



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESPECIALIDAD EN BIOQUÍMICA CLÍNICA

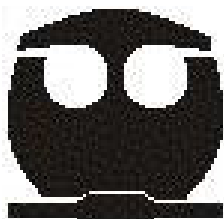
TÍTULO: *“ESTUDIO DE LA MUTACIÓN T130I DEL GEN HNF-4 α EN POBLACIÓN ECUATORIANA COMO FACTOR DE SUSCEPTIBILIDAD AL DESARROLLO DE DIABETES MELLITUS TIPO 2”.*

Tesina que para obtener el Título de Especialista en Bioquímica Clínica, presenta:

Dr. Agustín Federico Vega Crespo.

Asesora:

Dra. Marta Alicia Menjívar Iraheta.



México DF, Febrero de 2007



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.

Dedicatorias

Dedico esta investigación a mis padres, por su apoyo incondicional y permanente a lo largo de toda mi vida y su infinito amor. A mi esposa, por brindarme cariño y amistad. A “Obi, Chewbacca y Eneas”, por su abnegado sacrificio. No lo hubiera logrado sin ustedes.

Agustín

Agradecimiento

Agradezco:

- A Dios, por su apoyo en cada momento de mi vida.
- A toda mi familia en especial mis padres y a mi esposa por todo su esfuerzo y sacrificio antes, durante, y después de mi postgrado.
- A la Universidad Autónoma de México que me abrió las puertas en respaldo de mis aspiraciones científicas y profesionales.
- A la Dra. Martha A. Menjívar Iraheta por su apoyo científico con sus amplios conocimientos y su amistad manifiesta a lo largo de mis estudios de Especialidad y en la realización de esta Tesina.
- A la Dra. Ma. Guadalupe Ortiz por su comprensión y apoyo para mis objetivos profesionales en la realización de esta Tesina.
- A la Dra. Ángeles Granados y Msc. Ísela Montúfar por brindarme desinteresadamente su amistad y conocimientos.
- A todos mis amigos en México, gracias por hacerme sentir como en casa.
- A mis amigos y colaboradores que participaron en el estudio

ÍNDICE

Índice.....	i
Resumen.....	ii
INTRODUCCIÓN.....	1
MORFOFISIOLOGÍA PANCREÁTICA Y PÁNCREAS ENDOCRINO.....	3
DIABETES MELLITUS.....	9
DIABETES MODY.....	16
JUSTIFICACIÓN.....	23
OBJETIVO.....	24
HIPÓTESIS.....	25
MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	33
RESULTADOS.....	34
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	43
CONCLUSIONES.....	47
BIBLIOGRAFÍA.....	48
ANEXOS.....	51

RESUMEN

La Diabetes Mellitus es una enfermedad heterogénea, crónica y progresiva que afecta a 151 millones de individuos en el mundo; el crecimiento de esta enfermedad en la última década fue global, y su aparición se ve cada vez a edades más tempranas. Mutaciones en el gen HNF-4 α , están relacionadas con Diabetes Mellitus tipo 2 de inicio temprano. Se ha descrito la mutación T130I de dicho gen asociada a Diabetes Mellitus tipo 2 de aparición temprana en Japón, Dinamarca y México, en este último se ha encontrado con una alta prevalencia en pacientes diabéticos (16%).

En esta investigación se procedió a evaluar la presencia de la mutación T130I del gen HNF-4 α en población mestiza ecuatoriana, con este propósito se reclutaron 28 individuos mestizos ecuatorianos sin diabetes entre 23 y 42 años; se registraron mediciones antropométricas tales como cintura y estatura para calcular el índice de masa corporal (IMC) e índice cintura cadera (ICC). Se determinó glucosa, triglicéridos, colesterol total así como de sus fracciones. Además se cuantificó insulina y se realizaron pruebas moleculares encaminadas a poner en manifiesto la mutación T130I del gen HNF-4 α a través de RFLP. (Análisis Polimórfico de longitud de los Fragmentos de Restricción).

Los resultados muestran la presencia de la mutación T130I del gen HNF-4 α en población mestiza ecuatoriana con una prevalencia del 3.6 %. En cuanto a los resultados antropométricos, bioquímicos y hormonales no se encontró diferencias significativas al estratificar la población por género, edad y antecedentes heredo-familiares de diabetes.

Estudios futuros de asociación caso-control nos permitirán dilucidar sobre la participación de esta mutación en población diabética ecuatoriana. La probabilidad de un ancestro común para América latina y el estudio de los posibles diabetogenes nos darán una panorámica mucho más amplia de la diabetes en nuestros pueblos, así como del pronóstico, diagnóstico y manejo terapéutico de la enfermedad.

INTRODUCCIÓN

La diabetes es una pandemia de crecimiento global en la última década, y de igual manera su aparición se observa a edades cada vez más tempranas. En el año 2000 se estimó que un 5 % de la población mundial padecía de esta enfermedad con 171 millones de afectados alrededor del mundo. ⁽¹⁾

En este sentido la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que para el año 2030 habrá 333 millones de diabéticos en el mundo entero, en función al incremento alarmante de la obesidad sobre la población general, y por la migración masiva de la misma hacia las grandes ciudades. ⁽¹⁾

La diabetes en las Américas, tiene diferente incidencia, observándose más en América del norte, en México por ejemplo, la prevalencia de la diabetes en el año 2000 fue de 7.5 % en individuos mayores de 20 años, siendo la primera causa de muerte en mujeres (13.4 %) y la segunda en varones (8.6 %). ⁽²⁾

Por otro lado, en el Ecuador, la prevalencia de diabetes en el 2005 fue del 4.6 % y es la cuarta causa de muerte en la población general estratificándose en 6.4 % en mujeres y 3.8 % en el sexo masculino. ⁽³⁾

La OMS estimó que en el año 2000, existan 341 mil diabéticos en Ecuador, y 2.179 millones de diabéticos en México; para el 2030 se estima que habría 921 mil y 6.130 millones respectivamente para cada país. ⁽¹⁾

La tasa de crecimiento de diabetes es alarmante. Se estima que en México en el 2015 exista una prevalencia cercana al 12.6 % con una mayor incidencia en el Distrito Federal y los estados del norte como Coahuila entre otros. ⁽²⁾

La frecuencia de Diabetes Mellitus tipo 2 en América es variable, existen regiones y etnias en las cuales hay una mayor prevalencia, como los indios Pima del Sur de Arizona con un 51.4 %. ⁽¹⁾

En Sudamérica la distribución es variada; en Brasil y Argentina se presenta en un 7.6 % de la población. ⁽¹⁾

La Diabetes Mellitus tipo 1 tiene patrones de manifestación distintos sobre dicha población; en Canadá se presenta en un 24.5 % de la población con Diabetes Mellitus, en México el 1.5 %, Brasil 8 % y Argentina 7 %. ⁽¹⁾

La segregación de la Diabetes Mellitus se realiza en función de una serie de factores que predisponen al desarrollo de la misma. En este sentido, en lo referente a la Diabetes Mellitus tipo 2, se sabe que es una enfermedad poligénica y multifactorial. ⁽⁴⁾

Existen factores ambientales y socioeconómicos que predisponen al desarrollo de esta patología en edades cada vez más tempranas, por otro lado hay un fondo genético característico de cada población y un fondo genético característico de toda América latina fruto de un ancestro común. ⁽⁴⁾

El costo que una enfermedad de esta magnitud genera al sector salud, es sumamente elevado, de esta manera la OMS estimo los siguientes rangos para América latina (Tabla. 1.): ⁽¹⁾

Tabla. 1. Diversificación de Células Pancreáticas. ⁽¹⁾

Grupo	Países	Costo promedio por Persona. (USD por persona)
1	Trinidad y Tobago, y Barbados	577
2	México y Chile	607
3	Ecuador, Guatemala y Jamaica	491
4	Bolivia	550

Anualmente, la Secretaria de Salud en México, gasta 15.118.3 millones de dólares en el tratamiento primario de esta patología; por otro lado, el Ministerio de Salud en el Ecuador dispone anualmente de 598.5 millones de dólares americanos en el tratamiento de esta enfermedad. ⁽⁵⁾

Todas estas consideraciones, justifican el estudio de este fondo genético de susceptibilidad en población de América latina, en busca de una perspectiva que permita un mejor entendimiento de este fenómeno, y brinde respuestas que permita desarrollar nuevas alternativas de tratamiento para esta creciente epidemia.

MORFO-FISIOLOGÍA PANCREÁTICA Y PÁNCREAS

ENDOCRINO

El páncreas humano es un órgano impar, constituido por 2 tipos de células secretoras, ambas relacionadas con el manejo de nutrientes. El 98 % del páncreas está constituido por el páncreas exocrino, cuya función es sintetizar, almacenar y secretar al duodeno las enzimas necesarias para la digestión de alimentos. El 2 % restante está constituido por células endocrinas con función metabólica y de síntesis de varias hormonas, las cuales constituyen el páncreas insular formado por los islotes de Langerhans. ⁽⁶⁾

Anatómicamente, el páncreas está estructurado por cabeza, istmo, cuerpo y cola, y recibe la irrigación sanguínea de las ramas del tronco celiaco, arteria mesentérica y la arteria pancreático-duodenal. (Fig. 1.0.)

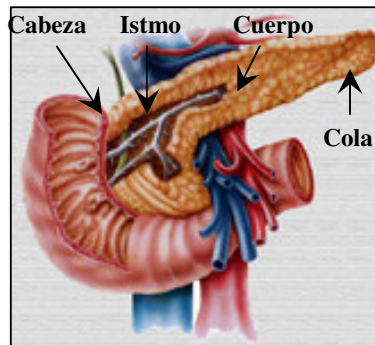


Fig. 1.0. Estratificación Morfológica del Páncreas. ⁽⁸⁾

ANATOMÍA E HISTOLOGÍA PANCREÁTICA

Los islotes de Langerhans, se distinguen del parénquima exocrino por su escasa afinidad por la tinción de hematoxilina-eosina.

El tamaño de los islotes es variable, oscilando entre los 140 – 250 μm y se encuentran rodeados por una capa de tejido colágeno que los separa del resto de tejido exocrino circulante. ⁽⁶⁾

Dentro de los islotes se distinguen 4 tipos de células:

α , β , δ y PP o γ , que presentan una organización tridimensional con un núcleo central de

células β rodeando por el resto de células endocrinas, lo que permite la liberación adecuada de insulina en estado basal y ante un estímulo. ⁽⁶⁾ (Fig. 1.1.)

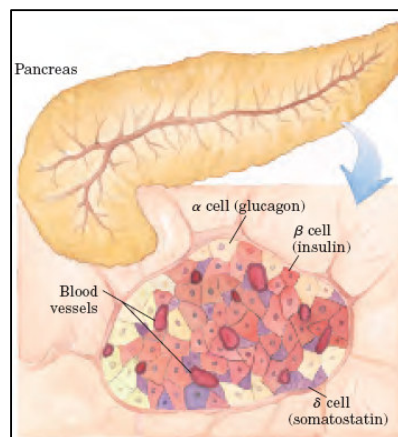


Fig. 1.1. Diversificación de Células Pancreáticas. ⁽⁷⁾

Existe una vía “*Paracrina*” de regulación, mediante la cual las hormonas liberadas pueden influir en las células vecinas, además tanto células adyacentes homólogas como heterólogas están conectados por medio de canales intercelulares llamados “*gap-junctions*”. ⁽⁶⁾

Cada una de las hormonas insulares es capaz de influir en la secreción de las restantes. Así, la somatostatina (SS) suprime la secreción de las otras tres. La insulina suprime la secreción de glucagon. El glucagon estimula la secreción de insulina y SS, y cada una de ellas, es capaz de suprimir su secreción de manera “*Autocrina*”. ⁽⁶⁾

GLUCAGON

El glucagon es una hormona peptídica de 29 aminoácidos sintetizado y segregado por la célula α pancreática. La secreción de glucagon así como de insulina depende de la concentración de glucosa a nivel del líquido extracelular. ⁽⁶⁾

El glucagon aumenta durante el ayuno y en el ejercicio, que inducen una caída de la glucemia, y se ve asociado con una disminución de la insulina. Al aumentar la glucemia, la secreción de glucagon se suprime. ⁽⁶⁾

Su acción a nivel biológico se da principalmente en el hígado, efectuándose de la siguiente manera: ^{(6) (7)}

1. Estimula la glucogenólisis, fosforilando la fosforilasa β .
2. Inhibe la glucogenogénesis, fosforilando la glucogenosintetasa β .
3. Estimula gluconeogénesis e inhibe la glucólisis, al inactivar la Fosfofructocinasa, y activar la Fructosa 2,6 bifosfatasa.
4. Inhibe la lipogénesis, al inhibir glucólisis y la acetil-CoA carboxilasa.
5. Favorece a la cetosis, al inhibir la carnitina-palmitoil-transferasa.

SOMATOSTATINA

Hormona polipeptídica de 14 aminoácidos, con propiedad de inhibir la secreción hipotalámica de Hormona del Crecimiento (GH). Se sintetiza en las células δ de los islotes pancreáticos. ⁽⁶⁾

Esta hormona tiene un amplio espectro de funciones inhibitorias, entre las cuales destacan: ^{(6) (7)}

1. Inhibe la secreción de insulina, glucagon y polipéptido pancreático por una acción paracrina.

2. Se autorregula de manera autocrina.
3. Regula la secreción ácida del estómago por una acción directa en las células parietales.
4. Disminuye la motilidad y el flujo sanguíneo gastrointestinal.

POLIPÉPTIDO PANCREÁTICO.

