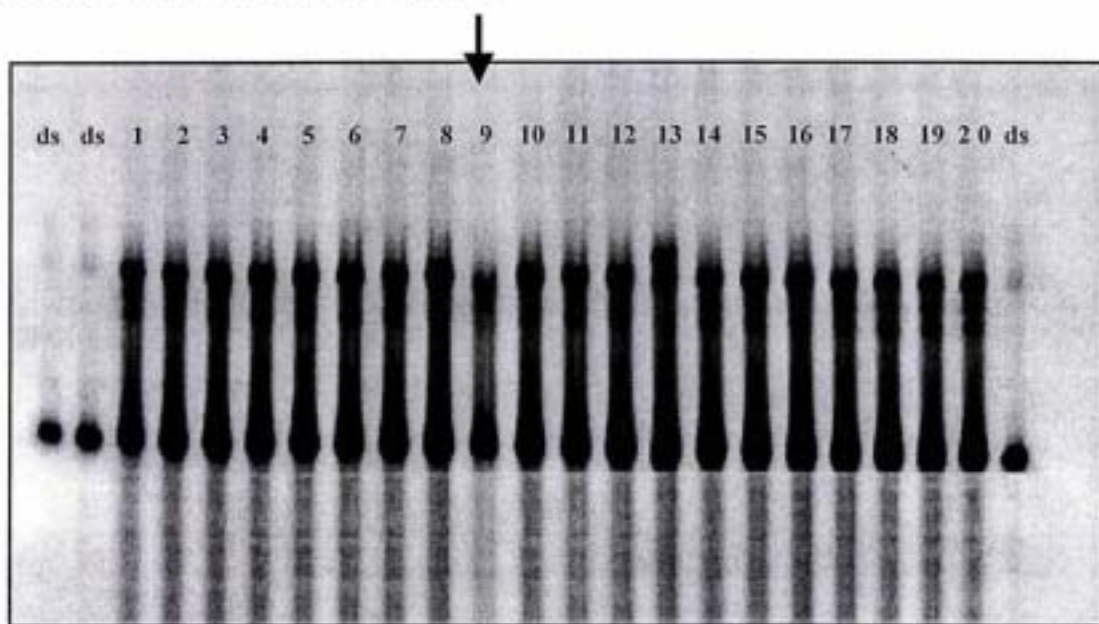
5.5. SSCP realizadas a los sujetos control a las diferentes condiciones.

Figura 6. EXON 1

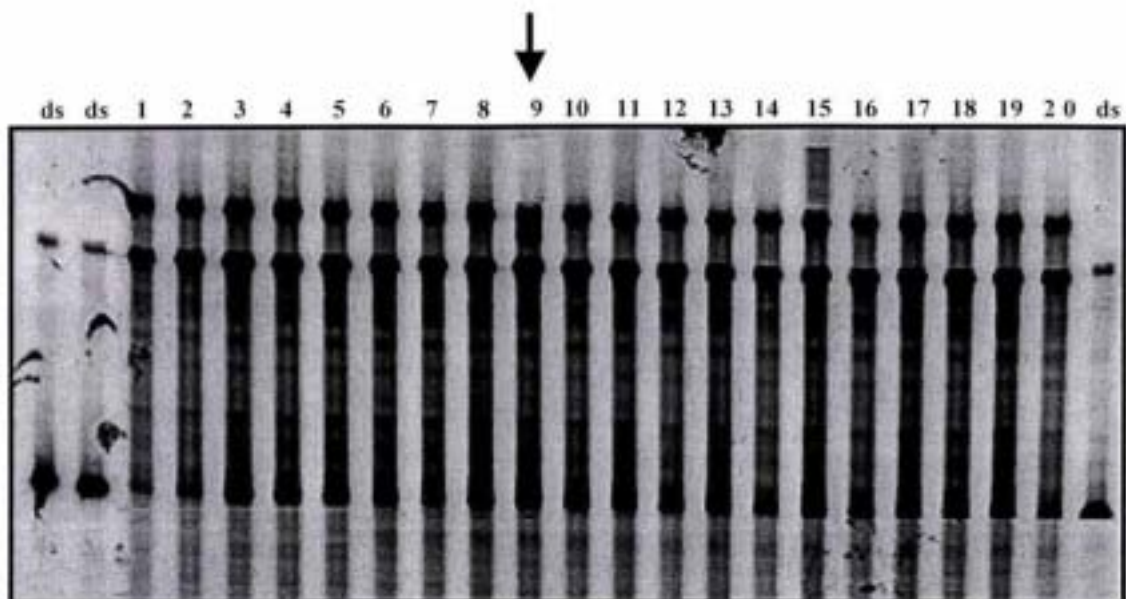
En la figura (6a) se observan todas las muestras con el mismo patrón de corrimiento, en la Figura (6b) se nota que en el carril 9 existe diferencia en el corrimiento electroforético, en la figura (6c) se observa con mas claridad el cambio electroforético en el carril 9 en la figura (6d) nos indica en el carril 9 existe un cambio electroforético observándose una banda de mas que en las otras muestras, en todos los carriles hasta la parte inferior se observa la doble cadena.



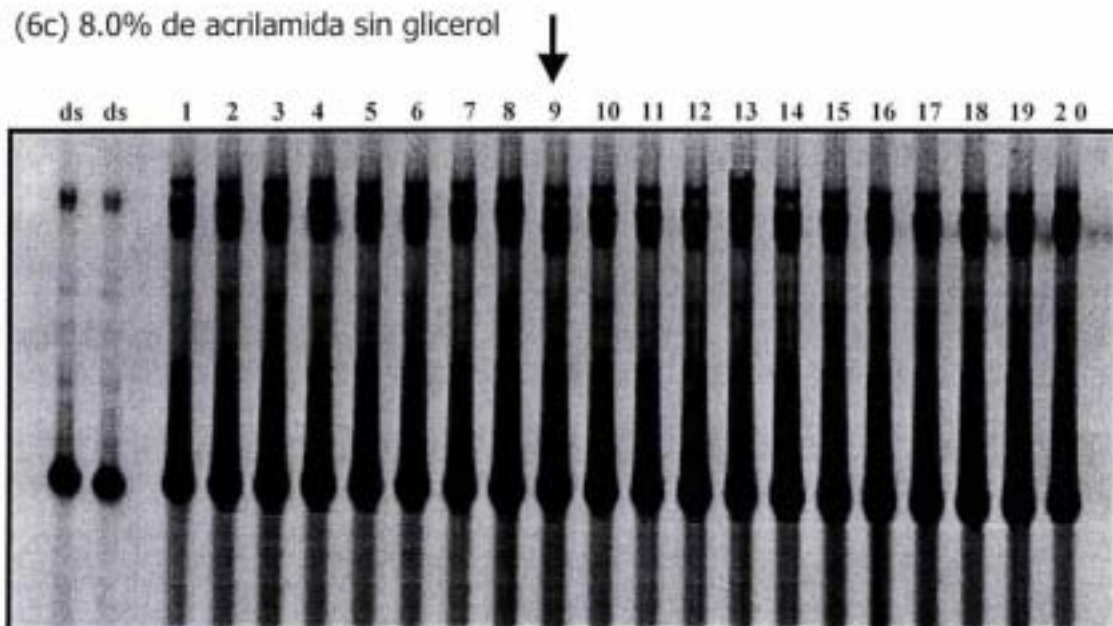
(6a) 5.4% de acrilamida sin glicerol



(6b) 5.4% de acrilamida con glicerol



(6c) 8.0% de acrilamida sin glicerol

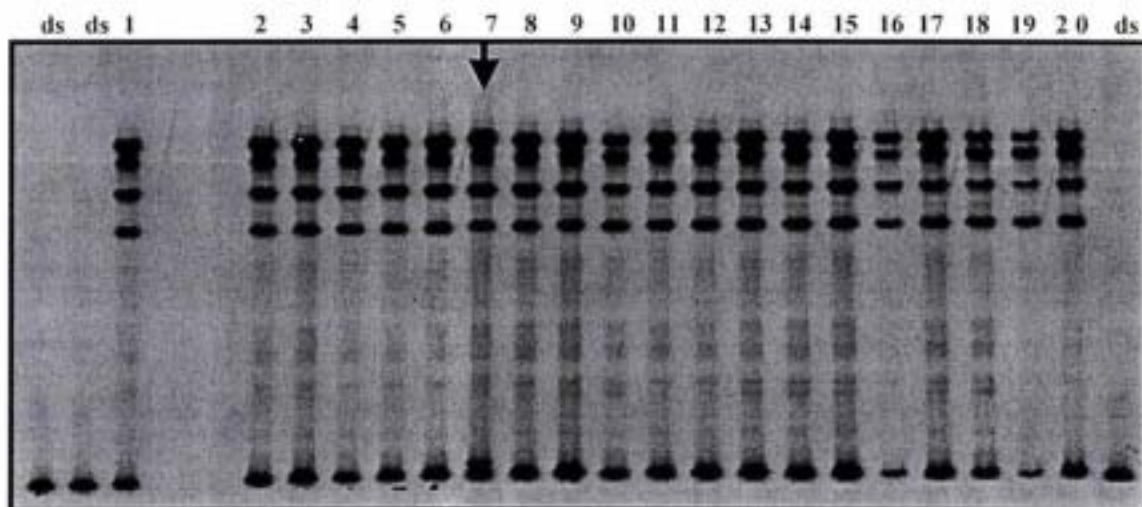


(6d) 8.0% de acrilamida con glicerol

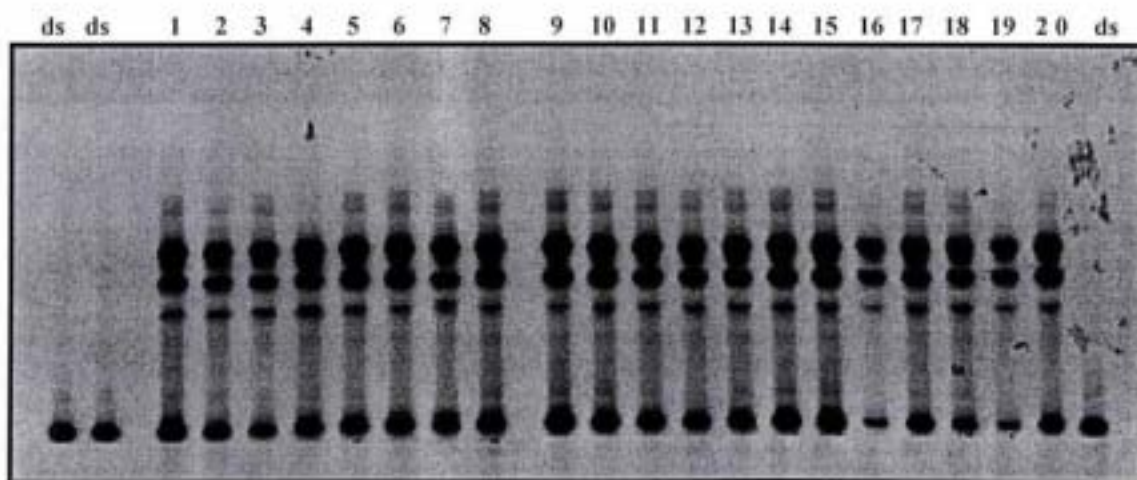
Fig. 6.- SSCP realizadas al gen Nkx2.2 exón 1, a diferentes concentraciones de acrilamida, con y sin glicerol.

Figura 7. EXON 2-1

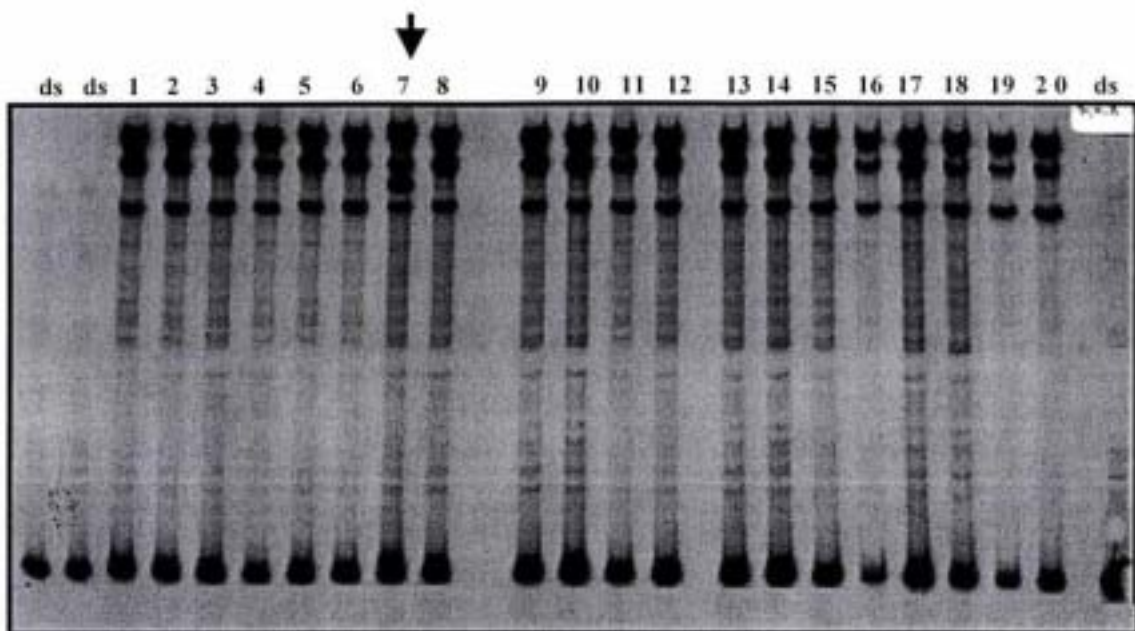
En las figura (7a), (7c) y (7d) se percibe con claridad un cambio en el corrimiento electroforético en el carril 7, ya que se nota una banda de más muy clara con respecto a las otros carriles. En la figura (7b) no se observa una alteración en el corrimiento ya que todas las muestras tiene un patrón de migración similar.