Hormona polipeptídica de 36 aminoácidos perteneciente a la familia de péptidos neuroendocrinos. Es secretado por las células γ del páncreas y además se sintetiza fuera del páncreas en ileon, colon, recto, sistema nervioso central y periférico. ⁽⁶⁾

Sus funciones son varias como la regulación de la función gastrointestinal, estimulando la secreción del páncreas exocrina y el vaciamiento de la vesícula biliar. ⁽⁶⁾

GLP-1 (*GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1*)

Pertenece a la familia de péptidos sintetizados a partir del gen preproglucagon, y es sintetizada por las células α del páncreas, y posee una acción insulínica muy potente. ⁽⁶⁾

Esta hormona se sintetiza durante el ayuno y el periodo post-ingesta, durante este último favorece la liberación de insulina. ⁽⁶⁾

La unión de GLP-1 a su receptor origina la síntesis de AMPc, que desencadena el cierre de los canales de Na^+/K^+ dependientes de ATP en las células β pancreáticas; la despolarización de la membrana da lugar a la apertura de los canales de calcio, potenciando la liberación de insulina por parte de los islotes pancreáticos, aumentando la efectividad de los canales de Potasio – ATP independientemente de glucosa. ⁽⁶⁾

POLIPÉPTIDO AMILOIDE DE LOS ISLOTES

Péptido secretado por las células β pancreáticas, en respuesta a glucosa o arginina. Amilina e insulina se secretan en respuesta al mismo estímulo. ⁽⁶⁾

Tiene funciones diversas como la inhibición de la captación de glucosa y síntesis de glucógeno en músculo, estimula la glucogenólisis en hígado y, eleva la glucosa y lactato en ayunas. ⁽⁶⁾

INSULINA

Hormona anabólica de naturaleza polipeptídica producida por las celdas β de los islotes pancreáticos. Así, la *Diabetes Mellitus* es consecuencia de una deficiencia absoluta o relativa de insulina, o de resistencia a la misma con una hiperinsulinemia compensadora que conlleva a enfermedades relacionadas con formas de hipertensión, obesidad, aterosclerosis o alteraciones de la coagulación. ^{(6) (7)}

La insulina se sintetiza en el núcleo de las células β como una sola cadena polipeptídica: la “Preproinsulina”, se encierra en micrvesículas en las cisternas del retículo endoplasmico donde sufre modificaciones como plegamiento de la cadena y la formación de puentes disulfuro formándose la “Proinsulina” que se transporta

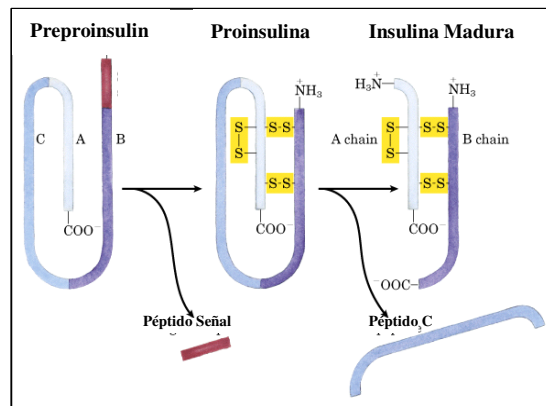


Fig. 1.2. Maduración de la Insulina. ⁽⁶⁾

al aparato de Golgi, donde se empaqueta en gránulos de secreción. La maduración de esos gránulos se hace por enzimas proteolíticas que liberan la molécula de insulina y péptido C. ^{(6) (7)} (Fig. 1.2.)

Las células β de los islotes pancreáticos funcionan como un sensor energético en general y de la glucemia circulante en particular, formando lo que se conoce como el “Aparato Sensor de la Glucosa” mediado por el quinteto de la G, formado por: Glucosa, GLUT 2, Actividad Glucocinasa, deficiencia de la GDH (glicerol fosfato deshidrogenasa) mitocondrial que reduce la Glicólisis Oxidativa. ^{(6) (7)} (Fig. 1.3.)

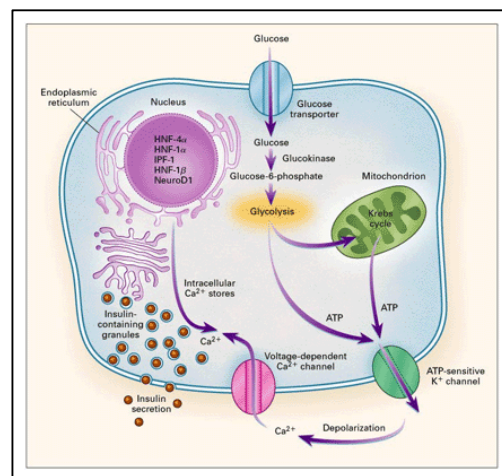


Fig. 1.3. Aparato Sensor de la Glucosa. ⁽⁹⁾

Las acciones de la insulina son muy variadas y complejas, pero se las puede clasificar según el tiempo que necesita la hormona para ejercerlas: acciones rápidas, que se ejercen en segundos, como la estimulación de la entrada de la glucosa a la célula; acciones intermedias, que se ejercen en minutos, como la síntesis proteína, inhibición de proteólisis, etc; acciones lentas, a nivel del material genético de determinadas células, que permite el aumento de ARNm para determinadas enzimas. ⁽⁶⁾ (Cuadro. 1.0.)

Cuadro. 1.0. Efectos de la Insulina sobre Tejido Periférico. ⁽⁶⁾ ⁽⁷⁾

Hígado	Músculo	Adiposito
- Aumenta Glucogenogénesis - Reduce Gluconeogénesis - Reduce la salida de Glucosa del Hígado - Estimula la Síntesis de Lípidos - Estimula la Síntesis de Proteínas - Inhibe la Formación de cuerpos cetónicos	- Aumenta Glucogenogénesis - Estimula la captación y utilización de glucosa - Estimula la entrada de aminoácidos al músculo - Inhibe el catabolismo de proteínas. - Estimula la captación y utilización de cuerpos Cetonicos	- Estimula la captación y utilización de glucosa - Estimula la captación de ácidos grasos - Estimula la síntesis de triglicéridos - Favorece la acumulación de grasa en el adiposito

MECANISMO DE ACCIÓN

La insulina actúa sobre la membrana uniéndose a un receptor específico. Este receptor es una glicoproteína constituida por 2 subunidades α y β , unidas por enlaces covalentes de tipo disulfuro, para formar un heterodímero. ⁽⁶⁾ ⁽¹²⁾

La subunidad α se encarga del reconocimiento de la insulina. La subunidad β tiene una porción extracelular y otra intracelular. En la porción intracelular se reconocen 4 dominios: ⁽⁶⁾ ⁽¹²⁾

1. El Yuxtamembranoso que fosforila y une los substratos.
2. El Catalítico que se une a ATP.
3. El Dominio Rico en Tirosinas que regula la actividad cinasa y de autofosforilación.
4. El Dominio Carboxilo Terminal que puede fosforilarse.

El gen del receptor de la insulina tiene 22 exones y se localiza en el brazo corto del cromosoma 19. ⁽¹²⁾ La insulina ocasiona cambios estructurales y de fosforilación sobre su receptor, ocasionando luego una serie de fosforilaciones mediadas por proteínas sustrato de la insulina o “IRS”. ⁽¹²⁾

TRANSPORTE DE GLUCOSA

Hay 2 modelos fundamentales de transporte, uno es un transporte activo secundario asociado al transporte de sodio, que es el que proporciona la energía necesaria, este transporte está mediado por los SALT (*Sodium Dependent Glucose Transporters*) localizados en las células intestinales y las del túbulo renal. ^{(6) (11)}

El resto de células utiliza el sistema de transporte mediante difusión facilitada, mediada por los GLUT, que pertenecen a una familia de proteínas compuestas de 442 a 524 aminoácidos, con estructura secundaria plegada que cruza 12 veces la membrana celular.

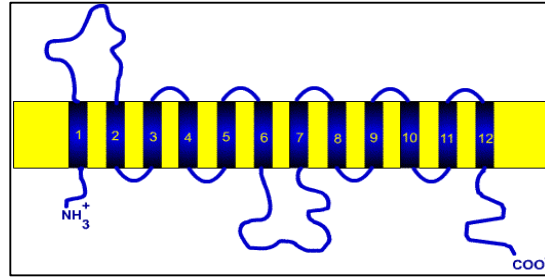


Fig. 1.4. Disposición Transmembranal de Receptores GLUT. ⁽¹⁰⁾

^{(6) (11)} (Fig. 1.4.)

Las células que dependen de insulina para captar glucosa tienen en su citoplasma un acervo de moléculas GLUT 4, las cuales en presencia de insulina se estimula su transporte a membrana celular. ^{(6) (11)}

RESISTENCIA A LA INSULINA

Se conoce bajo esta denominación una situación de insensibilidad de los tejidos (muscular, hepático o adiposo) a la acción de la insulina. El estado de resistencia a la insulina se acompaña de hipersecreción compensadora, que ocasiona que los valores circulantes de la hormona sean mayores a lo normal (hiperinsulinismo). ^{(6) (7)} (Fig. 1.5.)

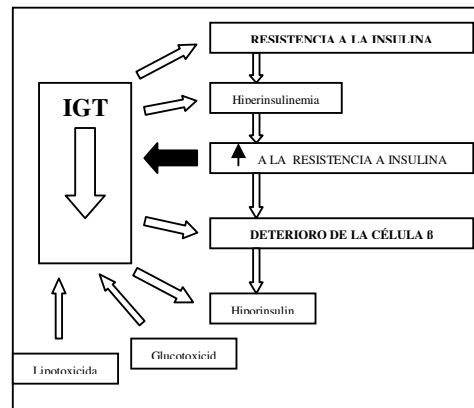


Fig. 1.5. Mecanismos de Resistencia a la Insulina ⁽¹³⁾

El estado de resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia resultante afecta

numerosos parámetros. La incapacidad de metabolizar la glucosa puede ocasionar intolerancia a la glucosa y diabetes; de hecho, la mayor parte de diabéticos tipo 2 llega a desarrollar la enfermedad tras varios años de resistencia a la insulina no diagnosticada. La hiperinsulinemia favorece la hipertensión diastólica y obesidad favoreciendo la formación de ateromas, lo que en conjunto se conoce como “Síndrome Metabólico”. ⁽⁷⁾

DIABETES MELLITUS

DEFINICIÓN

La Diabetes es una enfermedad sistémica, crónico-degenerativa, con grados variables de predisposición hereditaria. ⁽¹⁴⁾ Se caracteriza por hiperglicemia como resultado de defectos en la secreción, acción de insulina o ambas. ⁽¹⁵⁾ La hiperglicemia crónica de la diabetes afecta al metabolismo intermedio de carbohidratos, lípidos y grasas asociado a daño a largo plazo, disfunción y fallo de varios órganos especialmente los ojos, riñones, sistema nervioso, corazón y vasos sanguíneos. ⁽¹⁴⁾

CLASIFICACIÓN

La diabetes se ha dividido en 2 grandes grupos respecto a la administración de insulina, los pacientes insulino-dependientes y los no insulino-dependientes. La ambigüedad de esta clasificación propició que en 1997 se propusiera una nueva clasificación que incluye 4 entidades, considerando como base la etiología de la afección. ⁽¹⁴⁾ (Cuadro. 2.0.)

DIABETES MELLITUS TIPO I (DMT1)

Llamada también “*Diabetes Mellitus Insulino Dependiente*” o denominada anteriormente como “*Diabetes Juvenil*” ya que la aparición de este tipo de diabetes por general se da en edades inferiores a los 14 años. ^{(14) (15)}

Es un desorden de la homeostasis de la glucosa caracterizado por la susceptibilidad a la cetoacidosis en ausencia de insulina terapia. Genéticamente es una enfermedad autoinmune heterogénea que resulta de la destrucción de las células β pancreáticas. ⁽¹⁶⁾

DIABETES MELLITUS TIPO 2 (DMT2)

Es mucho más común que la de DMT1, contando con el 90 – 95 % de todos los casos de Diabetes Mellitus, por lo general la edad de aparición de esta diabetes ocurre entre los 50 y 60 años siendo una enfermedad de desarrollo gradual manifestándose inicialmente con insulina resistencia y luego con insulina deficiencia. La obesidad, la

Cuadro. 2.0. Clasificación Etiológica de la Diabetes. ⁽¹⁴⁾

I.	Diabetes Mellitus Tipo I.
	A. Mediada por Mecanismos Inmunológicos.
	B. Idiopática.
II.	Diabetes Mellitus Tipo II.
III.	Otros Tipos Específicos.
	A. Defectos Genéticos de la Función de las Células β .
	1. Cromosoma 12, HNF-1 α (MODY 3)
	2. Cromosoma 7, Glucocinasa. (MODY 2)
	3. Cromosoma 20, HNF-4 α (MODY 1)
	4. Cromosoma 13, Factor Promotor de Insulina – IPF-1. (MODY 4)
	5. Cromosoma 17, HNF-1 β . (MODY 5)
	6. Cromosoma 2, <i>NeuroD1</i> . (MODY 6)
	7. DNA Mitocondrial.
	8. Otros.
	B. Defectos Genéticos en la Acción de la Insulina.
	1. Resistencia a la Insulina Tipo A.
	2. Leprechaunismo.
	3. Síndrome de Rabson-Mendenhall.
	4. Diabetes Lipoatrófica.
	5. Otros
	C. Enfermedades del Páncreas Exócrino
	1. Pancreatitis.
	2. Trauma/Pancreatomía.
	3. Neoplasia.
	4. Pancreopatía Fibrocalculosa.
	5. Fibrosis Quística.
	6. Hemocromatosis.
	7. Otros.
	D. Endocrinopatías.
	1. Aldosteronoma.
	2. Síndrome de Cushing.
	3. Hipertiroidismo.
	4. Glucagonoma.
	5. Somatostinoma.
	6. Acromegalia.
	7. Otros.
	E. Inducido por Drogas o Químicamente.
	1. Vacor.
	2. Pentamidina.
	3. Ácido Nicotínico.
	4. Glucocorticoides.
	5. Hormona Tiroidea.
	6. Diaxozida.
	7. Agonistas β Adrenérgicos.
	8. Tiazidas.
	9. Dilantina.
	10. Interferón α .
	11. Otros.
	F. Infecciones.
	1. Rubéola Congénita.
	2. Citomegalovirus.
	3. Otros.
	G. Mediada por Formas no Comunes de Inmunidad.
	1. Síndrome de Stiff-man.
	2. Anticuerpos anti-receptor de Insulina.
	3. Otros.
	H. Otros Síntomas Genéticos Asociados con Diabetes.
	1. Síndrome de Down.
	2. Síndrome de Klinefelter.
	3. Síndrome de Turner.
	4. Ataxia de Friedreich.
	5. Síndrome de Wolframs.
	6. Síndrome de Prader Willi.
	7. Púrpura.
	8. Otros.
IV.	Diabetes Mellitus Gestacional. (DMG)

DMT2, asociándose a una hiperinsulinemia, en insulina resistencia y el síndrome metabólico, por lo general conlleva al desarrollo de respuesta de las células pancreáticas por la disminución de la sensibilidad del tejido blanco al efecto metabólico de la insulina, una condición referida como “*Insulino Resistencia*”.⁽¹⁴⁾

Un decremento de la sensibilidad a la insulina conduce a una disminución del almacenamiento y utilización de glucosa conllevando a la elevación de la misma estimulando a la compensación secretoria de insulina. Este es un proceso gradual y por lo general coincide con la ganancia de peso y obesidad.⁽¹⁵⁾

CRITERIOS DE DIAGNÓSTICO

Para el diagnóstico preciso, además de evaluar los síntomas clínicos característicos, es necesario apoyarse en el análisis químico de los niveles de glucosa en sangre. Como los síntomas de la diabetes no son obvios inmediatamente, el diagnóstico puede estar precedido por un extenso período de deterioro en la tolerancia a la glucosa, lo que resulta en disfunciones de las células pancreáticas y complicaciones micro y macrovasculares. (Cuadro. 2.1.)^{(6) (14)}

Cuadro. 2.1. Criterio para el Diagnóstico de Diabetes Mellitus. ^{(6) (14)}

I.	Síntomas de diabetes más una glucosa plasmática casual de ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L). Casual se define como cualquier momento del día sin importar el tiempo desde la última comida. Los síntomas clásicos de diabetes incluyen poliuria, polidipsia y pérdida inexplicable de peso.
II.	Prueba de Glucosa en Ayunas ≥ 126 mg/dL (7.0 mmol/L) Ayuno se define como la no ingesta calórica por lo menos durante las últimas 8 horas.
III.	Glucosa 2 horas luego Poscarga ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L) durante una Prueba de Tolerancia a la Glucosa Oral. La prueba debería ser realizada como la describe la OMS, usando una carga de glucosa que contenga el equivalente a 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua.