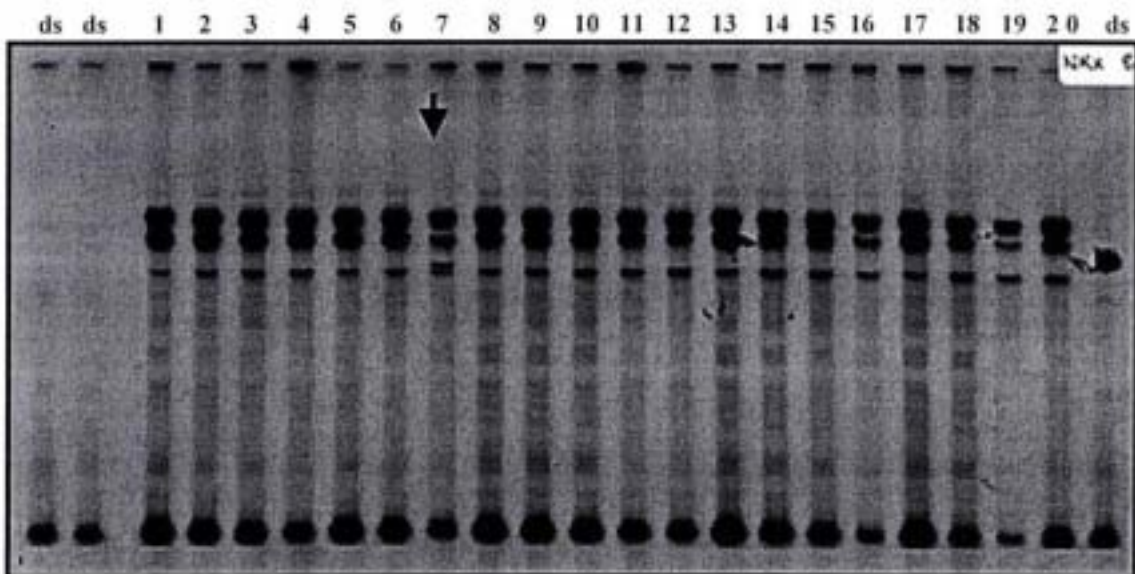
(7a) 5.4% de acrilamida sin glicerol



(7b) 5.4% de acrilamida con glicerol



(7c) 8.0 % de acrilamida sin glicerol

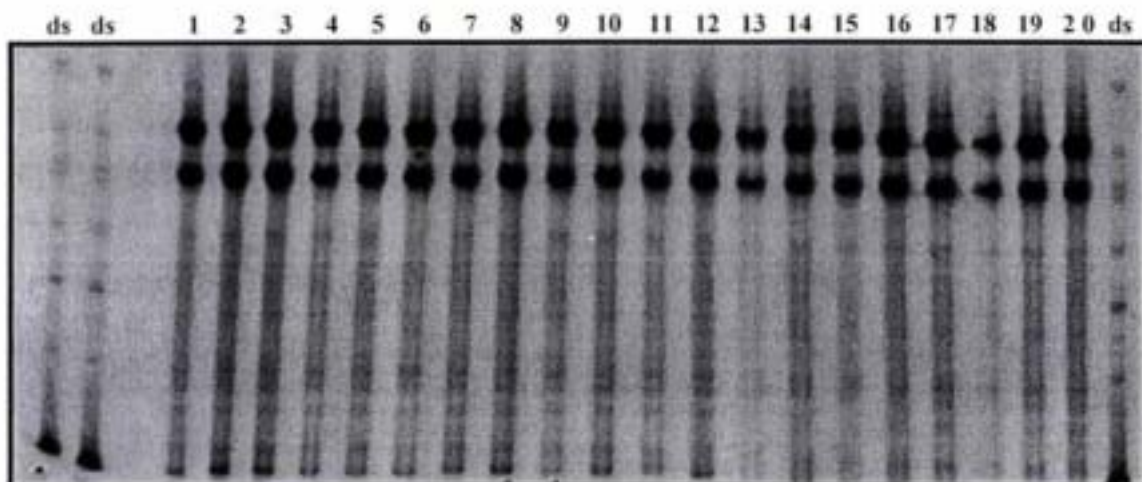


(7d) 8.0% de acrilamida con glicerol

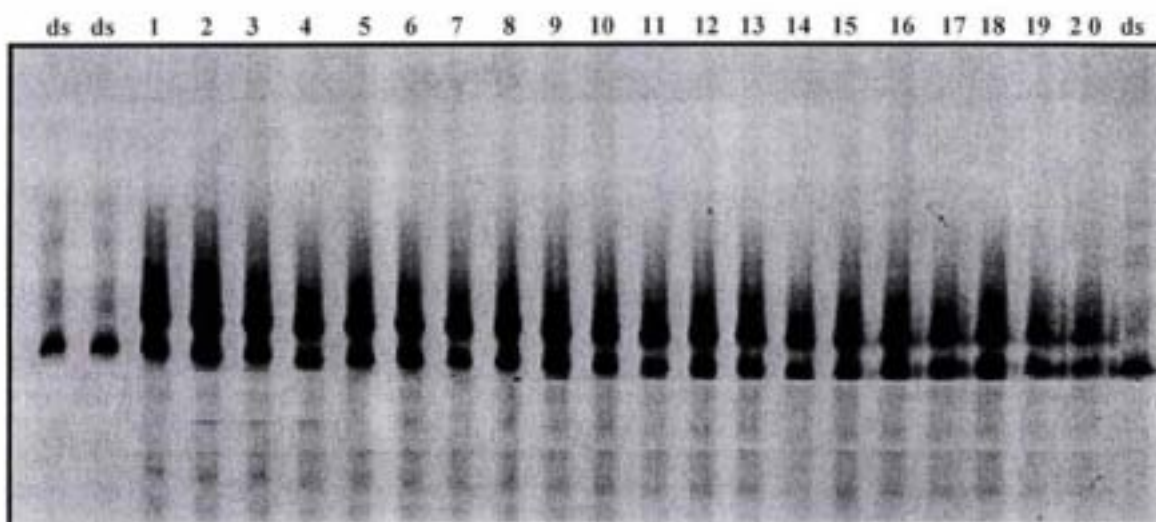
Figura 7.- Placas de SSCP realizadas al exon 2-1 del gen Nkx2.2, a diferentes condiciones.

Figura 8. EXON 2-2

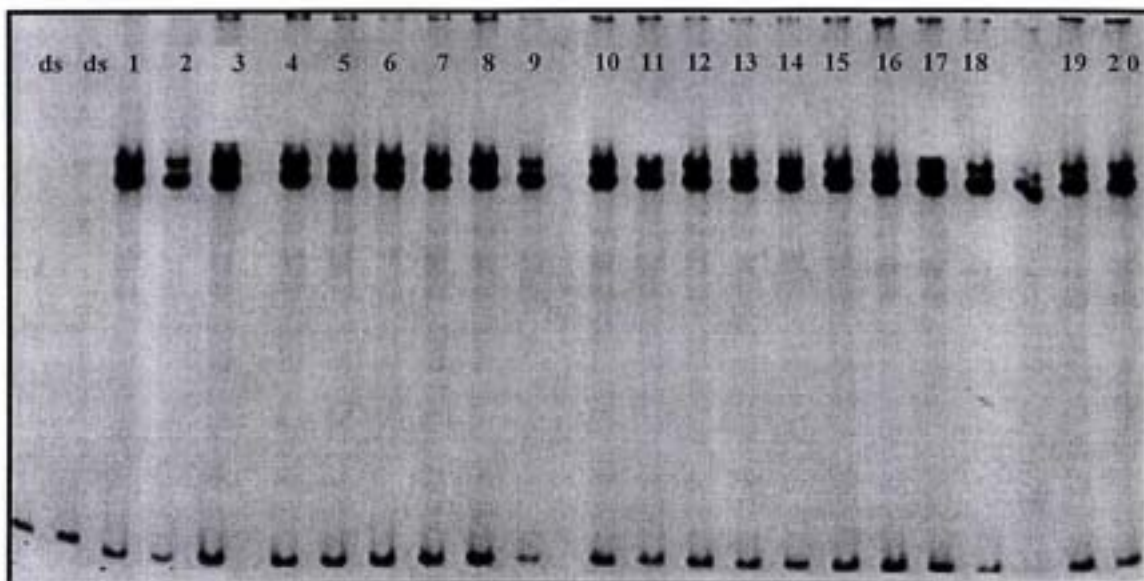
Las SSCP muestran en las figuras (8a), (8b), (8c) y (8d), un patrón de migración similar en todos los carriles.



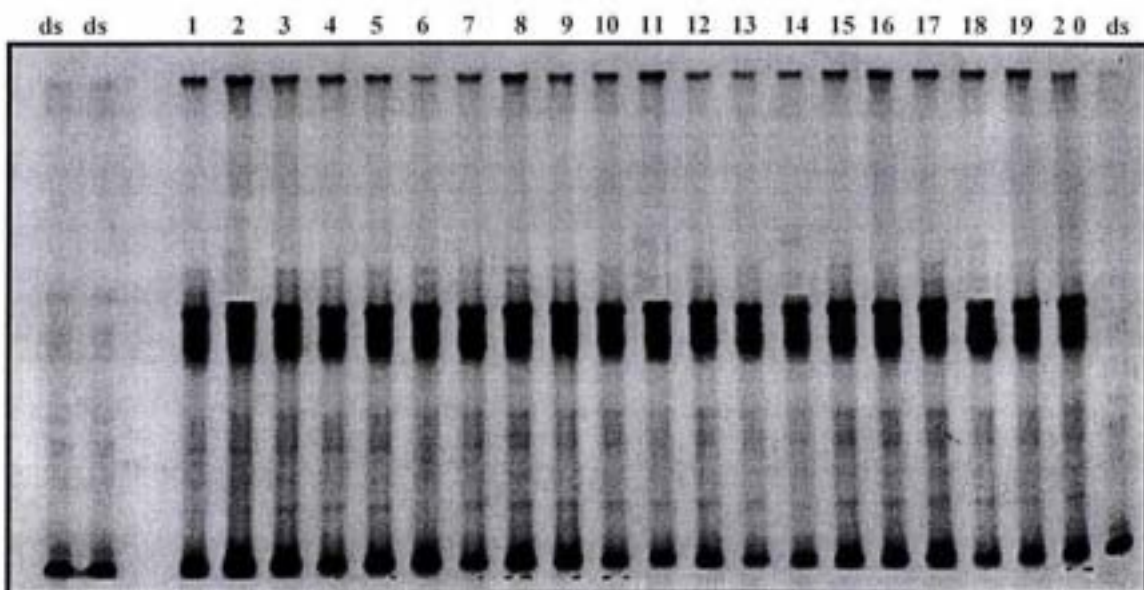
(8a) 5.4% de acrilamida sin glicerol



(8b) 5.4% de acrilamida con glicerol



(8c) 8.0% de acrilamida sin glicerol



(8d) 8.0% de acrilamida con glicerol

Figura 8.- Resultados del exon2-2 del gen Nkx2.2 a las diferentes concentraciones de acrilamida y de glicerol.

Figura 9. PCR PURIFICADO PARA SECUENCIAR

La figura 9 muestra un PCR purificado de las muestras seleccionadas en las placas de SSCP, en donde se observó un patrón de migración diferente, del exón 2-1 del gen Nkx2.2 de los sujetos control. En el carril de la izquierda el marcador de 100pb, y del carril 1 al 8 las muestras correspondientes a cada control, amplificó en la talla correspondiente al exón (378pb).

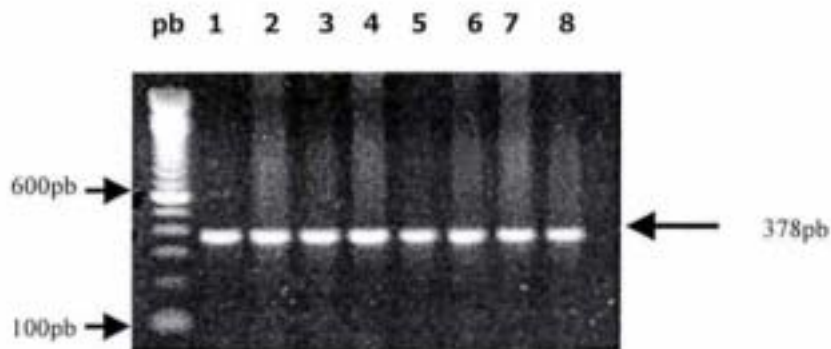


Figura 9. PCR purificado.

5.7 SECUENCIACIÓN

En la figura 6d se observó un cambio en el corrimiento electroforético en el carril 9, la cual se secuenció manualmente tal y como se muestra en la figura 10, la figura 10a corresponde a la muestra 9, la figura 10b al control 2 y la figura 10c al control 5, no se logró observar la secuencia completa del exón por lo que secuenciaron automáticamente mostrándonos en la figura 11 la secuencia automática completa de la muestra 2, en la cual no se observa ninguna variación, por otro lado la figura 12 muestra una transición heterocigota C32T generando un cambio del aminoácido prolina por leucina en el codon 32 (P32L).

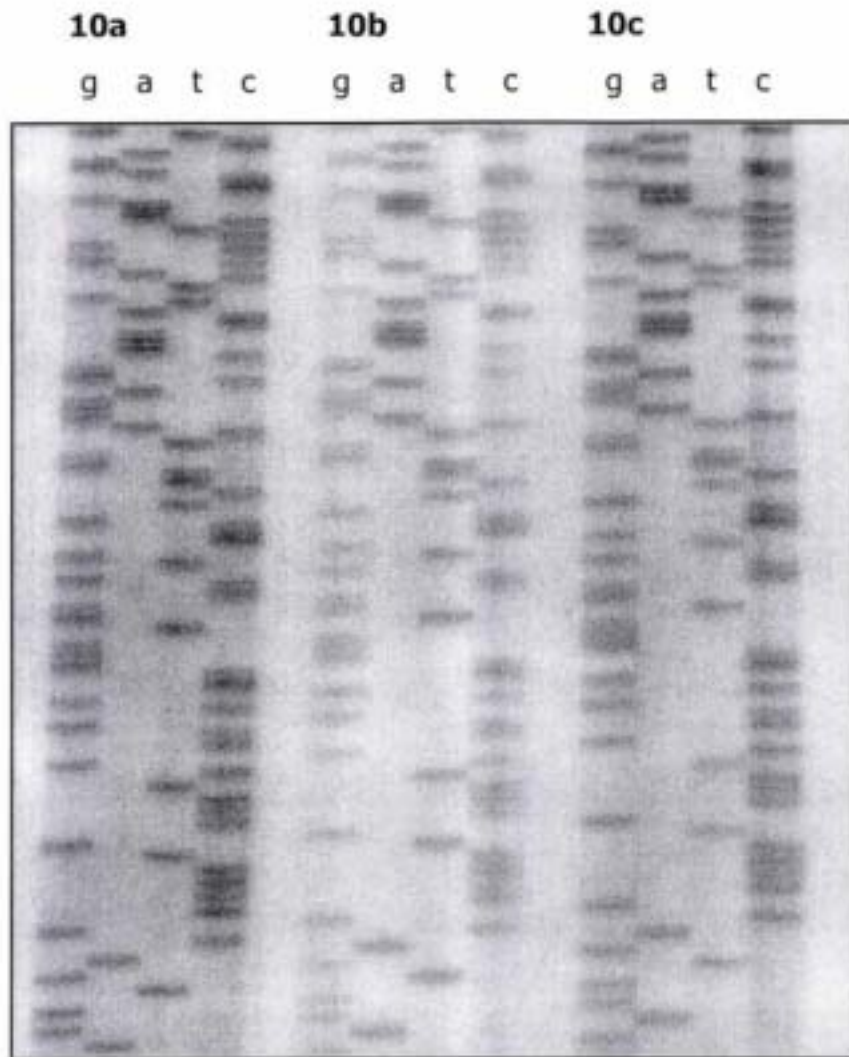


Figura 10.- Secuenciación manual del exón 1 del gen Nkx2.2 de las muestras 9, 2 y 5.



Model 3100
Version 3.7
Basecaller-3100SR.bcp 8863
BC 1.3.0.0
Muestra1_Exon1 5'-3'.ab1
Alejandro Cabrera
Cap 9

Signal G:3710 A:2682 T:1750 C:2446
DT3100POP6(BD)v2.mob
demo_3100
Points 668 to 5350 Pk 1 Loc: 668

Page 1 of 1
Fri, Dec 05, 2003 11:53 AM
Thu, Dec 04, 2003 5:30 PM
Spacing: 12.79(12.79)

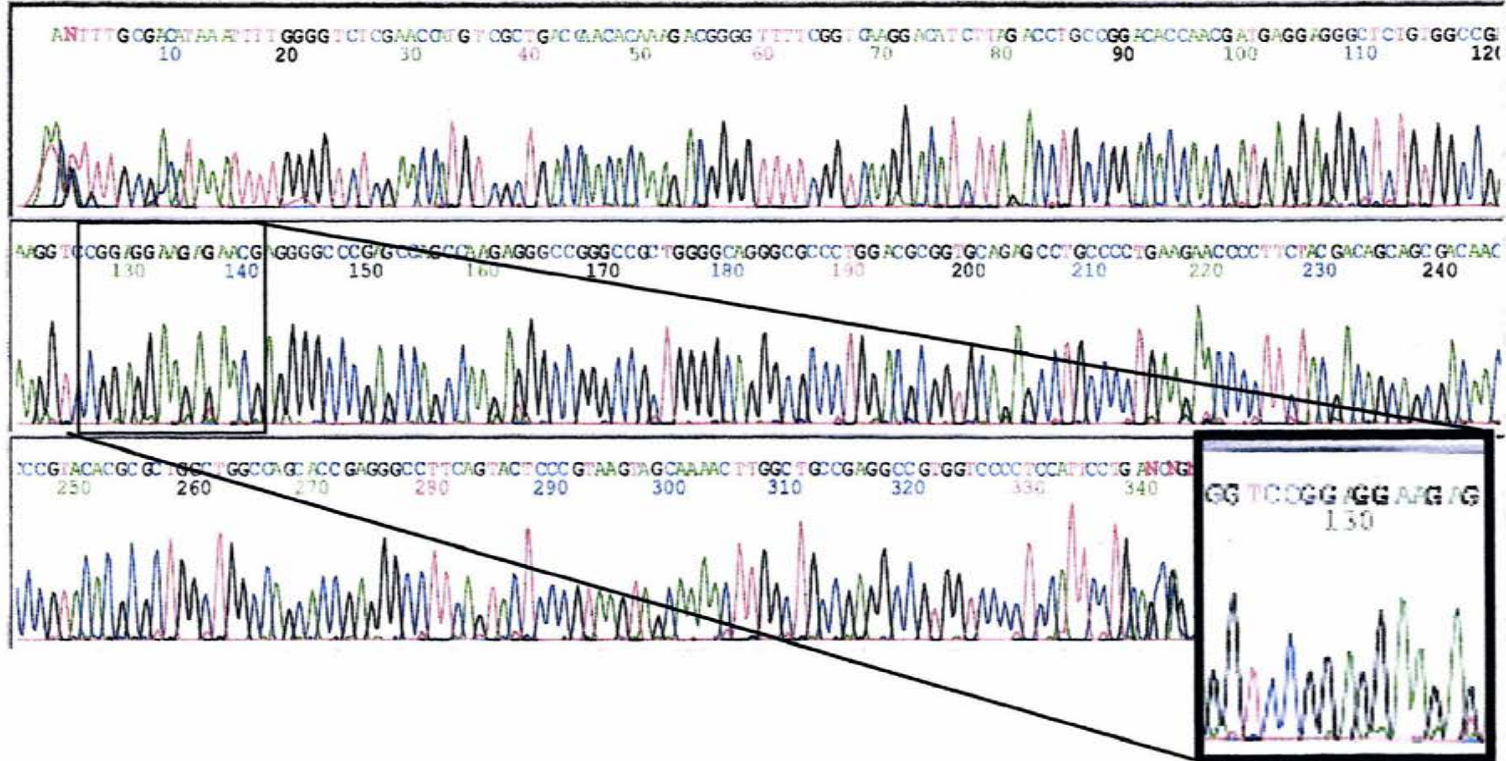


Figura 11. Secuenciación automática de la muestra 2 que corresponde al exón 1 del gen Nkx2.2



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

Muestra2_Exon1 5'-3'.ab1
Alejandro Cabrera
8864
Cap 11

Signal G:3952 A:2801 T:1865 C:2385
DT3100POP6(BD)v2.mob
demo_3100
Points 680 to 5350 Pk 1 Loc: 680

Page 1 of 1
Fri, Dec 05, 2003 11:53 AM
Thu, Dec 04, 2003 5:30 PM
Spacing: 12.64(12.64)