FACTORES DE RIESGO.

Existen una serie de factores de riesgo que incrementan dramáticamente la posibilidad de desarrollo de la Diabetes Mellitus tipo 2, entre las cuales destacan:⁽¹⁷⁾

FACTORES DEMOGRÁFICOS

- a. **Edad:** Al incrementar la edad incrementan los pacientes con diabetes tipo 2.⁽¹⁷⁾
- b. **Sexo:** La frecuencia es mayor en las mujeres México-americanas (10.9 %) que en los hombres México-americanos. (7.7 %)⁽¹⁷⁾

- c. **Raza** Las personas de origen hispano tienen de 2 a 3 veces mayor riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 que las personas de origen caucásico. ⁽¹⁷⁾

ESTILO DE VIDA

- a. **Obesidad:** Alrededor de un 80% de los pacientes con diabetes tipo 2 son obesos. El mayor riesgo de diabetes se asocia a la obesidad central o troncal en la que la grasa se deposita a nivel subcutáneo (debajo de la piel) e intraabdominal (entre las vísceras). Esta grasa se puede evaluar con la medición de la circunferencia a nivel de la cintura en centímetros. *“En hombres no debe ser mayor a 102 cm y en mujeres no mayor de 88 cm.”* ⁽¹⁷⁾
- b. **Historia Familiar de Diabetes:** Las personas con una historia familiar de diabetes (ambos padres con diabetes tipo 2) se hacen más resistentes a la acción de la insulina a medida que aumenta el peso corporal que los que no tienen historia familiar de diabetes tipo 2. ⁽¹⁷⁾
- c. **Inactividad Física.** La actividad física disminuye el riesgo de presentar diabetes tipo 2. El efecto protector del ejercicio está en la prevención de la resistencia a la acción de la insulina, y produciendo una mejor acción de la insulina en los tejidos muscular, adiposo y hepático. ⁽¹⁷⁾
- d. **Dieta.** La ingesta de calorías, los componentes de la alimentación tales como hidratos de carbono y grasas son factores que influyen en el incremento de peso y desarrollo de diabetes tipo 2. ⁽¹⁷⁾
- e. **Tabaquismo.** Estudios sobre el efecto agudo del fumar sobre la tolerancia a la glucosa demuestran que la respuesta metabólica en una prueba con carga de glucosa se altera, dando mayor incremento de glucosa en la sangre. ⁽¹⁷⁾
- f. **Urbanización.** Ciertos cambios en el estilo de vida en un grupo de población susceptible, pueden incrementar el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2. ⁽¹⁷⁾

CLÍNICA GENERAL DE LA DIABETES MELLITUS

Clínicamente se distinguen una forma aguda y otra lenta. La forma aguda es típica de la DMT1 no siendo infrecuente su comienzo con cetoacidosis grave. Estos pacientes cursan con un período de adelgazamiento, poliuria, sed y malestar general. ⁽⁶⁾

El comienzo lento es típico de la DMT2 en el adulto que no necesita insulina; por lo general resiste durante muchos años sin sentir la necesidad de consultar e iniciar tratamiento. ⁽⁶⁾

SIGNOS Y SÍNTOMAS.

1. *Poliuria*, consiste en el exceso de orina en las 24 horas del día. ⁽¹⁷⁾
2. *Polidipsia* o exceso de sed, surge para compensar la poliuria. ⁽¹⁷⁾
3. *Polifagia*, consiste en el aumento de apetito especialmente alimentos hidrocarbonatados, con objeto de compensar las pérdidas urinarias de glucosa. ⁽¹⁷⁾
4. *Adelgazamiento*, típico de la DMT1 (niños y a adultos) producida por la ineficacia del metabolismo glucídico, proteico y graso. ⁽¹⁷⁾
5. *Astenia* es un síntoma de malestar general producido por el defecto metabólico generalizado a causa de la falta o ineficaz acción de la insulina que es la principal hormona anabólica. ⁽¹⁷⁾

El *Prurito* es mas frecuente en la DMT2, por que esta facilitado por la hiperglucemia a nivel cutáneo y necesita tiempo para su instauración clínica. ⁽¹⁷⁾

La *Tendencia a Infecciones* no suele incluirse entre los síntomas cardinales, pero es frecuente, manifestándose con forúnculos, flemones, orzuelos, etc. ⁽¹⁷⁾

Por otro lado se dice que la diabetes *Retraza la Cicatrización de Heridas* aun cuando no hay estudios científicos que corroboren esta aseveración. ⁽¹⁷⁾

CLÍNICA POR SISTEMAS Y APARATOS.

- a. **Aparato Digestivo:** Se manifiesta con sequedad de boca y faringe, puede haber gingivitis, paradontitis y flemones dentarios, causas que provocan la caída de las piezas dentarias. Existen alteraciones en la motilidad del esófago, nauseas, vómitos y dolores epigástricos, afección neuropática del intestino delgado, que suele traducirse con diarreas nocturnas y diurnas. Puede llegar a presentar hígado graso así como hepatomegalia. ^{(17) (18)}
- b. **Aparato Respiratorio:** Facilita la proliferación de todo tipo de infecciones entre las mas frecuentes tenemos bronconeumonía y neumonía. ^{(17) (18)}
- c. **Aparato Cardiovascular:** El corazón puede afectarse por miocardiopatía y arritmia así como con coronariopatía. ^{(17) (18)}

La aterosclerosis a nivel cerebral se traduce en trombosis y hemorragias y otros accidentes isquémicos.

- d. Sistema Nervioso:** Puede afectar el cerebro, médula, las raíces y los propios nervios periféricos. Se afecta el sistema somático con síntomas como polineuropatía en miembros inferiores. ^{(17) (18)}
- e. Nefrourología:** La microangiopatía diabética tiene su expresión mas clara a nivel renal como gloméruloesclerosis. La clínica renal es progresiva hacia la insuficiencia renal terminal. Puede presentarse cistitis, prostatitis y uretritis, incluso abscesos de próstata y perineales. ^{(17) (18)}
- f. Oftalmología:** A nivel del iris puede verse despigmentaciones. Hay que vigilar la posibilidad de glaucoma. El cristalino presenta cataratas con más frecuencia y en edades más jóvenes que en los no diabéticos. ^{(17) (18)}

Por otro lado pueden existir infecciones palpebrales, blefaritis y orzuelos, parálisis oculomotoras (III, IV o VI par) suelen ser reversibles, y neuritis óptica, que suele ser rara. ^{(17) (18)}

La Retinopatía diabética es una de las complicaciones más preponderantes en estos pacientes. ^{(17) (18)}

- g. Otorrinolaringología:** Por la tendencia a las infecciones son frecuentes y recidivantes las sinusitis y otitis, algunas otitis son especialmente graves como la otitis maligna por *Pseudomona aeruginosa*. ^{(17) (18)}
- h. Lesiones Dérmicas:** Las lesiones son sumamente diversas entre las cuales destaca: ^{(17) (18)}
- Maculas diabéticas, *byllosis diabeticorum* localizadas preferentemente en piernas.
 - *Necrobiosis lipoidica diabeticorum*, de color amarillo en la zona de muslos.
 - Paniculitis relacionada con el *Estreptococo β hemolítico* de grupo A.
 - Necrosis superficiales primordialmente en pie.
 - Los Xantomas cutáneos y xantelasmas palpebrales, se relacionan con la hipercolesterolemia acompañante a esta patología.
- i. Sistema Osteoarticular:** La DMT1 afecta preferentemente a la columna vertebral, en la reabsorción ósea normal con osteogénesis defectuosa, relacionada con el déficit de insulina y de IGF-1. ^{(17) (18)}
- j. Pie Diabético:** Constituye una entidad compleja por su rica patología en virtud de una multiplicidad de factores micro y macrovasculares

neuropáticos, infecciosos, osteoarticulares y factores mecánicos. Se producen heridas infectadas, uñas incarnatas, rozaduras por zapato, micosis, gangrena seca o húmeda de uno o varios dedos de todo el pie. ^{(17) (18)}

COMAS EN EL DIABÉTICO

El paciente diabético, como cualquier otra persona, puede presentar comas de diversa índole, como el hepático, renal, por intoxicaciones, o particularmente el cerebrovascular por su mayor tendencia a la aterosclerosis, pero además puede presentar otros especialmente relacionados con la propia diabetes como el cetoacidótico, hiperosmolar o el láctico. ⁽¹⁷⁾

DIABETES Y OTRAS ALTERACIONES HORMONALES

Entre los pacientes con DMT1 no resulta infrecuente la enfermedad tiroidea autoinmune con expresión asintomática. ⁽¹⁷⁾

Con respecto a la función testicular, la diabetes disminuye la población de células de Leydig y su producción de testosterona. ⁽¹⁷⁾

El Síndrome de ovario poliquístico (SOPO) suele asociarse a resistencia insulínica, siendo discutible su relación o no al aumento de andrógenos. ⁽¹⁷⁾

En la DMT1, la deficiencia de insulina se traduce en un déficit de aporte de insulina al hígado con déficit de IGF-1, con resistencia a la acción de GH. ⁽¹⁷⁾

Respecto al hiperparatiroidismo primario, existe una mayor prevalencia en diabéticos, primariamente mujeres. ⁽¹⁷⁾

La vasopresina (ADH) suele elevarse en relación con la poliuria de la DMT descompensada, limitando así la necesidad de ingesta de agua. ⁽¹⁷⁾

DIABETES MODY

DEFINICIÓN

Hace más de 70 años se descubrió una forma de diabetes que aparece en personas jóvenes y se hereda con un patrón autosómico dominante. Varias décadas después *Fajans* y *Tattersall* acuñaron el término “*Maturity onset Diabetes of the Young*” y progresivamente definieron de un modo específico este subtipo de diabetes de acuerdo a los siguientes criterios: ⁽¹⁹⁾

1. Aparición antes de los 25 años.
2. Herencia Autosómica Dominante.
3. Penetrancia Elevada.
4. Inicialmente sin evidencia de déficit grave de insulina.

En los años 90, se identificaron los principales genes que albergaban las mutaciones relacionadas con diabetes MODY, lo que se reveló en realidad es que era un defecto heterogéneo. ⁽¹⁹⁾

El primer gen que se postuló como candidato a MODY fue el que codifica la enzima glucolítica “*Glucocinasa*” (MODY 2). Este subtipo de MODY cursa con hiperglicemia leve y condiciona una predisposición a la diabetes gestacional. Posteriormente *Bell* y *Froguel*, determinaron 2 *loci* genéticos que segregaban con una forma mucho más grave de diabetes en familias MODY, denominados posteriormente MODY 1 y 3, se realizó un estudio exhaustivo y se concluyó que eran mutaciones casuales en factores nucleares de hepatocito 4 α y 1 α (HNF-4 α y HNF-1 α) respectivamente. ⁽¹⁹⁾

Sin embargo, el fenotipo de MODY 1 y 3 consiste en una disminución de la secreción de insulina inducida por glucosa, lo cual claramente indica que *HNF-4 α* y *HNF-1 α* tienen un papel previamente no sospechado en la función de las células β . Poco después se identificaron otros 3 reguladores transcripcionales implicados en la diabetes tipo MODY, el factor 1 promotor de la insulina (*IPF-1*; *PDX1/IDX1*), *HNF-1 β* (MODY

5) y el factor 1 de diferenciación neurogénica (*Neuro-D1/B2*) (MODY 6). La **Tabla 3.0.** muestra los genes MODY identificados a la fecha: ⁽¹⁹⁾

Tabla. 3.0. Genes responsables del fenotipo MODY y las características asociadas a sus mutaciones. ^{(19) (20)}

	Gen	Efecto de las Mutaciones	Fenotipo Clínico
MODY 1	HNF-4 α (20q12-q13.1) 29 mutaciones reportadas.	Alteración en síntesis y secreción de insulina.	Hiperglicemia severa, frecuente requerimiento de insulina, nefropatía, retinopatía.
MODY 2	Glucocinasa (7p15-p13) Más de 80 mutaciones reportadas.	Alteración en la secreción de insulina.	Hiperglicemia moderada, control con hipoglucemiantes y dieta.
MODY 3	HNF-1 α (12q24.2) Más de 50 mutaciones reportadas.	Alteración en síntesis y secreción de insulina.	Hiperglicemia severa, requerimiento de insulina, nefropatía asociada.
MODY 4	IPF-1 (13q12.1) 2 mutaciones reportadas.	Alteración en síntesis y secreción de insulina. Retraso en el desarrollo del páncreas.	Hiperglicemia moderada, control con hipoglucemiantes, eventual requerimiento de insulina.
MODY 5	HNF-1 β (17q21.3) 3 mutaciones reportadas.	Alteración en la síntesis y secreción de insulina.	Hiperglicemia severa, frecuente requerimiento de insulina, nefropatía asociada.
MODY 6	NeuroD1/Beta2 (2q32) 2 mutaciones reportadas.	Alteración en la secreción de insulina.	Hiperglicemia moderada o severa.

EL FACTOR NUCLEAR HEPÁTICO 4 α

Como tal, esta relacionada con diabetes tipo MODY, y es autosómica dominante de aparición temprana mucho menos frecuente que la MODY 3 e indistinguible de la misma a excepción de la reducción de las concentraciones de apolipoproteínas AII y CIII y triglicéridos, mientras que en MODY 3, disminuye la apolipoproteína M. ^{(19) (20)}

HNF-4 α , es miembro de la súper familia de receptores nucleares siendo un receptor tiroideo – esteroideo. ⁽²³⁾ Así es un receptor para glucocorticoides que regula y coactiva proteínas y receptores, así como otras funciones sobre páncreas y tejido adiposo, hígado, riñón e intestino. ⁽²⁶⁾ Muchos receptores nucleares de esta familia están sujetos a la regulación de hormonas o metabolitos, pero hasta ahora no se ha descrito de forma concluyente un ligando para HNF-4 α por lo que se ha descrito como un “*Receptor Huérfano*”. Se ha observado que el dominio de unión al ligando de esta proteína está ocupado por ácidos grasos, sin embargo éstos podrían corresponder a un componente constitutivo capaz de regular de forma aguda su función. ⁽²⁰⁾

HNF-4 α , controla la expresión de HNF-1 α en células hepáticas y endodermo, y existe evidencia genética humana, mencionada anteriormente que apoya que esto es así en los islotes pancreáticos, así como la expresión de otros genes involucrados en el desarrollo y función pancreática. ⁽²⁰⁾

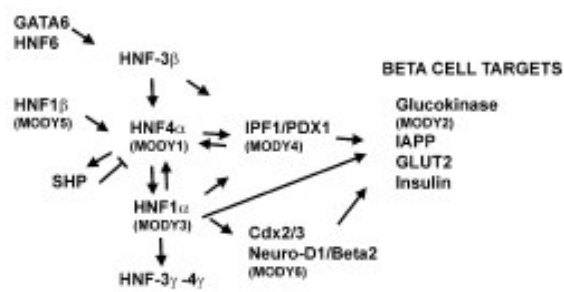


Fig. 3.0. Red de Factores de Trascricpción en célula β pancreática. ⁽²⁰⁾

En ratones *HNF-1 α* es, a su vez, necesario para la expresión de HNF-4 α , aunque esto solo ocurre en los islotes pancreáticos. Esto se debe a que en los islotes pancreáticos existe un promotor alternativo de HNF-4 α , denominado “P” que confiere dependencia de HNF-1 α . ⁽¹⁹⁾

La proteína codificada por este gen, es un factor de transcripción nuclear el cual se une al DNA como un homodímero. La proteína codificada, controla la expresión de varios genes y juega un papel importante en el desarrollo del hígado, riñón e intestinos. ^{(19) (20)}

GENERALIDADES

En lo referente al gen HNF-4 α tenemos la siguiente información: ^{(21) (22)} (Fig. 3.1.)