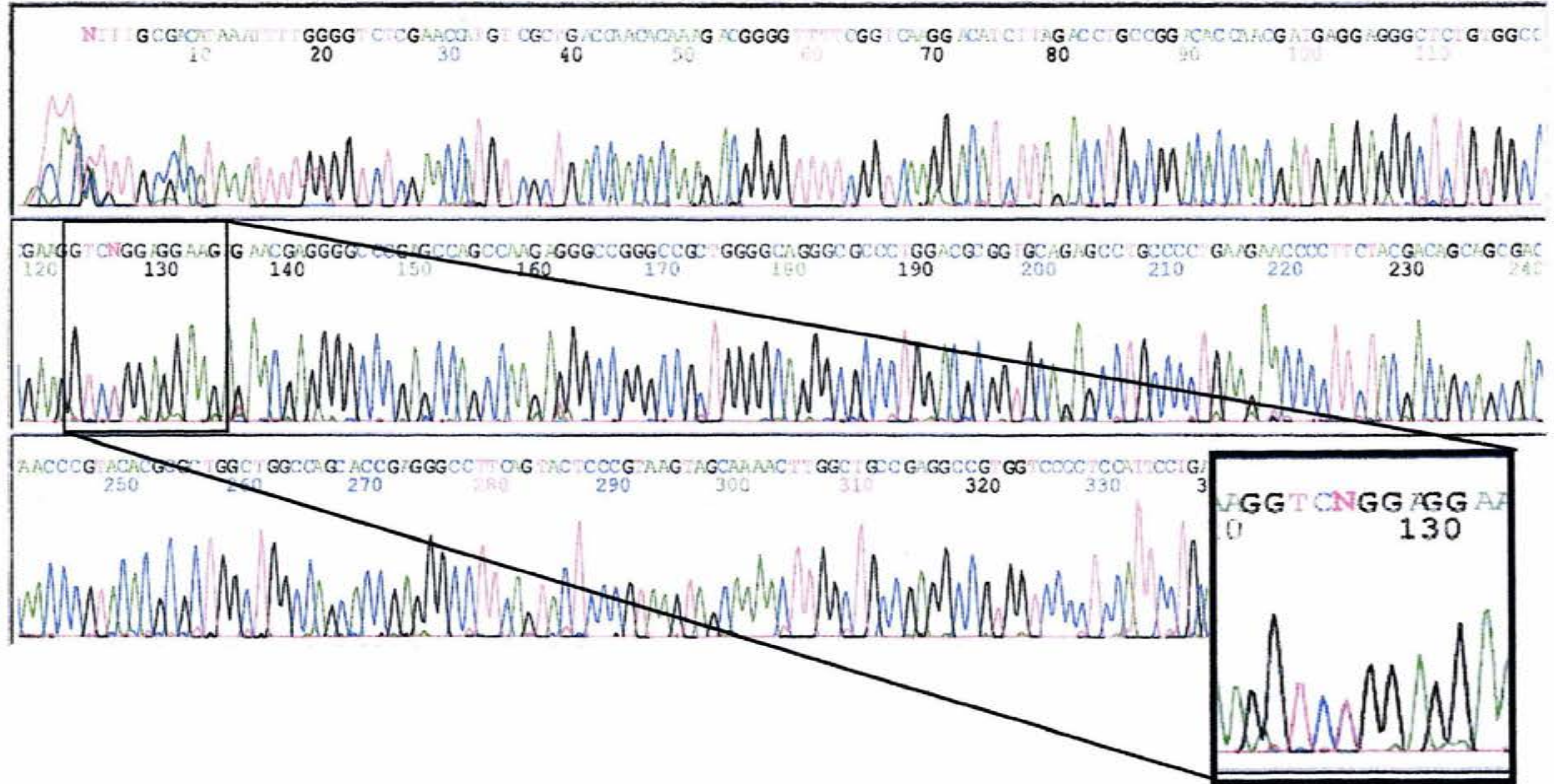


Figura 12. Secuenciación automática de la muestra 9 que corresponde al exón 1 del gen Nkx2.2

Figura 13.- En la figura 7c en el carril 7 se observa un cambio en el corrimiento electroforético, esta muestra se secuencio manualmente, la cual se observa en la figura 13, en la figura 13b se observa la muestra 4, solo una parte del gen ya que no se logro ver toda la secuencia completa del exón 2-1 por lo que se secuencio automáticamente. En la figura 14 se observa la secuenciación automática donde se logra ver la secuencia completa de la muestra 4, la figura 15 muestra una transversion heterocigota de G131C, generando un cambio de aminoácido Glicina por Arginina en el codon 131 (G131R).

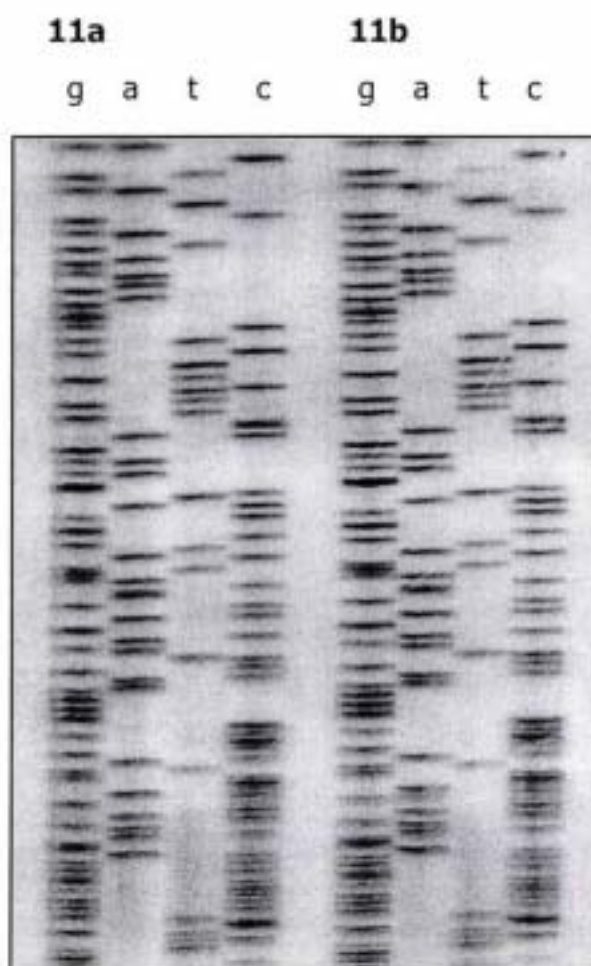


Figura 13. Secuenciación manual del gen Nkx2.2 exón 2-1 de las muestras 7 y 4.



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

4_Exon2-1.ab1
Alejandro Cabrera
9100
Cap 14

Signal G:4207 A:2403 T:1602 C:2611
DT3100POP6{BD}v2.mob
demo_3100
Points 508 to 4850 Pk 1 Loc: 450

Page 1 of 1
Thu, Jan 22, 2004 5:28 PM
Thu, Jan 22, 2004 2:18 PM
Spacing: 11.64{11.64}

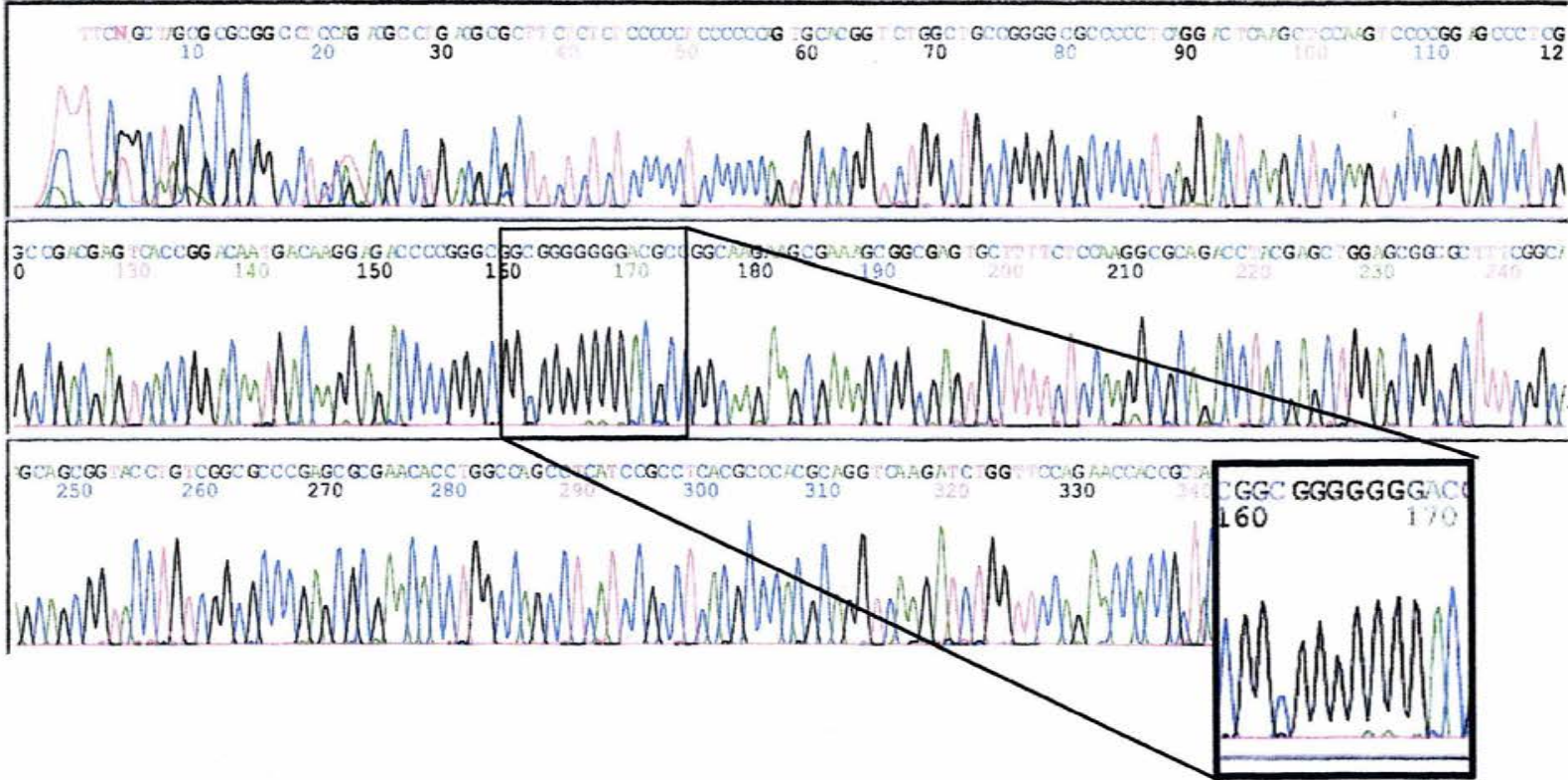


Figura 14. Secuenciación automática de la muestra 4 que corresponde al exón 2- 1 del gen Nlx2.2

6. DISCUSIÓN

Se han identificado genes que están involucrados en el desarrollo y diferenciación del páncreas, tales como: Pdx-1, Isl-1, PAX4, PAX6, NeuroD1, Hlxb9, Nkx6.1 y Nkx2.2, los cuales están relacionados en el desarrollo de la diabetes *mellitus* tipo 2 (19). En este trabajo se evaluó molecularmente al gen Nkx2.2, del cual se encontraron dos polimorfismos, el P32L y G131R.