1. **Nombre:** Hepatocyte Nuclear Factor 4, alpha.
2. **Tipo de Gen:** Codifica Proteínas.
3. **Cromosoma:** 20.
4. **Localización:** q12-q13.1
5. **Estructura:**
 - a. **Exónes:** 11.
 - b. **Tamaño:** 30.106 bases.
 - c. **Orientación:** Plus strand.
6. **mRNA:** 3.239 pb.
7. **Proteína:** Su peso es de 51.7 KD, formada por 465 aminoácidos.

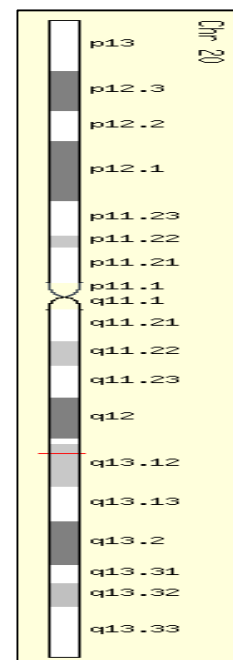


Fig. 3.1. Localización del gen HNF-4 α en el cromosoma 20. ⁽²²⁾

8. Expresión: Se expresa en Órganos del Sistema Digestivo (Intestino e Hígado), Sistema Endocrino (Páncreas), Sistema Respiratorio (Bronquios y Pulmones) y Sistema Urinario (Riñón). Por otro lado se encuentra en tejido Epitelial (Secretor – Glandular – Endocrino). Esta relacionado directamente con células Endocrinas (Células α y β Pancreáticas) y células epiteliales. A nivel intracelular, actúa en núcleo, cromatina y cromosoma. A la vez, estudios relacionan su expresión en ovario y parte externa del aparato genital. ⁽²⁰⁾ (Fig. 3.2.)

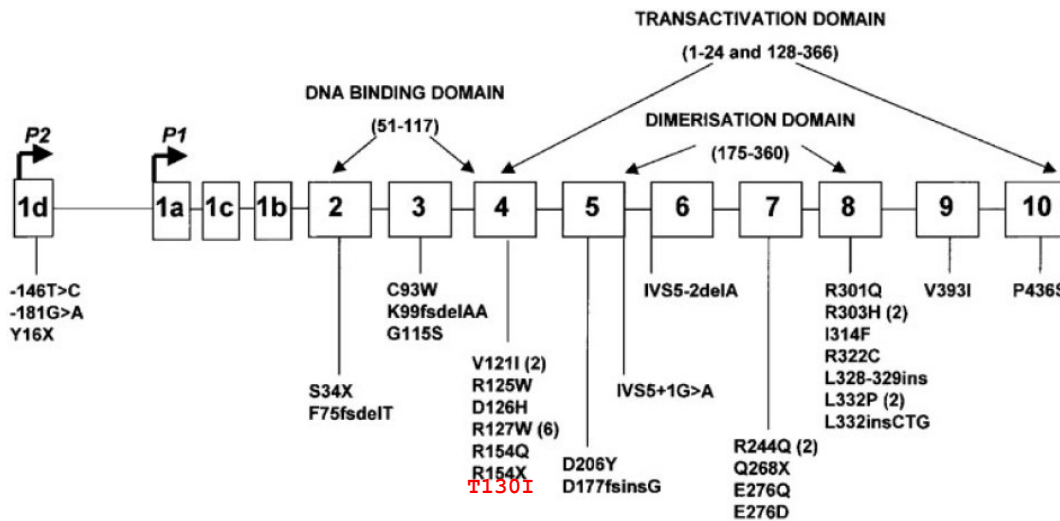


Fig. 3.2. Localización de las Mutaciones Reportadas sobre la Región Codante del gen HNF-4 α . ⁽²⁴⁾ ⁽²⁵⁾

Mutaciones en este gen están asociadas con el desarrollo progresivo en la hiperglicemia, y de igual manera una disminución progresiva en la producción y secreción de la insulina, con un deterioro progresivo de las células β . Los GLUT 2, se ven alterados por mutaciones en este gen, y por tanto también el “*Aparato Sensor de la Glucosa*”. HNF-4 α regula la expresión de genes mitocondriales que interviene en las vías metabólicas de carbohidratos, proteínas lípidos por lo cual se halla directamente involucrado en el metabolismo del colesterol y de los ácidos grasos. ⁽²⁴⁾ ⁽²⁵⁾

Estudios en el Reino Unido, asocian mutaciones en este gen con la mayor prevalencia de eventos macrovasculares, así como una aparición de hiperglicemia en adolescentes y en adultos jóvenes. ⁽²⁰⁾ HNF-4 α regula canales de ATP dependientes de K⁺ e insulina en la células β . Kir6.2 es un blanco transcripcional de HNF-4 α y sin este, su expresión en células β ahondaría en una secreción de insulina inadecuada. ⁽²²⁾

FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Llamados también “*Factores de Inicio de la Transcripción*”, y son proteínas que intervienen en la regulación de la transcripción, sea reprimiéndola o potenciándola. En tal virtud, éstas actuarán sobre segmentos específicos de DNA, sobre los cuales ejercerá su efecto. ^{(7) (23) (24)}

Los factores de transcripción están formados por diferentes dominios: ⁽²⁴⁾

1. **Dominio de Unión al DNA:** Que reconoce y se une a secuencias de DNA que actúan de manera proximal.
2. **Dominio de Transactivación:** Que se encarga de activar la transcripción.
3. **Dominio de Unión al Ligando:** Se une al factor desencadenante de la transcripción, que en muchos de los casos no se conoce por lo que reciben el nombre de “*Receptores Huérfanos*”.
4. **Dominio de Dimerización:** Permite que los factores transcripcionales puedan agruparse como dímeros, aunque no todos los factores los presentan.

Existen distintos motivos que explican como estos factores de transcripción tiene su efecto sobre el DNA, y pueden clasificarse en varias familias estructurales, entre los cuales tenemos: ^{(7) (23) (24)} (Fig. 3.3.)

- a. **Motivo Hélice-Giro-Hélice:** Compromete al menos 20 residuos de aminoácidos en 2 segmentos cortos de hélice α cada 7 a 9 residuos, separada por un giro β . Esta estructura no es estable por si misma, estabilizándose con un segmento largo de dominio de unión al DNA. ⁽²⁵⁾
- b. **Motivo Hélice-Bucle-Hélice:** Consta de 2 segmentos de hélice α , con un péptido interlasante de mayor tamaño, dotando a este motivo de mayor flexibilidad. ⁽²⁶⁾
- c. **Motivo Homeodominio:** Se puede considerar como una ampliación del motivo Hélice – Giro – Hélice con un tercer tramo con estructura de hélice α que sale de una región sin estructura secundaria definida que interacciona directamente con el DNA. ⁽²⁷⁾

- d. Dedos de Zinc:** Cerca de 30 residuos de aminoácidos dan un giro largo que se sostienen juntos por un solo ion Zn^{2+} , el cual es coordinado por 4 residuos (4 cisteínas o 2 Cisteínas y 2 Histidinas). El Zinc no interactúa por sí solo con el DNA, al contrario, la coordinación lograda por este permite que los residuos de aminoácidos estabilicen esta pequeña estructura de motivo. ⁽²⁸⁾
- e. Cierres de Leucina:** Es un motivo anfipático de α hélice con una serie de residuos de aminoácidos hidrofóbicos en la superficie del área de contacto entre los 2 polipéptidos de un dímero. El dominio de unión al DNA tiene gran cantidad de lisina o arginina, que pueden interactuar con los fosfatos negativamente cargados del DNA. ^{(29) (30)}

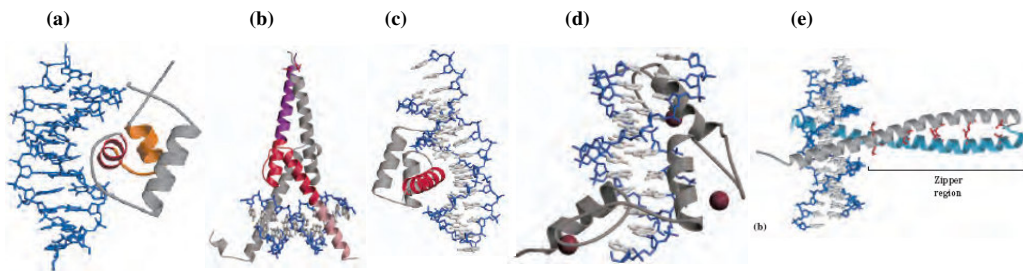


Fig. 3.3. Factores de Transcripción. ⁽⁷⁾

POLIMORFISMO GENÉTICO

Refiere a una serie de fenotipos alternativos normales y comunes. El polimorfismo, en el sentido estricto, se refiere a la frecuencia de múltiples alelos en un locus, donde al menos 2 alelos aparecen con una frecuencia mayor al 1 % en la población general. ⁽³¹⁾

La mayoría de los polimorfismo no tienen efecto sobre el fenotipo, caen sobre regiones no codantes, algunos pocos afectan el fenotipo, y un número muy pequeño, son responsables de enfermedades genéticas. ⁽³¹⁾

A nivel molecular, pueden existir codones polimórficos con variaciones en la secuencia codificante. ⁽³¹⁾

DIABETES MELLITUS TIPO 2 Y *HNF-4α*

La proteína *HNF-4α* es un factor de transcripción que actúa sobre el DNA mediante dedos de Zinc que estabiliza la molécula y participa en la regulación de la expresión de muchos genes. ⁽³²⁾

Estudios de asociación, vinculan a este gen con un mayor riesgo de desarrollo de DMT2, como un factor de susceptibilidad que incrementa la probabilidad de padecer esta enfermedad. ^{(33) (34)}

T130I

En lo referente la mutación T130I existe una substitución de una citosina por una timina (ACT – ATT) en el codón 130 del gen HNF-4 α dando lugar a un cambio de una treonina por una isoleucina en la proteína, observándose una pérdida de la actividad de un 30 – 40 % aproximadamente. ⁽³⁶⁾

La mutación T130I afecta al dominio de unión al DNA que resulta en una disminución en la función de transactivación de la proteína disminuyendo su actividad; una treonina, del residuo en la posición, es conservada en humanos, ratón y *Xenopus*. Esta mutación se puede encontrar del 0 – 5 % de la población, así pues la variante sola no causa diabetes tipo MODY. ^{(35) (36) (37) (39) (36)} La variante T130I esta presente en diferentes poblaciones entre las cuales se encuentran: (Cuadro. 3.1.)

Cuadro. 3.1. Prevalencia de Polimorfismo T130I. ^{(36) (40) (41) (60)}

País	Diabéticos	No Diabéticos
EUA	N/D	5.0 %
Dinamarca	8.2 %	6.6 %
China	0 %	7.8 %
Japón	3.5 %	0.8 %
México	16 %	5.6 %

El mecanismo de conducción a la diabetes en páncreas no está conocido, pero en ratones knockout ocasionó alteraciones como disminución de las HDL-C y disminución de triglicéridos. ⁽³⁴⁾

La treonina en el codón 130 puede ser fosforilada por la “*Protein Kinase b*” y esta fosforilación puede afectar su unión al DNA, alternatively, podrían existir proteínas que inhiben la unión de los mutantes T130I que conlleva al desarrollo de DMT2, por lo que la evaluación de esta mutación es indicativo de un SNP responsable solo o en conjunto de esta enfermedad en diferentes poblaciones. ^{(36) (37) (39)}

JUSTIFICACIÓN

Existe evidencia suficiente que asocia el polimorfismo T130I del gen HNF-4 α con el desarrollo de *Diabetes Mellitus tipo 2*. Por lo que, la presencia de esta mutación pudiera conferir un factor de susceptibilidad al desarrollo de esta enfermedad.

En América Latina la mutación T130I del gen HNF-4 α solamente se ha explorado en población mexicana. En esta población se ha la a asociado con el desarrollo de diabetes de inicio temprano en población mestiza.

Dado a que se desconoce la prevalencia de la mutación T130I del gen HNF-4 α en población ecuatoriana, se procedió en primera instancia al escrutinio de esta variante en población mestiza no diabética, a fin de obtener una panorámica más clara de la frecuencia de la variante génica en esta población, lo cual dará las bases para relacionar esta variante con el desarrollo de diabetes en la población del Ecuador; y de igual manera, comprender mejor las bases moleculares que rigen esta enfermedad sobre América Latina.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la presencia de la mutación T130I del gen HNF-4 α en población mestiza ecuatoriana.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la prevalencia de la mutación T130I del gen HNF-4 α en una muestra de población mestiza Ecuatoriana.
- Asociar la influencia de la mutación T130I del gen HNF-4 α con antropométricos, bioquímicos y hormonales de las personas evaluadas.

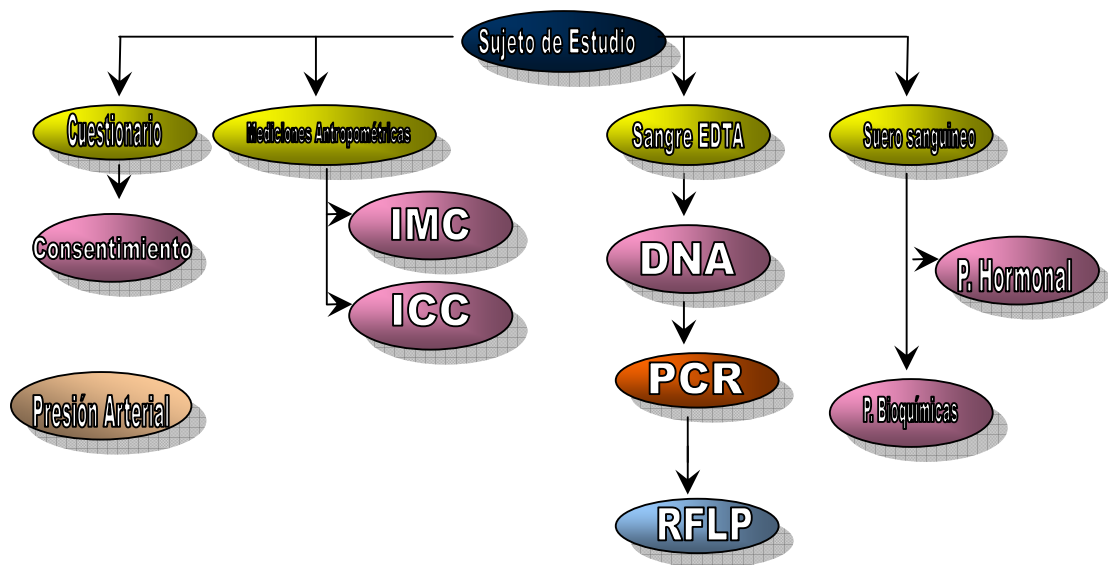
HIPÓTESIS

- Debido a que en América latina existe alta susceptibilidad al desarrollo de Diabetes Mellitus, es probable que se encuentren las mismas variantes diabetogénicas como la T130I del gen HNF-4 α en población ecuatoriana, pero con distinta prevalencia

MATERIALES Y MÉTODOS

La población de estudio fue homogénea, en función de sus niveles socio-económico y culturales, teniendo una ascendencia Ecuatoriana de más de cinco generaciones. Todos los participantes fueron informados del propósito y objetivo de este estudio, firmando un consentimiento por escrito para participar en el mismo. A la vez se fijó una población mínima de 25 individuos, los cuales son ecuatorianos, no diabéticos, no obesos y sin relación de parentesco entre sí que estudian en la ciudad de México. (ANEXO A)

El protocolo de trabajo fue:



PROTOCOLO DE TRABAJO

ÍNDICE DE MASA CORPORAL (IMC)

Esta medición califica a la población dentro de parámetros de normopeso, sobrepeso y obesidad, y se calcula de la siguiente manera: ⁽⁶¹⁾

$$\text{IMC} = \frac{\text{Peso (Kg)}}{\text{Estatura (mts)}^2}$$

Interpretación: ⁽⁶¹⁾

Sobrepeso: 25.5 – 30

Obesidad: > 30

ÍNDICE CINTURA – CADERA (ICC)

Estima la cantidad de grasa abdominal, y se calcula de la siguiente manera: ⁽⁶²⁾

$$\text{IMC} = \frac{\text{Cintura (cm)}}{\text{Cadera (cm)}}$$

Interpretación: ⁽⁶²⁾

Mujeres: < 0.84
Hombres: < 0.93

PERFIL BIOQUÍMICO

El perfil bioquímico seleccionado consta de las siguientes pruebas:

GLUCOSA

La patología más común relacionada con el metabolismo de hidratos de carbono es la Diabetes Mellitus. El diagnóstico precoz y control de los pacientes diabéticos tiene por objeto evitar las complicaciones de los síntomas resultantes de la hiperglucemia. ⁽⁴²⁾

FUNDAMENTO

El esquema de la reacción es el siguiente: ⁽⁴²⁾



VALORES DE REFERENCIA

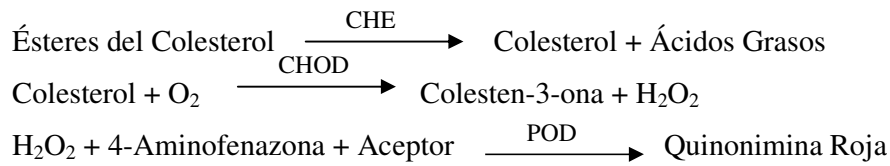
Suero o Plasma: 70 – 100 mg/dL. ⁽⁴²⁾

COLESTEROL

La determinación de colesterol en forma aislada tiene utilidad diagnóstica limitada y su concentración varía en un gran número de condiciones clínicas. El colesterol es uno de los factores contribuyentes al desarrollo de aterosclerosis. ⁽⁴³⁾

FUNDAMENTO

El esquema de la reacción es el siguiente: ⁽⁴³⁾



VALORES DE REFERENCIA

La NCEP (*National Cholesterol Education Program*) provee los siguientes valores para colesterol: ⁽⁴³⁾

Deseable: < 200 mg/dL.

Moderadamente alto: 200 – 239 mg/dL.

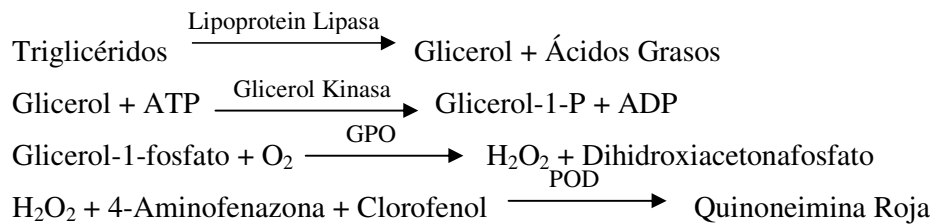
Elevado: $\geq$ 240 mg/dL.

TRIGLICÉRIDOS

Su medición es importante en el diagnóstico y manejo de las hiperlipidemias, que pueden ser de origen genético o secundarias a algunos tipos de patologías como la Diabetes Mellitus. ⁽⁴⁴⁾

FUNDAMENTO

El esquema de la reacción es el siguiente: ⁽⁴⁴⁾



VALORES DE REFERENCIA

La NCEP (*National Cholesterol Education Program*) provee los siguientes valores para triglicéridos: ⁽⁴⁴⁾

Deseable: < 150 mg/dL.

Moderadamente alto: 150 – 199 mg/dL.

Elevado: 200 – 499 mg/dL.

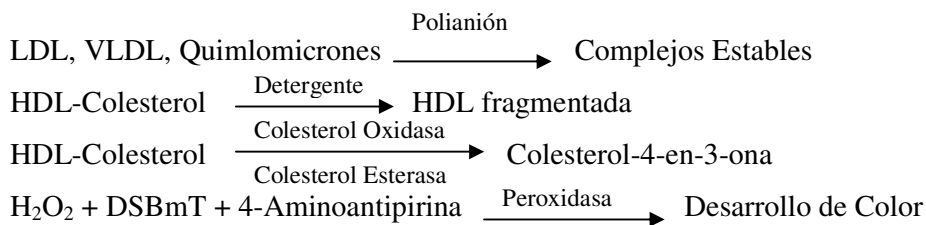
Muy Elevado: $\geq$ 500 mg/dL.

HDL-C

Las lipoproteínas plasmáticas son partículas esféricas que contienen cantidades variables de colesterol, triglicéridos, fosfolípidos y proteínas. La proporción relativa de proteína y lípido determina la densidad de estas lipoproteínas y provee las bases sobre la cual establecer la clasificación. ⁽⁴⁵⁾

FUNDAMENTO

Las HDL son selectivamente fragmentadas por un detergente específico y luego sometidas a la cuantificación con enzimas y un cromógeno como se muestra en el siguiente esquema: ⁽⁴⁵⁾



VALORES DE REFERENCIA

La NCEP (*National Cholesterol Education Program*) provee los siguientes valores para HDL-C: ⁽⁴⁵⁾

40 – 60 mg/dL.

LDL-C

El LDL-C se puede medir directamente, lo que no es usual normalmente el LDL-C se informa por cálculo de la fórmula de “*Friedwald*”, pero ésta no tiene validez cuando la concentración de triglicéridos supera los 400 mg/dL. La formula es: ⁽⁴⁶⁾

$$\text{LDL-C} = \text{Colesterol total} - \text{HDL-C} - \frac{\text{Triglicéridos}}{5}$$

VALORES DE REFERENCIA

La NCEP (*National Cholesterol Education Program*) provee los siguientes valores para HDL-C: ⁽⁴⁶⁾

Óptimo: < a 100 mg/dL

Aceptable: 110 – 129 mg/dL

Límite: 130 – 159 mg/dL

Alto: 160 – 189 mg/dL

Muy Alto: > 190 mg/dL

PERFIL HORMONAL

El perfil hormonal se fundamenta en la cuantificación sérica de insulina.

INSULINA

La insulina humana es una hormona polipeptídica encargada de la regulación del metabolismo de carbohidratos. Su cuantificación beneficia al diagnóstico, tratamiento y pronóstico de Diabetes Mellitus.

FUNDAMENTO

La metodología que se empleó para este analito fue la Quimioluminiscencia que se fundamenta en la emisión de luz por moléculas orgánicas en reacción de oxidación catalizada o no, los principales catalizadores son enzimas, iones o complejos metálicos.

Se emplea “*Fosfatasa Alcalina (ALP)*”, como marcador ya que per se no genera luz. El ALP rompe el grupo fosfato del sustrato “*Adamantil Dioxetano Fosfato*” que produce un compuesto inestable (*Fenoxido*) que al descomponerse emite luz a 420 nm. Es una reacción continua de más de 1 hora de duración, la obtenerse una señal amplificada para múltiples lecturas. Es preciso y sensible, detecta desde 1 zeptomol (1×10^{-21}).

VALORES DE REFERENCIA

Suero o Plasma: 6 – 27 μ UI/mL.

PRUEBAS MOLECULARES

EXTRACCIÓN DE DNA

La extracción de DNA que se realizó por “*Precipitación Salina*”. La técnica se basa en purificación de núcleos, solubilizando las membranas plasmáticas por medio de

Triton X 100 seguido de la lisis de los núcleos purificados con detergentes como SDS (Sulfato Dodecil de Sodio) y la digestión con proteinasa K precipitándose el DNA en etanol, al finalmente se determino la pureza y concentración, realizando lecturas a 260 y 280 nanómetros. ⁽⁴⁷⁾ (ANEXO B)

PCR

La “*Reacción en Cadena de la Polimerasa*” es un método enzimático de síntesis exponencial de regiones específicas de DNA in vitro, generándose millones de copias de un segmento de DNA. ^{(48) (49)}

La PCR trabaja usando una DNA polimerasa termoestable y fragmentos cortos de DNA llamados “*Oligonucleotidos*” que dirigen la síntesis de una región específica de DNA templado. La reacción de síntesis es repetida en numerosas veces llamándose a cada una de ellas como “*Ciclo*”. El Resultado es una “*Amplificación Exponencial*” de secuencias específicas de DNA. ^{(48) (49)} (Fig. 4.0.)

Al final de cada PCR, se confirma la amplificación con un corrimiento electroforético sobre un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio, frente a un marcador de peso molecular conocido (100 pares de bases). ^{(48) (49)} (ANEXO C)

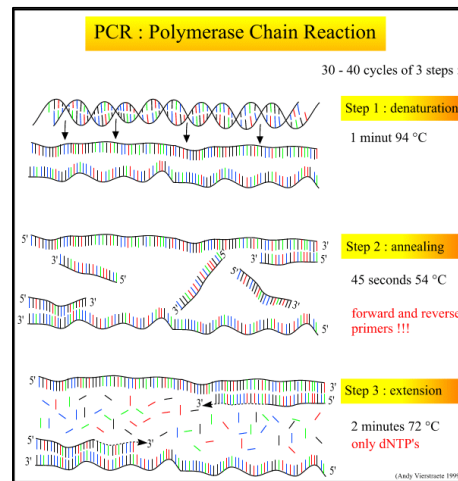


Fig. 4.0. PCR. ⁽⁴⁸⁾

RFLP

El Análisis Polimórfico de longitud de los Fragmentos de Restricción emplea enzimas que cortan el DNA en puntos precisos, produciendo una colección de fragmentos de longitud definida que pueden ser separados por electroforesis en función de su velocidad de migración, ya que los fragmentos de menor tamaño migrarán más rápidamente que los de mayor peso. ⁽⁵⁰⁾ (Fig. 4.1.)

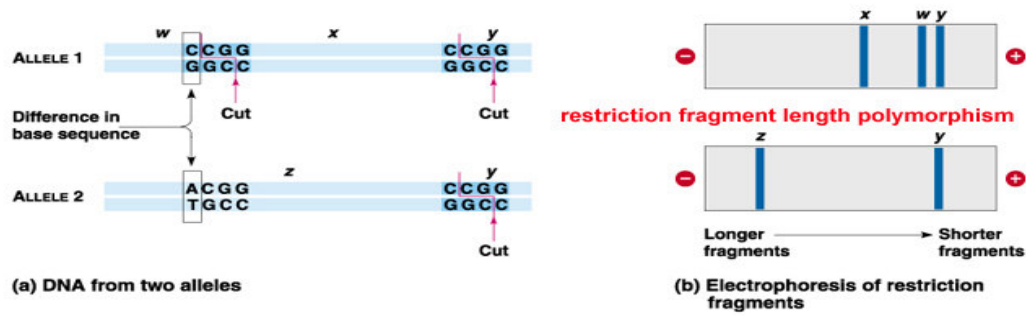


Fig. 4.1. Esquema de Acción de una Digestión Enzimática para RFLP. ⁽⁵¹⁾

La endonucleasa empleada para este análisis fue la Sfu I de Roche Diagnostics®, la cual reconoce la secuencia de DNA generada por la variante T130I, produciendo dos fragmentos, uno de 190 y otro de 81 pares de bases a partir de uno 271 pares de bases. (Fig. 4.2.) (ANEXO C)

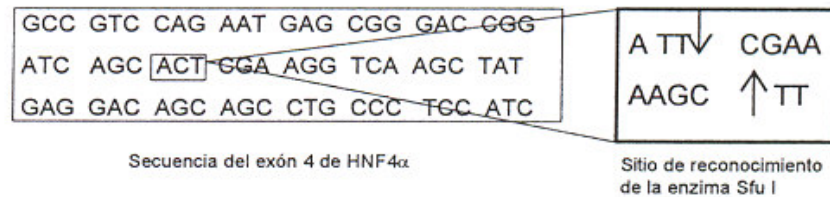


Fig. 4.2. Secuencia de reconocimiento para la endonucleasa Sfu I ⁽⁵²⁾

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

METODOLOGÍA

Para el análisis estadístico se emplearon los programas SPSS 13.0 ⁽⁵³⁾ ⁽⁵⁴⁾ y GraphPad Prism 4.0 ⁽⁵⁵⁾ para Windows considerándose una significancia mínima preestablecida de $p \leq 0.05$ con un intervalo de confianza del 95% para cada una de las mediciones que se han considerado en esta investigación.

RESULTADOS

El estudio estadístico se realizó en función de los parámetros considerados para la población de estudio, se obtuvo una edad promedio de 29.42 ± 4.93 años la cual esta conformada por un 46.4 % de integrantes masculinos ($n = 13$) y un 53.6 % ($n = 15$) de género femenino, considerándose una población total de estudio de 28. (Cuadro 5.0.)