Dado que Nkx2.2 es un gen que está involucrado en la embriogénesis del páncreas (40), se especula que participa en la aparición de la diabetes *mellitus* de inicio temprano (<25 años) (38); en base a esto, en el presente estudio se seleccionaron personas con una edad promedio de 59.25 ± 9.92 años, sin antecedentes heredo familiares de diabetes *mellitus*, lo que garantiza que estos sujetos no presentaron diabetes de inicio temprano. Seleccionando de esta manera una población adecuada para la evaluación de variantes polimórficas en nuestra población.

Otros 2 parámetros que se tomaron en cuenta para seleccionar al grupo de estudio fueron el índice cintura cadera (ICC) y el índice de masa corporal (IMC), estos dos parámetros son indicativos de obesidad el cual es un factor que se ha reportado, influye en la aparición de la diabetes *mellitus* de tipo 2 (80). En este estudio estos dos parámetros estuvieron dentro de los valores normales, por lo que estas personas no presentaron un dato predisponente para este tipo de diabetes. De esta manera las personas reclutadas mostraron un IMC de 25.9 ± 4.6 y un ICC de 0.88 ± 0.059 .

Adicionalmente, al grupo de estudio se le hizo una evaluación bioquímica en base a las determinaciones de glucosa, colesterol y triglicéridos en sangre, estas determinaciones nos permitieron analizar el estado metabólico de las personas, en

las cuales se obtuvieron valores dentro de los intervalos normales (ver tabla 6), lo que indica que el grupo reclutado esta compuesto de personas sanas.

Para llevar a cabo una evaluación exhaustiva del metabolismo de carbohidratos en la población seleccionada, se realizaron pruebas para evaluar la función pancreática, que incluyeron la determinación de insulina y glucagón, hormonas secretadas por el páncreas. Además, se cuantificó el péptido C como indicativo de que las células beta del páncreas secretan insulina (23). Los resultados obtenidos se encontraron dentro de los valores normales, proporcionando un dato adicional de que los sujetos cumplieron con todos los requisitos para ser un buen grupo control y llevar a cabo la evaluación de variantes polimórficas en el gen Nkx2.2.

Una vez realizada la selección de los sujetos control con base a los resultados de las pruebas anteriormente mencionadas, se prosiguió al análisis molecular del gen Nkx2.2, por medio de la técnica SSCP (Polimorfismo Conformacional de Cadena Simple), método que permite detectar alguna alteración en el DNA (78) y posteriormente se realizó la secuenciación. De este modo el análisis del exón 1 del gen Nkx2.2 por medio de SSCP, muestra dos patrones de migración diferentes (ver figura 7), lo que indica una posible alteración en la secuencia del DNA en este exón, este cambio se presenta con una baja frecuencia ya que solo 1 de los 20 sujetos lo presentaron (carril 9). Con respecto al análisis del exón 2-1, se encontró que hay dos patrones de migración diferentes, uno común y otro diferente en el carril 7 (ver figura 8c), el cambio observado nos indica una baja frecuencia (5%) ya que solo 1 de los 20 sujetos lo presentó. Con lo que respecta al exón 2-2 no se observó ninguna diferencia en el patrón de migración.

Así una vez identificadas las muestras que presentaron un patrón diferente de migración, éstas fueron secuenciadas con el fin de identificar el cambio de bases nucleotídicas. Los resultados de la secuenciación mostraron que en el exón 1 se encontró un polimorfismo en el codón 32 que corresponde al cambio de una citosina por una timina, dando como resultado la sustitución de una prolina por una leucina (P32L), ambos aminoácidos apolares. Por otro lado, en el exón 2-1 se identificó un polimorfismo en el codón 131 que indica el cambio de una guanina por una citosina, lo que resulta en la sustitución de una glicina, aminoácido no polar, por una arginina, aminoácido polar con carga (G131R). Estas variaciones generan un cambio en la secuencia de los aminoácidos lo que podría causar una alteración en la estructura de la proteína y de esta manera podría alterar su función. No obstante, para evaluar si dichos cambios encontrados confieren alguna alteración en la función de la proteína, es necesario llevar a cabo pruebas biológicas. Además, se requiere de estudios adicionales que incluyan a pacientes diabéticos para saber si estas variantes confieren susceptibilidad a la diabetes mellitus de aparición temprana.

Dado que los resultados obtenidos son de personas sanas es probable que se traten de polimorfismos y considerando que un polimorfismo genético se halla en un locus que tenga en una determinada población, cuando menos dos alelos, significando con ello un frecuencia de al menos 1% en dicha población (81), es necesario aumentar la población de estudio, ya que en este trabajo el grupo analizado estuvo formado únicamente por 20 sujetos.

Existen reportes sobre variantes polimórficas distribuidas en poblaciones de todo el mundo. Por ejemplo la variante A45T del gen BETA2/NEURO D1 se ha reportado en Polonia, Japón, Estados Unidos (82), actualmente hallada en la población mexicana (83). Por otro lado, existen variantes que son exclusivas de una población específica como la reportada en la comunidad Oji- Cree de Canadá que corresponde a la variante G319S encontrada en un 40% de esa población

(69). Para saber si las variantes polimórficas encontradas en este trabajo son propias de nuestra población, es necesario que se lleven a cabo estudios adicionales en los que se incluyan razas autóctonas como los indígenas, pues nos ayudarían a saber si dichas variantes son propias de nuestra raza o se presentan como consecuencia del mestizaje. Además estos resultados pueden sentar las bases para llegar a crear una biblioteca de SNP's de nuestra población, que mediante el uso de técnicas moleculares tales como PCR tiempo real y microarreglos, puedan ayudar a la evaluación de la diabetes *mellitus* de aparición temprana.

7. CONCLUSIONES

Se lograron identificar dos variantes polimórficas en el gen Nkx2.2 en sujetos sanos de la ciudad de México, las cuales fueron:

- Polimorfismo en el exón 1 que corresponde a una sustitución de una citosina por una timina en el codón 32, la cual ocasionó un cambio en la secuencia de aminoácidos sustituyendo una prolina por una leucina (P32L).
- En el exón 2-1 se encontró una sustitución de una guanina por una citosina, esto genera una sustitución del aminoácido guanina por la citosina en el codón 131 (G131R).
- Los dos polimorfismos encontrados son de baja frecuencia ya que se hallaron en 1 de los 20 sujetos analizados (5%).
- Estos dos polimorfismos no han sido reportados en ningún país del mundo.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. McKnight, S.L. Mechanism of eukaryotic transcription. *Genes Development*,10:367-381,1996.
2. Lemon, B. y Tijan,R., Orchestrated response: a symphony of transcriptional factors for gene control, *Genes Development*,14:2551-2569,2000.
3. Chi T., Liebeman P., Ellwood K., Carey M.A. General mechanism for transcriptional synergy by eukaryotic activators. *Nature*. 377:254-257.1995.
4. Struhl, K., Chromatin structure and RNA polymerase II connection: implications for transcription, *Cell*,84:179-182,1996.
5. Jiménez García, L.F. y Merchant Larios, H. *Biología Celular y molecular*, Pearson Educación Primera edición 1993.
6. Felsenfeld, G. Chromatin unfolds, *Cell*. 86:13-19.1996.
7. West, A.G., Gaszner, M., Felsenfeld, G., Insulators: many functions, many mechanism. *Genes. Dev.* 16:271-288.2002.
8. Lewin Benjamin, *Genes VII*, Marbán Libros S.L., Madrid España 2001.
9. Papavassiliou AG. Molecular Medicine. Transcription factors. *N Engl J Med*. 332:45-47. 1995.
10. Nichols J, Nimer SD. Transcription factors, translocation and leukemia. *Blood*. 80:2953-63. 1992.
11. Lawrence HJ, Largman C. Homeobox genes in normal hematopoiesis and leukemia. *Blood*. 80:2445-53. 1992. Rabbits TH, Boehm T. LIM domains. *Nature*. 346:418. 1990.
12. Freyd G, Kim SK, Howitz HR. Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene LIN-11. *Nature*. 344:876-9. 1990.
13. Karlsson O, Thor S, Norberg T, Ohlsson H, Edlund T. Insulin gene enhancer binding protein Isl-I is a member of a novel class of proteins containing both a homeo-and a Cys-His domain. *Nature*.344:879-82. 1990.