**Cuadro 5.0. Datos Antropométricos y Perfil Bioquímico de la Población de estudio.
n = 28**

Parámetro	Valor Promedio $\pm$ Desviación Estándar	Valor de Referencia
Estatura (Mts)	1.66 ± 0.085	-
Peso (Kg)	64.93 ± 10.80	-
Cintura (cm)	82.42 ± 10.33	-
Cadera (cm)	99.32 ± 6.51	-
IMC/(Kg/m ²)	23.42 ± 2.89	Hombre: < a 25
	22.66 ± 2.40	Mujer: < a 25
ICC	0.87 ± 0.088	Hombre: < a 1.0
	0.81 ± 0.059	Mujer: < a 0.85
Tensión Arterial	120 ± 6.45	P. Sistólica: 100 – 140 mmHg. ⁽⁵⁶⁾
	80 ± 5.76	P. Diastólica: 60 – 90 mmHg. ⁽⁵⁶⁾
Glucosa [mg/dL]	83.50 ± 9.44	70 – 100 ⁽⁴²⁾
Colesterol [mg/dL]	187.54 ± 27.07	140 – 200 ⁽⁴³⁾
HDL-C [mg/dL]	44.10 ± 10.28	40 – 60 ⁽⁴⁵⁾
LDL-C [mg/dL]	118.93 ± 26.39	< 130 ⁽⁴⁶⁾
Triglicéridos [mg/dL]	122.39 ± 49.43	30 – 150 ⁽⁴⁴⁾
Insulina [μ UI/mL]	6.28 ± 3.76	6 – 27

En función al cuestionario aplicado, como herramienta estadística, se obtuvo una serie de tendencias centrales que cualifican los hábitos comportamentales de la población de estudio, así como sus antecedentes heredo-familiares de Diabetes Mellitus tipo 2. (Cuadro 5.1.)

El Cuadro 5.0 muestra cierta homogeneidad de la población de estudio en función de su estilo de vida, por lo tanto, se debe aclarar que el 39.3 % de la población, ha sido sometida a cirugías de menor envergadura, tales como rinoplastias, apendicectomías, cesáreas entre otras. Por otro lado, el 42.9 % de la población declaró que no realiza ningún tipo de actividad física en particular, y entre aquellos que declararon tener una actividad física frecuente, la caminata con un 28.9 % es la mas común de éstas.

	Frecuencia
Consumo de Alcohol (Ocasional)	64.3 %
Consumo de Refresco (Frecuente)	57.1 %
Habito de Fumar	32. 1 %
Actividad Física	• Frecuente: 25 % • Ocasional: 7.1 % • Escaso: 67.9 %
Enfermedades Autoinmunes	14.3 %
Antecedentes de Diabetes Mellitus	50 %

Finalmente, aquellos que declararon un patrón autoinmunitario, se considera que el 7.2 % tiene o ha tenido rinitis alérgica, el 3.6 % artritis, y el restante 3.6 % declaró episodios alérgicos de menor grado.

RESULTADOS ANTROPOMÉTRICOS

La OMS clasifica el IMC, dando las siguientes pautas: ⁽⁵⁷⁾

18.5 a 20.5:	Bajo Peso.
20.5 a 25.5:	Peso Normal.
25.5 a 30:	<i>Sobrepeso.</i>
30 a 40:	Obesidad Premórbida.
>40:	Obesidad Mórbida.

Tomando en cuenta estos criterios, la población estudiada presento 14.4 % (n = 4) bajo peso al momento del estudio, el 64.8 % (n = 18) con peso normal, y el restante 20.8 % (n = 6) tuvo una ligera tendencia al sobrepeso, pero sin acercarse a los límites de la obesidad.

De igual manera, para el ICC, la OMS clasifica en base a los siguientes criterios: ⁽⁵⁷⁾

ICC = 71 – 84 normal para MUJERES.

ICC = 78 – 93 normal para HOMBRES.

En base a esto, tenemos que en el género femenino se obtuvo una media del 0.78 $\pm$ 0.055 cm. Dentro de los varones se obtuvo una media de 0.88 $\pm$ 0.048 cm respectivamente. Se infiere que el 7.2 % (n = 2) de la población femenina, así como la

población masculina tiene un leve incremento en dicho índice, indicando un ligero grado de obesidad intra – abdominal.

La edad de la población de estudio fue abierta, tomando en cuenta este acápite se tiene una mínima de 23 y una máxima de 42 años. Para fines de este trabajo se estratificó al grupo de estudio por edad, como se indica en el siguiente cuadro: (Cuadro 5.2.)

Cuadro 5.2. Distribución por Edad de la Población Estudiada.
n = 28

Edad en Años	Frecuencia
23.	10.7 % (n = 3)
24.	7.1 % (n = 2)
26.	10.7 % (n = 3)
27.	7.1 % (n = 2)
28.	10.7 % (n = 3)
29.	14.3 % (n = 4)
30.	10.7 % (n = 3)
31.	7.1 % (n = 2)
33.	3.6 % (n = 1)
35.	3.6 % (n = 1)
36.	3.6 % (n = 1)
37.	3.6 % (n = 1)
40.	3.6 % (n = 1)
42.	3.6 % (n = 1)

Para cada uno de los planteamientos que se realizaron en el análisis estadístico de datos, se calculó las medidas de tendencia central como media, moda y mediana, así como los parámetros referentes a la dispersión de datos, tales como desviación estándar, error típico de la desviación estándar media, máximos y mínimos así como la frecuencia en el programa estadístico SPSS 13.0. Por otro lado, para el análisis de correlación se calculó la correlación de Pearson, así como también el análisis normal de varianza (ANOVA), para el caso de estudios bivariados. Finalmente, entre los parámetros individuales así como para los comparativos, se realizó la prueba t de student a fin de poner en manifiesto tendencias con una diferencia significativa en el grupo de estudio en dicho programa.

El análisis estadístico estratificado de edad frente al índice de masa corporal por género muestra un coeficiente de correlación con una ligera tendencia al incremento directo y proporcional entre estas dos variables. De igual manera, se realizó un Análisis Normal de Varianza (ANOVA) demostrando la relación no significativa entre estas dos variables. (Fig. 5.0) (Fig. 5.1)

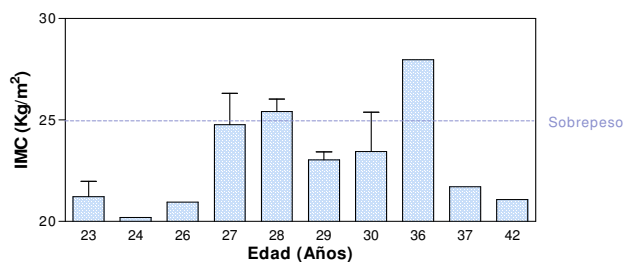


Fig. 5.0. Índice de Masa Corporal vs. Edad, representando el promedio $\pm$ el error estándar. Género Femenino.

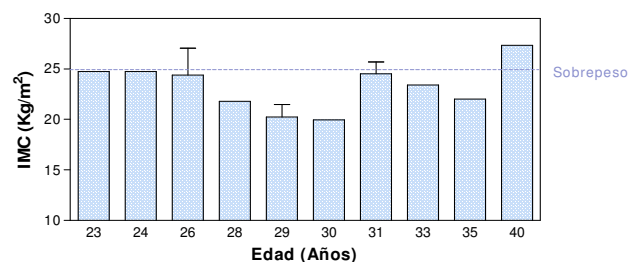


Fig. 5.1. Índice de Masa Corporal vs. Edad, representando el promedio $\pm$ el error estándar. Género Masculino.

En las figuras Fig. 5.2. Fig. 5.3. Se ilustra el índice cintura-cadera por género y edad de los participantes en este estudio, observándose claramente que no existe una tendencia significativamente demostrable al aumento de este índice en función de la edad, lo cual estadísticamente se representa por una relación no significativa de estas 2 variables al separarlas por su edad frente al género.

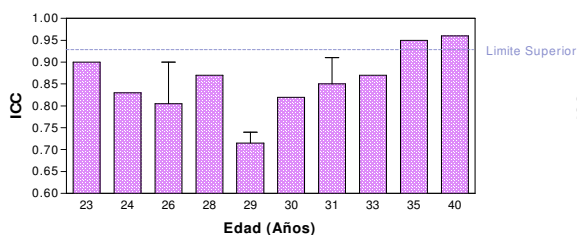


Fig. 5.2. Promedio de Índice Cintura – Cadera Género Masculino.

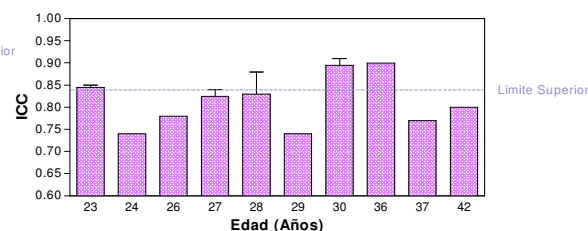


Fig. 5.3. Promedio de Índice Cintura – Cadera Género Femenino.

En lo que refiere a estos índices y el hecho de tener antecedentes de Diabetes Mellitus en la familia, cabe señalar que el 50 % de los participantes de este estudio que afirmaron tener familiares diabéticos, todos estipularon que la aparición de esta enfermedad fue tardía en sus familiares. (Mayor a los 50 años) Para ambas variables enfrentadas ante la presencia o ausencia de diabéticos en la familia se realizó un estudio estadístico en función de encontrar relación, correlación y una diferencia significativa agrupándolos por género, que para estos 2 casos no existieron. (Fig. 5.4.) (Fig. 5.5.)

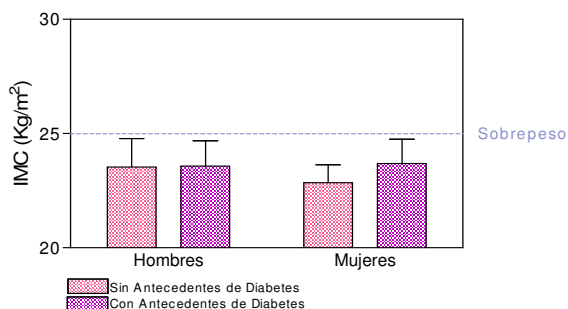


Fig. 5.4. Promedio de Índice Masa Corporal con y sin Antecedentes de Diabetes Familiar.

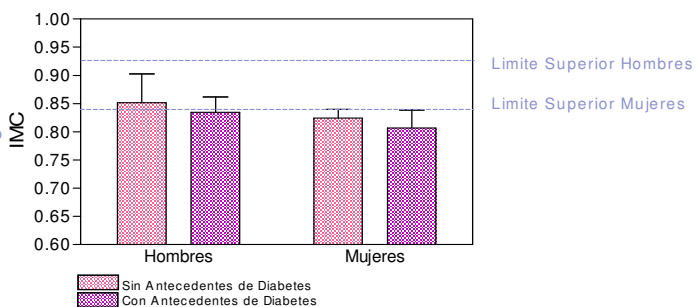


Fig. 5.5. Promedio de Índice Cintura – Cadera con y sin Antecedentes de Diabetes Familiar.

DATOS BIOQUÍMICOS

En lo referente a los analitos estudiados se les categorizó (Cuadro. 5.0.) en función al género, edad y en su caso relación de familiares con Diabetes Mellitus.

En el análisis estadístico, para la variable Glucosa no se encontró una diferencia estadísticamente significativa cuando se estratifico por género (Fig. 5.6.), los valores de glucosa estuvieron dentro de los límites estipulados por la Asociación Americana de Diabetes sólo un valor fue limítrofe a estos criterios.

Para los Triglicéridos, se demostró una diferencia significativa ($P < 0.05$), siendo mayor con representatividad estadística para el género masculino. En lo que refiere a los triglicéridos el 10.8 % ($n = 3$) de la población de estudio, tuvo valores moderadamente altos. (Fig. 5.7.)

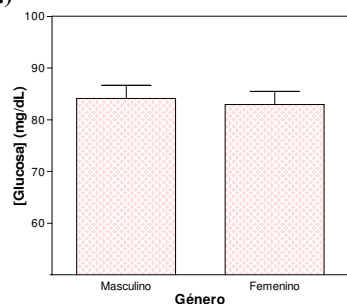


Fig. 5.6. Promedio Glucosa por Género.

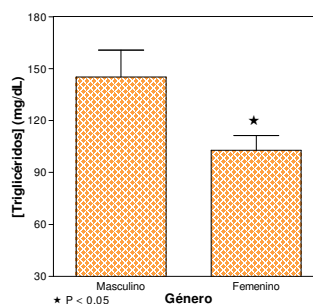


Fig. 5.7. Promedio Triglicéridos por Género.

Finalmente, en la Fig. 5.7. muestra niveles significativamente elevados de triglicéridos en el género masculino con un valor de $145.8 \text{ mg/dL} \pm 56.18$ frente a un $102.73 \text{ mg/dL} \pm 33.41$ del género femenino.

Las concentraciones de Colesterol y sus fracciones de alta y baja densidad, se mantienen la tendencia al incremento sérico de sus valores con respecto a la edad, sin manifestar diferencias significativas entre ambos géneros. El Colesterol en la población de estudio, estuvo entre valores de referencia en un 72 %, con valores moderadamente altos en 8 sujetos de estudio (28 %). (Fig. 5.8.) (Fig. 5.9.) (Fig. 5.10.)

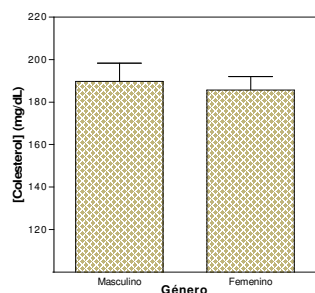


Fig. 5.8. Promedio Colesterol Total por Género.

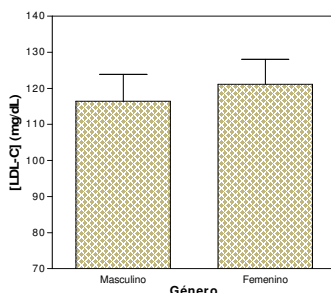


Fig. 5.9. Promedio LDL-C por Género.

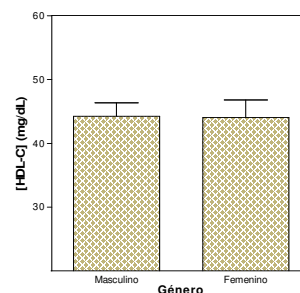


Fig. 5.10. Promedio HDL-C por Género.

En lo que refiere a las fracciones, todas ellas estuvieron dentro de rangos de tolerancia a excepción del 3.6 %, para el HDL-C y el LDL-C en distintos sujetos.

En el análisis estadístico de los analitos bioquímicos estudiados se muestra una dispersión de sus valores frente a la edad, y para ninguno de los casos se halló una correlación y diferencia significativa por medio de pruebas paramétricas, por ello, los datos están dispersos sin tendencia fija hacia un aumento proporcional con respecto a la edad. En las figuras Fig. 5.11, Fig. 5.12, Fig. 5.13, Fig. 5.14, Fig. 5.15. se ilustra la media para cada analito con respecto a la edad, sin representar el valor de error de la desviación estándar, ya que en muchos de ellos, ésta no pudo ser calculada, al tratarse de valores constantes constituidos de un solo punto, en virtud de que una categoría del parámetro edad se hallaba representada por un solo integrante.

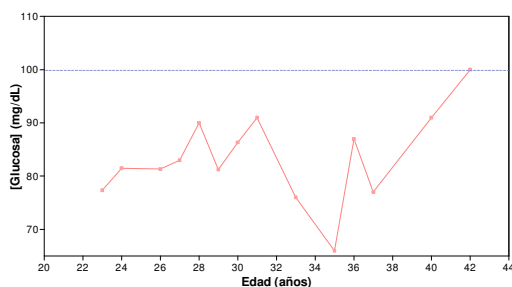


Fig. 5.11. Dispersión de valores de Glucosa frente a la Edad.