14. Chakrabarti, S.K. and Mirmira, R.G. Transcription factors direct the development and function of pancreatic β -cells. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 14:78-84.2003.
15. Harding R., Bocking A.D., *Fetal Growth and Development* Cambridge University Press 2001 First published.
16. Edlun H. Pancreatic organogenesis-developmental mechanism and implications for therapy. *Nat. Rev. Genet.* 3:524-532.2002.
17. Miralles F. et al. Follistatin regulates the relative proportions of endocrine versus exocrine tissue during pancreatic development. *Development.* 125:1017-1024.1998.
18. Ahlgren U. Et al. Independent requirement for ISL 1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature.* 385:257-260.1997.
19. 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 academy of science.* 97(4): 1607-1611. 2000.
20. St-Onge L; Wehr R; Gruss P, Pancreas development and diabetes. *Current opinion genetics development.* 9(3): 295-300. 1999.
21. Nelson David L, Cox Michael M, Cuchillo Claudi M. *Lehninger Principios de Bioquímica*, ediciones Omega, Tercera edición 2001.
22. Maechler, P. & Wollheim, C.B. -Mitochondrial function in normal and diabetic β -cells. *Nature* 414:807-812.2001.
23. Murray Robert K; Mayes Peter A; Granner Daryl K; Rodwell Victor W; *Bioquímica de Harper*. Editorial El Manual Moderno Decimaquinta edición 2001.
24. Permutt Alan M, Hattersley Andrew T. Searching for Type 2 diabetes genes in the Post-genome era. *Trends in Endocrinology and Metabolism.*11:383-393.2000.
25. Seino S, Seino M, Nishi S, Bell GI, Structure of the human insuline receptor gen and characterization of its promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 86:114-118.1989.

26. Patti M., Kahn C., The insulin receptor-a critical link in glucose homeostasis and insulin action. *J.Basic.Clin.Physiol. Pharmacol.* 9:89-109.1998.
27. Jerich J.E. The genetics basics of type 2 diabetes mellitus: Impaired insulin secretion Vs impaired insulin sensitivity. *Endocrine Rev.*19:491-503.1998.
28. Yki-Järvinen H. Patogenesis of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Lancet.*343:91-95.1994.
29. Secretaría de Salud. ENSA.2000 México D.F. 2000.
30. Foster DW. Diabetes mellitus. En: Harrison: Principios de Medicina Interna. McGraw-Hill-Interamericana de España S.A., 14º Edition. 1998: 2341-2365.
31. The expert Committee on The Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 20:1183-1197.1997.
32. Islas Andrade, S.; Lifshitz Guinzberg, A. Diabetes Mellitus, 2a. Edición, McGraw-Hill Interamericana, 2000.
33. Escobar Jiménez, F.; Fernández Soto, M.L. Diabetes mellitus. Biblioteca aula médica. 2000.
34. Groop Leif. Genetic and metabolic heterogeneity of diabetes. *International Diabetes Monitor.*12(4):1-6.2000.
35. Habener, JF.; Stoffers, DA. A newly discovered role of transcription factor involved in pancreas development and the pathogenesis of diabetes mellitus. *Proc Assoc Am Physicians.* 110(1):12-21.1998.
36. McCarty, D. Zimmet, P. Diabetes 1994 to 2010: global estimates and projections. Byer Pubs ISBN 0646202448 (1994).
37. Cruz, M.I; Montoya, C.; Gutiérrez, M.; Wachter Niels, H.; Kumate, J. Polimorfismo de genes relacionado con diabetes. *Rev Med IMSS.* 40(2):113-125.2001.
38. Fajans, S.S.; Bell, G.I.; Polonsky, K.S.; Molecular Mechanisms and Clinical Pathophysiology of Maturity-Onset Diabetes of the Young. Review article. *N. Eng. J. Med.* Vol. 345, No. 15. September 27, 2001.

39. Dussoix P, Vaxillaire M, Iynedjian PB, et al. Diagnostic heterogeneity of diabetes in lean young adults. *Diabetes*.46:622-631.1997.
40. Winter William E. Newly defined genetic diabetes syndromes: Maturity Onset Diabetes of the Young. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*.4:43-51.2003.
41. Frieman EA. Advanced glycosylated end products and hyperglycemia in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes care*.22(Suppl2): B65-B71.1999.
42. Fajans SS. MODY: A model for understanding the patogenesis and natural history of type II diabetes. *Hormone Metab Res*.19(12):591-599.1987.
43. Froguel P. Zouali H. Vionnet N. Familial hyperglycemia due to mutation in glucokinase: definition of subtype of diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 328:697-702.1993.
44. Yamamoto M, Egusa G, Okubo M, Yamakido M. Dissociation of microangiopathy and macroangiopathy in patients with type2 diabetes. *Diabetes Care*.21(9):1451-1454.1998.
45. Orenca A, Daviglius M, Dyer A, Walsh M, Greeland P, Stamler J. One-hour postload plasma glucose and risks of fatal coronary heart disease and stroke among nondiabetic men and women:The Chicago Heart Association Detection Project in the Industry (CHA) Study. *J Clin Epidemiol*.50(12):1369-1376.1997.
46. Gaster B, Hirsch Y. The effects of improved glycemic control on complications in type 2 diabetes. *Arch Intern Med* 1998;158(2):134-14in type 2 diabetes. *Arch Intern Med*.158(2):134-140.1998.
47. Despres J, Lamarche B, Maurige P, Cntin , Degenais G, Moorjani S, Lupien P. Hyperinsulinemia as an independent risk factor for ischemic heart disease. *N Engl J Med*.334(15):952-957.1996.
48. 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 beta cells. *Development* 125:2213-21. 1998.
49. Furuta H, Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M, Sussei L, Michele M, Le Beau, Elizabeth M. Davis, Ogata M, Iwamoto Y, German Michael S, and Bell I. Beta-cell 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* 47:1356-58. 1998.
 50. Kemp Daniel M, Thomas Melisa K, Habener Joel F. Development Aspect of the Endocrine Pancreas, *Reviews in Endocrine and Metabolis Disorders*.4:5-17.2003.
 51. Sander M., Sussel L., Connors J., Scheel D., Kalamaras J., Dela Cruz F., Schwitzgebel V., Hayes-Jordan A., German M. Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas. *Development*.127(24):5533-5540.2000.
 52. Watada H, Scheel DW, Leung J, German MS., Distinct gene expression programs function in progenitor and mature islet cells. *J Biol Chem*. 9;278(19):17130-17140.2003.
 53. Biemar F., Argenton., Schmidtke R., Epperlein S., Peers B., Driever W. Pancreas development in zebrafish: early dispersed appearance of endocrine hormone expressing cells and their convergence to form the definitive islet. *Dev Biol*.230(2):189-203. 2001.
 54. Hsiang-Po Huang; Ming-Jer Tsai, Transcription Factors Involved in Pancreatic Islet Development, *Journal Biomedical Science*. 7:27-34.2000.
 55. Cissell MA., Zhao L., Sussel L., Henderson E., Stein., Transcription factor occupancy of the insulin gene in vivo. Evidence for direct regulation by Nkx2.2. *J Biol Chem*. 1278(2):751-756.2003.
 56. Yang L; Hatch H; Ahrens K; Cornelius JG; Petersen BE; Peck AB, In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine

- hormone-producing cells. *Proceedings of the national academy of science*. 99(12):8078-8083, 2002.
57. Leibowitz G; Ferber S; Apelqvist A; Edlund H; Gross DJ; Cesari E; Melloul D; Kaiser N, IPF1/PDX1 deficiency and beta-cell dysfunction in *Psammomys obesus*, an animal with type 2 diabetes. 50(8):1799-806.2001.
58. Hessabi B., Schmidt I., Walther R. The homeodomain of Nkx2.2 carries two cooperatively acting nuclear localization signals. *Biochem Biophys Res Commun*;270(3):695-700.2000.
59. Watada H, Mirmira RG., Leung J., German MS. Transcriptional and translational regulation of beta-cell differentiation factor Nkx6.1. *J Biol Chem*.275(44):34224-34230. 2000.
60. Pabst O., Rummelies J., Du B., Arnold HH., Targeted disruption of the homeobox gene Nkx2.9 reveals a role in development of the spinal accessory nerve. *Development*.130(6):1193-1202.2003.
61. Watada H., Mirmira RG., Kalamaras J., German MS. Intramolecular control of transcriptional activity by the Nk2-specific domain in Nk-2 homeodomain proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*.97(17)9443-9448.2000.
62. Fu H., Qi Y., Tan M., Cai J., Takebayashi H., Nakafuku M., Richardson W., Qiu M. Dual origin of spinal oligodendrocyte progenitors and evidence for the cooperative role of Olig 2 y Nkx2.2 in the control of oligodendrocyte differentiation. *Development*.129(3):681-693.2002.
63. den Hollander AI., Ghiani M., de Kok YJ., Wijnholds J., Ballabio A., Cremers FP., Broccolo V. Isolation of *Crb1*, a mouse homologue of *Drosophila crumbs*, and analysis of its expression pattern in eye and brain. *Mech Dev*.110(1-2):203-207.2002.
64. Routh J-L, A.O y Bioquimica Editorial Interamericana 2ª edición 1999.
65. Briscoe J., Sussel L., Serup P., Hartigan-O Connor D., Jessell TM., Rubenstein JL., Ericson J. Homeobox gene Nkx2.2 and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling. *Nature*.398(6728):622-627.1999.