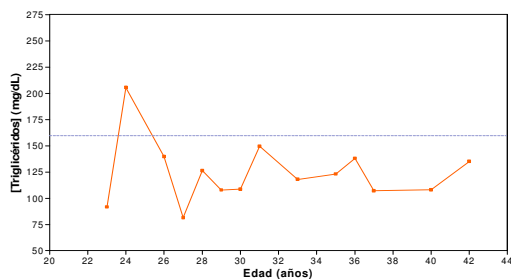


Fig. 5.12. Dispersión de valores de Triglicéridos frente a la Edad.

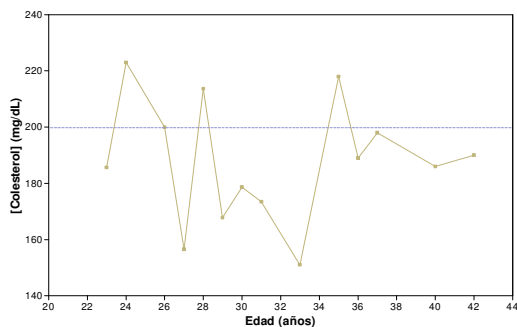


Fig. 5.13. Dispersión de valores de Colesterol Total frente a la Edad.

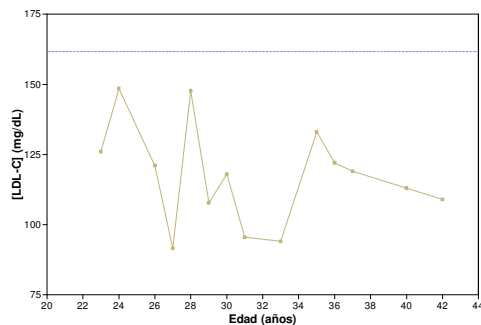


Fig. 5.14. Dispersión de valores de LDL-C frente a la Edad.

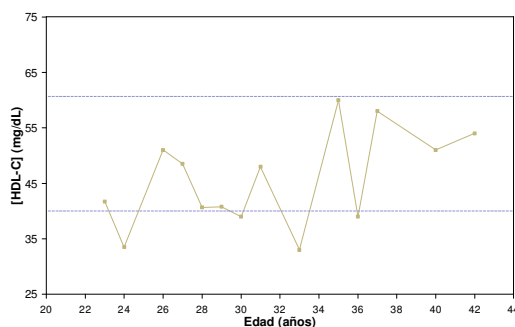


Fig. 5.15. Dispersión de valores de HDL-C frente a la Edad.

RESULTADOS HORMONALES

La insulina tuvo un comportamiento homogéneo en sus distintos estratos de clasificación, no revelando diferencias estadísticamente significativas en los distintos grupos; se mostró una tendencia al aumento de ella con la edad, presentando un valor promedio de 5.74 ± 3.44 $\mu\text{UI/mL}$ para las mujeres y de 6.99 ± 4.15 $\mu\text{UI/mL}$ para los varones, asimismo no se mostró una diferencia significativa al agruparla de acuerdo a los antecedentes de diabetes. (Fig. 5.16.) (Fig. 5.17.)

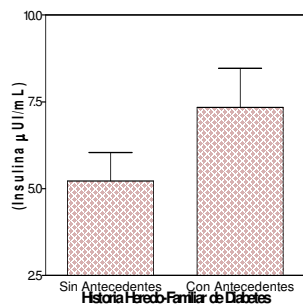


Fig. 5.16. Promedio de Insulina con y sin Antecedentes de Diabetes.

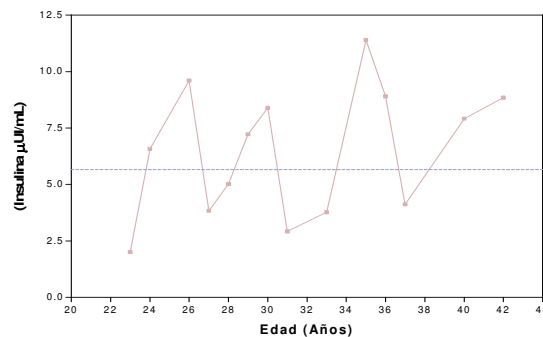


Fig. 5.17. Dispersión de valores de Insulina frente a la Edad.

El análisis t de student no demostró ninguna diferencia significativa entre los parámetros antropométricos y bioquímicos considerados en esta investigación con referencia a antecedentes de diabetes o no; el colesterol y triglicéridos fue mayor para aquellos con antecedentes de diabetes pero sin encontrarse una diferencia significativa entre ellos. La relación entre insulina y antecedentes heredofamiliares de diabetes mostró un promedio de 7.34 ± 4.20 $\mu\text{UI/mL}$ para aquellos que refirieron antecedentes y 5.22 ± 3.05 $\mu\text{UI/mL}$ para aquellos que no manifestaron tener antecedentes. En el Cuadro. 5.2. se realiza un analisis comparativos entre los sujetos que declararon tener antecedentes heredo-familiares de diabetes.

Cuadro 5.2. Análisis Comparativo de Resultados entre Individuos Con y Sin Antecedentes Familiares de Diabetes.

	Con Antecedentes Familiares de Diabetes	Sin Antecedentes Familiares de Diabetes
Glucosa [mg/dL]	82.07 $\pm$ 8.11	84.93 $\pm$ 10.73
Colesterol [mg/dL]	184.57 $\pm$ 30.14	190.5 $\pm$ 24.39
HDL-C [mg/dL]	41.71 $\pm$ 9.90	46.50 $\pm$ 10.46
LDL-C [mg/dL]	117.79 $\pm$ 26.63	120.07 $\pm$ 27.10
Triglicéridos [mg/dL]	125.35 $\pm$ 62.74	119.43 $\pm$ 33.47

RESULTADOS MOLECULARES

El análisis molecular se realizó de manera dirigida a la búsqueda de la mutación T130I del gen HNF-4 α , por lo que se empleó técnicas genético-moleculares encaminadas a poner en evidencia dicha variante. El experimento constó de las siguientes etapas:

1. Extracción de DNA y comprobación de su pureza y concentración.
2. Amplificación del exón 4 del gen HNF-4 α , corroborando la talla del amplicón (271 pb) sobre un gel de agarosa al 1 % frente a un marcador de peso molecular de 100 pb.
3. Finalmente, se realizó el corte del amplicón mediante el uso de la enzima de restricción Sfu I y la verificación del mismo sobre un gel de agarosa al 3 %, frente a un marcador de peso molecular de 100 pb.

Las siguientes fotografías muestran la verificación de la talla del amplicón (Fig. 5.18.) y los RFLPs realizadas a las muestras de estudio. (Fig. 5.19)

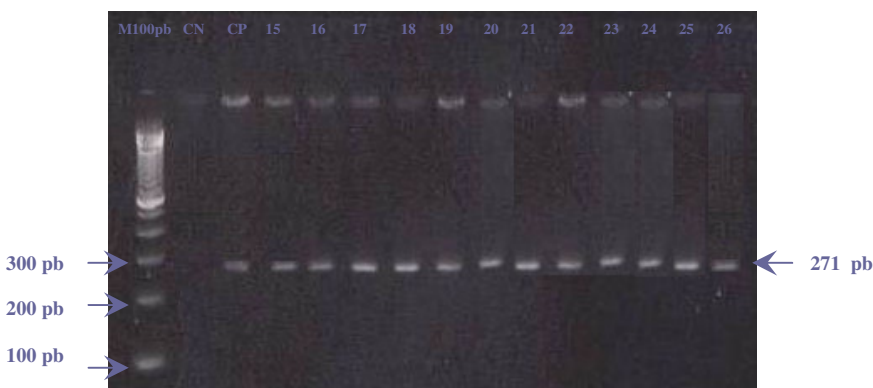


Fig. 5.18. Fotografía de un gel de Agarosa al 1 % en TBE 1x, teñido con bromuro de etidio. Voltaje = 80 V. Tiempo de corrimiento = 45 minutos. M 100 pb = marcador de 100 pares de bases; CN = control negativo; CP = control positivo.



Fig. 5.19. Fotografía de un gel de agarosa al 3 % en TBE 1x, teñido con bromuro de etidio. Voltaje = 80 V. Tiempo de corrimiento = 1 hora. M100pb: Marcador de 100 pares de bases. CN = Control Negativo. CP = Control Positivo.

Al analizar la electroforesis en geles de agarosa al 3 %, las muestras que presentan la mutación tendrán dos bandas más resultado de la digestión enzimática para el alelo mutante ATT en función de su alelo silvestre ACT, determinándose de esta manera la heterozigocidad para este locus, razón por la cual, no se realizó el electroferograma que tiene como objetivo confirmar el cambio de base para esta mutación y conocer si la mutación se manifiesta de forma heterozigota u homozigota.

En lo referente a las diferencias de las mediciones Antropométricas y Bioquímicas entre el sujeto que presentó la mutación T130I y el resto de la población, se cita en el siguiente cuadro: (Cuadro 5.3.)

	GENOTIPO	
	T130T	T130I
N	1	27
Sexo	F	N/P
Edad	23	29 ± 4.86
IMC (Kg/m ²)	19.03	23.35 ± 2.5
ICC	0.74	0.84 ± 0.07
[Glucosa] (mg/dL)	69.0	84.0 ± 9.18
[Colesterol] (mg/dL)	181.0	190.0 ± 27.56
[HDL-C] (mg/dL)	36.0	44.0 ± 10.35
[LDL-C] (mg/dL)	131.0	119.0 ± 26.78
[Triglicéridos] (mg/dL)	72.0	118.0 ± 49.36
[Insulina] (μUI/mL)	2.0	6.44 ± 3.78

Cuadro. 5.3. Datos Antropométricos y Bioquímicos del sujeto que tuvo la mutación, frente a la media de la población ± D.E. con el alelo silvestre.

Por el hecho de que se encontró tan sólo a un sujeto con la mutación T130I, no se pudo realizar un análisis de significancia en función de pruebas paramétricas y de correlación tales como la prueba t de student y correlación de Pearson entre otras; por ello se presentan las gráficas obtenidas a manera de un análisis comparativo de este estudio, en función de los genotipos encontrados, observándose tendencias tales como el menor valor para lo que refiere el Índice de Masa Corporal y el Cintura – Cadera, así como de Glucosa, LDL-C y Triglicéridos para el Genotipo T130I, con una clara diferencia entre ellos pero sin representatividad estadística.

DISCUSIÓN

Se ha demostrado mediante estudios genéticos la participación de factores de transcripción en el desarrollo de Diabetes Mellitus tipo 2, tal es el caso del gen HNF-4 α , el cual regula la expresión de genes importantes en células β pancreáticas, hígado, riñón e intestino. Es conocido, que la presencia de mutaciones en este gen aumenta el riesgo de desarrollar Diabetes Mellitus y en algunos casos son desencadenantes directos de la enfermedad. ⁽³⁷⁾

La evaluación genético molecular de la mutación T130I del gen HNF-4 α en población ecuatoriana, representa un estudio pionero al no existir datos de esta índole sobre dicha población; a la vez brinda una panorámica mucho más amplia acerca de la distribución de esta mutación y abre las puertas a la posibilidad de realizar futuras investigaciones en América Latina.

Se han descrito una serie de variantes génicas para el gen HNF-4 α , sin embargo, la prevalencia de ésta en diversos grupos étnicos es variable. Estudios realizados en población no diabética han reportado la mutación T130I con una frecuencia del 5.6 % en México, 6.6 % en Dinamarca y del 0.8 % en Japón; por otro lado los estudios realizados en población española no han encontrado esta mutación. ^{(36) (37) (39) (40) (41)}

El polimorfismo T130I del gen HNF-4 α en población mexicana ha sido asociado con Diabetes Mellitus de aparición temprana. En Ecuador cerca del 7 % de los pacientes diabéticos tipo 2 son diagnosticados entre la tercera y cuarta década de vida. ⁽⁶⁰⁾ En el presente estudio se encontró la mutación T130I del gen HNF-4 α con una frecuencia del 3.6 %. En el estudio participaron mestizos sin diabetes, representativos de la población ecuatoriana, con un rango de edad entre los 23 y 42 años.

El hallazgo del polimorfismo T130I del gen HNF-4 α y su prevalencia (3.6 %) en la población mestiza ecuatoriana estudiada a pesar de ser menor a la reportada en

sujetos mestizos sanos mexicanos (5.6 %), indica que estas dos poblaciones, y aún más, los pueblos de América latina, comparten una ancestralidad común.

El 50 % de los individuos estudiados presentan antecedente familiar de diabetes que aunado a otros factores como obesidad, estrés y sedentarismo aumentan el riesgo de desarrollar la enfermedad. ^{(17)}}

En cuanto a las medidas antropométricas, el 64.8 % de los individuos tuvo un peso normal y el 20.8 % presento sobrepeso. Para el grado de obesidad intra-abdominal (expresado por el índice cintura-cadera), que también esta relacionado con el desarrollo de Diabetes Mellitus, se observó que los hombres tuvieron un mayor índice, probablemente causado por que en los varones, se acumula mayoritariamente la grasa a nivel abdominal. ^{(59)}}

No se obtuvo una relación significativa tanto en el aumento del IMC como del ICC en función de la edad, sin embargo se observó una tendencia al aumento del IMC con relación a la edad, lo que puede representar un factor de riesgo al desarrollo Diabetes Mellitus. ^{(59)}}

Con respecto al perfil bioquímico de la población, se encontró que ninguno de los individuos estudiados presentó glicemias superiores a los 100 mg/dL. A pesar de que no se encontró una asociación significativa de la variación de la glicemia con respecto a la edad, sin embargo, se observó una tendencia al incremento de la misma con respecto al tiempo. Esta valoración es importante de lo que alteraciones en el metabolismo de carbohidratos constituyen un factor de riesgo al desarrollo de Diabetes Mellitus y aumenta la probabilidad de complicaciones derivadas de esta patología. ^{(42)}}

Los valores de colesterol total estuvieron dentro de rangos de normalidad con un promedio de 187.54 ± 27.07 mg/dL; cabe aclarar que el 28 % de los sujetos presentaron valores moderadamente elevados, sin existir una diferencia significativa, entre género y edad. De igual forma de lo anteriormente descrito para glucosa, el aumento de los valores séricos de colesterol y triglicéridos están relacionados directamente con la dieta, obesidad, inactividad física y estrés, lo cual conduce al desarrollo de Diabetes Mellitus. ^{(43)}}

La fracción HDL-C, que representa un factor de protección cardiovascular y coronario, presento valores aceptables, con un promedio de 44.10 ± 10.28 mg/dL. No existió diferencia significativa entre género y edad. ⁽⁴⁵⁾

La fracción LDL-C, cuyo incremento es directamente proporcional al riesgo de aparición de eventos cardiovasculares no mostró diferencias estadísticamente significativas en lo referente al género y a la edad, con un valor promedio de 118.93 ± 26.39 mg/dL. ⁽⁴⁶⁾

Los valores plasmáticos de las fracciones de colesterol de alta y baja densidad muestran una población aparentemente sana y con una dieta equilibrada.

El 10.8 % de la muestra tuvo hipertrigliceridemia. En este caso, las concentraciones de triglicéridos con respecto a la edad no tuvieron diferencias significativas, con una media para la población de 122.39 ± 49.43 mg/dL.