66. Griffiths; Miller; Suzuki; Lewontin and Gelbart. *Genetica*. Quinta Edición. McGraw Hill. 1998.
67. Luque José; Herráez Angel. *Biología molecular e Ingeniería genética*. Harcourt, 2001.
68. Voet D., Voet J.G., *Bioquímica Ediciones Omega* 1992.
69. Hegele R.A., Zinman B., Hanley A.J.G., Harris S.B., Hugh Barret P., Cao H., Genes, environment and Oji-Cree type 2 diabetes. *Clinical Biochemistry*. 36:163-170. 2003.
70. Shih DQ, Heimesaat M, Kuwajima S, Stein R, Wright CVE, Stoffel M. Profound defects in pancreatic β -cell function in mice with combined heterozygous mutations in Pdx-1, Hnf-1 α , and Hnf-3 β . *PNAS*. 99(6):3818-3823. (2002)
71. Heremans Y, Van De Casteele M, in't Veld P, Gradwohl G, Serup P, Madsen O, Pipeleers D, Heimberg H. Recapitulation of embryonic neuroendocrine differentiation in adult human pancreatic duct cells expressing neurogenin 3. *J Cell Biol*. 159(2):301-312. (2002)
72. Aguilar-Salinas Carlos A, Reyes-Rodríguez E, Ordóñez-Sánchez M, Arellano-Torres M, Ramírez-Jiménez S, Domínguez-López A, Martínez-Francois J, Velasco-Pérez M, Melchor Alpizar, García-García E, Gómez-Pérez F, Rull J, and Tusié-Luna Ma Teresa. *Journal Of Clinical Endocrinology And Metabolism*.
73. Zárate A, Basurto L, Renata P, Saucedo G, La obesidad: Conceptos actuales sobre fisiopatogenia y tratamiento. *Rev Fac Med UNAM*. 44(2):66-70. 2001.
74. World Health Organization, 1999, Geneva.
75. Schwartz W. M., Figlewicz PD, Baskin G, Woods CS, Porte D. Insulin and the central regulation of energy balance. *Endocrine Rev*. 14:109-118. 1994.
76. Evans Julie C, Frayling Timothy M, Cassel Paul G, Saker Philip J, Hitman Graham A, Walker Mark, Levy Jonathan C, O'Rahilly Stephen, Subba Rao Pamidighantam V, Bennett Amanda J, Jones Elizabeth C, Menzel Stephan, Prestwich Philip, Simecek Nikol, Wishart Marie, Dhillon Ranjit, Fletcher Chris,

- Millward Ann, Demaine Andrew, Wilkin Terence, Horikawa Yukio, Cox Nancy J, Bell Graeme I, Ellard Sian, McCarthy Mark I, and Hattersley Andrew T. Studies of association between the gene for Calpain-10 and Type 2 Diabetes Mellitus in the United Kingdom. *Am. J. Hum. Genet.*69:544-552.2001.
77. National DL. Data Group, National Institutes of Health. Diabetes in America. Second Edition Bethesda Md: National Institutes Of Health 1995 p. 95-149.
78. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics.*5(4):874-879.1989.
79. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74(12):5463-5467.1977.
80. Cavaghan M.K, Ehrmann D.A, Polonsky K.S, Interactions between insulin resistance and insulin secretion in the development of glucose intolerance. *Journal of Clinical Investigation.* 106:329-333.2000.
81. Velázquez Arellano Antonio Fondo de cultura económica
82. Hansen L, Jensen J.N, Urioste S, Petersen H.V, Pociot F, Eiberg H, Kristiansen O.P, 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.
83. Sánchez Pozos Katy, Alejandra Búsqueda de variantes polimórficas del gen NeuroD1/Beta2 en población mexicana, TESIS Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México D.F. 2004.

9. APÉNDICE I

Apéndice I

REACTIVOS PARA EXTRACCIÓN DE DNA

Sacarosa Triton 2X

- Sacarosa 219gr 0.64M
- Tris-Base 2.42gr 0.02M
- $MgCl_2$ 2.03gr 0.01M
- Triton 100X 10mL
- Llevar a 1L pH7.6 filtrar con membrana, almacenar a 4°C.

Buffer lisis – nuclear

- Tris-Base 1.21gr 10mM
- $NaCl_2$ 23.4gr 400mM
- Na_2EDTA 0.75gr 2mM
- Llevar a 500ml y Esterilizar.
- Almacenar a TA°

Tris/HCl pH8.0 a 10mM

- Pesar 30.275g de tris/HCl
- Disolver con 150ml de agua D.D. y ajustar el pH a 8.0
- Aforar a 250ml

Buffer T/E

- Tomar 1ml de Tris/HCL 10mM a pH8.0
- Agregar 200 μ l de EDTA 0.5M a pH8.0
- Aforar a 100ml

CLORURO DE SODIO SATURADO

- Disolver 35grs de cloruro de sodio en 100ml de agua DD. Solubilizar lo mas posible, quedando una carga de sal al fondo.
- Almacenar a TA.

PROTEINASA K

- Mayor de 20U/mg número de catalogo 25530-031 de GibcoBRL
- Se pesan 50mg de la proteinasa en 10ml
- 5mg/ml almacenar a -20°C

SDS 20%

- Pesar 20gr de SDS
- Llevar a 100ml de agua DD, NO ESTERILIZAR, almacenar a TA.

ALCOHOL AL 70%

- Se toman 70ml del alcohol absoluto
- Se lleva a 100ml con agua D.D.

REACTIVOS PARA AMPLIFICACIÓN DE DNA POR PCR

BUFFER 10X (DNA Pol)

- MgCl_2 a 15mM

DMSO

- Tal y como viene comercialmente

dNTPs para DNA

- En tubo eppendorf poner 25 μ l de la solución STOCK de dCTP, dCTP, dTTP y dGTP. Volumen será de 100 μ l.
- Llevar a 400 μ l con H₂O DD
- Guardar a -20°C. La concentración final es de 25 μ M.

TAQ POLIMERASA

- Con 5U/mL de Promega

BUFFER TBE 10X para 1000mL.

- Tris Base 108g
- Acido Bórico 55g
- EDTA 0.5M pH8 40ml
- Filtrar al vacío
- Aforar a un litro. Almacenar a T° ambiente.

BROMURO DE ETIDIO

- 100mg de bromuro de etidio y aforar a 10ml.
- Agitación magnética hasta disolver
- Alicuotar en eppendorff de 500 μ l y cubrirlo con papel aluminio.
- Almacenar a T° ambiente.

GEL DE AGAROSA AL 1%

- Agarosa 5gr
- Agua bidestilada 50ml
- Bromuro de etidio 1 μ l

REACTIVOS PARA SSCP

RADIOACTIVIDAD

- ^{32}P αCTP con 250 μCi o Bq de 110 número de catalogo AA0005 de AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH

BISACRILAMIDA AL 30% para 100ml

- Acrilamida 29gr
- Bisacrilamida 1gr

BUFFER DE CARGA PARA SSCP (para 10ml)

- Azul de bromofenol (Golden-Bell) 0.25% 25mg
- Cianol-Xileno (E.L.) 0.25% 25mg
- Ficol 400 000 15% 1.5g

Aforar a 10ml con agua dd. Filtrar con filtro 0.45 μm y hacer alícuotas

GELES

5.4% de acrilamida sin glicerol para 100ml

- Agua bidestilada 61.3ml
- Buffer TBE 5X 20ml
- Bisacrilamida al 30% 18ml
- Persulfato de amonio 1ml
- Temed 25 μl

5.4% de acrilamida con glicerol para 100ml

- Agua 51.3ml
- Buffer TBE 5X 20ml
- Bisacrilamida al 30% 18ml
- Glicerol 10ml
- Persulfato de amonio 1ml
- Temed 25 μl

8.0% de acrilamida sin glicerol para 100ml

- Agua 52.7ml
- Buffer TBE 5X 20ml
- Bisacrilamida al 30% 26.7ml
- Persulfato de amonio 1ml
- Temed 25 μ l

8.0% de acrilamida con glicerol para 100ml

- Agua 30ml
- Buffer TBE 5X 14ml
- Bisacrilamida al 30% 18.7ml
- Glicerol 7ml
- Persulfato de amonio 1ml
- Temed 25 μ l

REACTIVOS PARA SECUENCIACION

BUFFER TTE 10X para 1000mL

- Tris-Base 108g
- Taurina 36g
- Na₂ EDTA 2H₂O 20g
- H₂O llevar a 1000ml
- Filtrar y almacenar a T.A.

GEL AL 6% en 100mL

- Acrilamida 5.7g
- Bisacrilamida 0.3g
- Urea 42g
- TTE 10X 10ml
- H₂O aprox. 40ml
- Persulfato de amonio al 10% 1ml
- Temed 15 μ l