Los niveles de triglicéridos en el género masculino fueron mayores, con un valor de 145.08 ± 56.18 mg/dL frente a un 102.73 ± 33.41 mg/dL del género femenino, la diferencia fue estadísticamente significativa ($P=0.0266$), esto pudiera deberse a una menor actividad física sumada a una dieta rica en grasas y carbohidratos de los varones en comparación con las mujeres y esta de acuerdo a lo reportado para distintas poblaciones del mundo. ^{(44) (58)}

La baja sensibilidad a la insulina y la secreción deficiente de la hormona, son condiciones que representan una mayor probabilidad de desarrollar diabetes tipo 2. Los niveles de la insulina aumentaron conforme a la edad lo cual podría correlacionarse con un incremento progresivo a la resistencia de la acción de la insulina.

En esta investigación se encontró un individuo que presento la mutación T130I del gen HNF-4 α de forma heterocigota. Como lo indica el protocolo de investigación, el paso a seguir es realizar un estudio prospectivo del caso índice con la finalidad de buscar la misma variante alélica en su familia y conocer si existe segregación. Por otro lado se sugiere, un seguimiento periódico de los parámetros bioquímicos del caso índice con el objetivo de detectar el inicio de alteraciones metabólicas o en su caso de la enfermedad, ya que probablemente el alelo silvestre pudiera compensar al alelo

mutado, retrasando la aparición de esta patología aun cuando no exista un antecedente familiar de diabetes. ^{(36) (37) (39) (40) (41)}

El hallazgo de la mutación T130I en el gen HNF-4 α en población ecuatoriana, ofrece un mayor conocimiento acerca de las diferencias o similitudes en las variantes de secuencia genéticas en relación con la Diabetes Mellitus tipo 2 las cuales compartidas en América Latina. Todo ello con el fin de mejorar la prevención, pronóstico, diagnóstico y mejorar el tratamiento de la diabetes por parte de los sistemas de salud en nuestros países.

CONCLUSIONES

- Se encontró el polimorfismo T130I del gen HNF-4 α en población mestiza ecuatoriana con una prevalencia del 3.6 % sugiriendo una ancestralidad génica común en América Latina.
- La población ecuatoriana presento factores de riesgo al desarrollo de Diabetes Mellitus por lo cual se sugiere campañas educativas que ayuden a la prevención y/o atraso de esta enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. WILD y Cols. 2004. Global Prevalence of Diabetes. Diabetes Care. Volumen 27. Numero 5: 1047 – 1053
2. ENSA. 2000. Tomo 2: La Salud de los Adultos. Secretaria de Salud. Capítulo 6.
3. INEC. 2005. Departamento de Estadísticas Sociales, Dirección de Estadísticas Sociodemográficas. Base de Datos de Defunciones.
4. Organización Panamericana de la Salud. 2001. Boletín Epidemiológico. Volumen 22. Número 2: Diabetes en las Américas 1 – 2.
5. BARCELÓ, Alberto; AEDO, Christian; RAJPAKHAT, Swapnil; ROBLES, Sylvia. 2003. The Cost of Diabetes in Latin America and Caribbean. Bulletin of the World Health Organization 81: 19 – 27.
6. JARA ALBARRAN, Antonio. 2003. Endocrinología. España, Editorial Panamericana. España. Pág. 439 – 489.
7. NELSON, David L; COX, Michael M. 2004. Lehninger Principles of Biochemistry. USA. W. H. Freeman. Pág. 887, 903, 1088 – 1096.
8. [<http://www.brown.edu/Courses/BI0032/stemcell/pancreas.jpg>] [Consulta: 5/Diciembre/2006]
9. [<http://www.ub.es/betaoxi/fotosfarub04/Laurablau2.gif>] [Consulta: 5/Diciembre/2006]
10. [<http://www.med.unibs.it/~marchesi/glut.gif>] [Consulta: 5/Diciembre/2006]
11. DÍAZ, Diana P; BURGOS, Luís. 2002. ¿Cómo se transporta la glucosa a través de la membrana celular? IATREIA. Universidad de Antioquia – Colombia. Volumen 15. Numero 3: 179 – 189.
12. CRUZ, M; VELASCO, E. KUMATE, J. 2001. Señales Intracelulares que Intervienen en el Control de la Glucosa. Gaceta Médica Mexicana. Volumen 137 (2): 135 – 146.
13. [http://www.medilegis.com/BancoConocimiento/T/Tribuna101n6diabetes_p10-18/imagenes/DIABETES3p.jpg] [Consulta: 5/Diciembre/2006]
14. Varios Autores. Enero 2006. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. ADA. Volumen 30 – Supplement 1: 543 – 548.
15. Varios Autores. 2005. Guyton & Hall, Tratado de Fisiología Medica. México, Editorial McGraw Hill 11^{va} Edición. Unidad 14. Capítulo 78.
16. Caputo M. y Cols. 2005 Genotipificación del gen HLA DQB1 en diabetes autoinmune del adulto. Medicina (Buenos Aires); 65: 235-240
17. [www.msd.com.mx] [Consulta: 5/Diciembre/2006]
18. ORTEGA, L; NARVÁEZ, A; DEL CASTILLO, L. 2005. Principales Alteraciones de Homeostasis en la Diabetes Mellitus. Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Magdalena – Colombia. Volumen 2. Numero 2: 159 – 165.
19. FERRER, J; CARDALDA. C; SERVITJA. J. M. 2004. MODY: Una “transcriptopatía” de células pancreáticas. Biología molecular y aplicaciones terapéuticas futuras. Endocrinología y Nutrición; 51 (Supl 2), 42 – 47.
20. MITCHELL, S; FRAYLING, T. 2002. The Role of Transcription Factors in Maturity-onset Diabetes of the Young. Molecular Genetics and Metabolism 77: 35 – 43.
21. Gene Atlas On-line database: HNF-4 α . [Consulta: 5/Diciembre/2006]
22. Gene Card On-line for HNF-4 α . [Consulta: 5/Diciembre/2006]

23. LOZANO, T; GALINDO, C; GARCÍA – DORRON, M; MARTÍNEZ, L.; PEÑAFIEL G.; SOLANO, M. Bioquímica y Biología Molecular para Ciencias de la Salud. 2000. 2da Edición. McGraw – Hill Interamericana.
24. PABO, C; SABER R. Transcription Factors: Structural Factors and Principles of DNA Recognition. 1992. Annu. Rev. Biochem. 61:1053 – 1095.
25. MITCHEL P; TIJAN, R. Transcriptional Regulation in Mammalian Cells by Sequence – specific DNA Binding Proteins. 1989. Science. 245:371 – 378.
26. LEWIN, B. Genes VII. 2000. Oxford University Press. New York.
27. SCHELEIF, R. Genetics and Molecular Biology. 1993. The Johns Hopkins University Press. Baltimore.
28. GRIFFITHS, A. GERBART, W; MILLER, J, LEWONTIN R. Genética Moderna. 2000. Interamericana McGraw – Hill. Mexico.
29. IKEDA K; HALLE J; STELZER G; MESTERNST, M; KAWAKAMI, K. Involvement of Negative Cofactor NC2 in Active Repression by Zinc Finger – Homeodomain Transcription Factor. 1998. AREB6. Mol. Cell. Biol. 18:10 – 18.
30. MCJNIGHT D. Molecular Zippers in Gene Regulation. 1991. Sci. Am. 264:54 – 64.
31. BAGWELL, A; BENTO, J; MYCHALECKYJ, J; FREEDMAN, B; KANGFELD, C; BOWDEN, D. 2005. Genetic Analysis of HNF4a Polymorphism in Caucasian-American Type 2 Diabetes. Diabetes. Vol. 54: 1185 – 1190.
32. ELLARD, S; COLCLOUGH K. 2006. Mutations in the Genes Encoding the Transcription Factors of Hepatocyte Nuclear Factor 1 alpha (HNF-1A) and 4 alpha (HNF-4A) in Maturity-onset Diabetes of the Young. Human Mutation 27(9): 854-869.
33. PEARSON, E; PRUHOVA S; TACK C; JOHANSEN, A; CASTLEDEN, H; LUMB, P; WIERZBICKI, A; CLARK, P; LEBL, J; PEDERSEN, O; ELLARD, S; HANSEN, T; HATTERSLEY, A. 2005. Molecular Genetics and Phenotypic Characteristics of MODY caused by Hepatocyte nuclear factor 4 α Mutation in Large European Collection. Diabetología 48: 878 – 885.
34. NYIRENDA, M; DEAN, S; LYONS, V; CHAPMAN, K; SECKL, J. 2006. Prenatal Programming of Hepatocyte Nuclear Factor 4 α in the Rat: A Key Mechanism in the “Foetal Origins of Hyperglycaemia”. Diabetología 49: 1412 – 1420.
35. HARA, Et al. 2002. Maturity On-set Diabetes of the Young Resulting from a Novel Mutation in the HNF-4 α Gen. Internal Medicine. Vol. 41. No. 10: 848 – 852.
36. EK, J. et al. 2003. Genetic Epidemiology of MODY in Czech Republic: New Mutations in the MODY Genes HNF-4A, GCK and HNF-1A. Diabetología. 46: 291-295.
37. ZHU, Q. et al. 2003. T130I Mutation in HNF-4A Gene is a Loss of Function Mutation in Hepatocytes and is Associated with Late-onset Type 2 Diabetes Mellitus in Japanese Subjects. Diabetología 56: 547-573.
38. BASTARRACHEA, R; LAVIADA-MOLINA, H; VAZQUEZ, C. 2004. Análisis Crítico de los Nuevos Criterios que Sustentan el Diagnóstico de Pre-diabetes. Endocrinología y Nutrición. Vol. 12. No. 2: 90 – 96
39. HANSEN, S; ROSE, C; GLÜMER, C; DRIVSHOLM, T; BORCH-JOHNSEN, K; JORGENSEN, T; PEDERSEN, O; HANSEN, T. 2005. Variation Near the Hepatocyte Nuclear Factor HNF4-A Gene Associates with Type 2 Diabetes in Danish Population. Diabetología 48: 452 – 458.

40. DOMÍNGUEZ, A; MILIAR, G; SEGURA, Y; RIBA, L; ESPARZA, J; RAMÍREZ, S; RODRÍGUEZ, M; CANIZALES, S; CABRERA, S; FRAGOSO, V; AGUILAR, C; ALTAMIRANO, N; CALZADA, R; ROBLES, C; BRAVO, L; TUSIÉ, M. 2005. Mutations in MODY Genes are not Common Cause of Early On-set Type 2 Diabetes in Mexican Families. 2005. JOP 6(3): 238-245.
41. EK, J. et al. 2005. The Functional T130I and V1255M Polymorphisms of the Hepatocyte Nuclear Factor 4 α (HNF4A) Gene Associations with Type 2 Diabetes or Altered β Cell Function Among Danes. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 90 (5): 3054 – 3049.
42. Glicemia Enzimática Liquicolor – STANBIO Lab. 2005.
43. Colesterol Enzimático AA – Wiener Lab. 2000.
44. TG Liquicolor GPO/PAP – STANBIO Lab. 2005.
45. HDL Colesterol Monofase – STANBIO Lab. 2005.
46. FRIEDEWALD WT; LEVY, JR; FREDRICKSON DS. 1972. Estimation of the concentration of low density lipoproteins cholesterol in plasma without the use of ultracentrifugation. Clinical Chemistry 18: 449 – 502.
47. Buffone, GJ; Darlington CJ. 1985. Isolation of DNA from biological specimens without extraction with phenol. Clinical Chemistry 31: 164 – 165.
48. [www.users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html] [Consulta: 5/Diciembre/2006]
49. Yamagata et al. 1996. Primers for HNF-4 α . Nature 384:458 – 460.
50. [<http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/20x7.jpg>] [Consulta: 5/Diciembre/2006]
51. SFU I Roche ® Diagnostics. 2004.
52. SPSS 10.0 for Windows. Standard Version. Copyright© SPSS Inc., 1989 – 2005.
53. FERRÁN, M. Curso de SPSS para Windows. 2002. McGraw – Hill Profesional. España.
54. GraphPad Prism Version 4.0. Copyright©. GraphPad Software Incorporated, 1994 – 2005.
55. [<http://escuela.med.puc.cl/Publ/ManualSemiologia/Presion.html>] [Consulta: 11/Enero/2007]
56. [http://es.wikipedia.org/wiki/%C3%8Dndice_de_masa_corporal] [Consulta: 11/Enero/2007]
57. [http://es.wikipedia.org/wiki/%C3%8Dndice_cintura/cadera] [Consulta: 11/Enero/2007]
58. AGUILAR-SALINAS C; REYES-RODRÍGUEZ, E; ORDÓÑEZ-SÁNCHEZ, ML; ARELLANO-TORRES, M; RAMÍREZ-JIMÉNEZ, S; DOMÍNGUEZ-LÓPEZ, A; MARTÍNEZ-FRANCOIS, J; VELASCO-PÉREZ, M; ALPIZAR, M; GARCÍA-GARCÍA, E; GÓMEZ-PÉREZ, F; RULL J; TUSIÉ-LUNA, M. 2001. Early-onset type 2 Diabetes: Metabolic and Genetic Characterization in the Mexican Population. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism; 86: 220-226.
59. BLAAK, E. 2001. Gender differences in fat metabolism. Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care; 4: 499-502.
60. MENJÍVAR, M; GRANADOS SILVESTRE, M; MONTUFAR, I; HERRERA, M; TUSIE LUNA, M; CANIZALES QUINTEROS, S; ORTIZ LÓPEZ, M. High frequency T130I mutation of HNF4A gene in Mexican Patients with early-onset type 2 diabetes. 2006.

ANEXOS

CARTA CONSENTIMIENTO



HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO
LABORATORIO DE ENDOCRINOLOGÍA MOLECULAR
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMANDO PARA PARTICIPAR COMO CONTROL SANO EN EL PROYECTO:

“EVALUACIÓN MOLECULAR DE PACIENTES CON DIABETES MELLITUS DE INICIO TEMPRANO”

México D.F. a _____

A quien corresponda:

Yo, el/la abajo suscrito/a _____ de _____ Años de edad, en forma libre y voluntaria acepto participar en el estudio **“Evaluación Molecular de Pacientes, con Diabetes Mellitus No Insulino Dependiente”** que se llevara a cabo en el Hospital Juárez de México y la Facultad de Química de la UNAM, cuyo objetivo es identificar los genes responsables de la Diabetes Mellitus No Insulino Dependiente tipo MODY en familias Mexicanas.

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

Firma del Control Voluntario: _____

Teléfono: _____

Dirección: _____

Firma del Investigador: _____

CUESTIONARIO DE CONTROLES PARA DIABETES MELLITUS

Datos Personales:

Nombre: _____

Edad: _____ Sexo: _____ Ocupación: _____

Ciudad/Estado: _____

Dirección: _____

Teléfono Celular: _____

Datos de Laboratorio:

Glucosa (Ayuno): _____ mg/dL. Colesterol: _____ mg/dL. Triglicéridos: _____ mg/dL.

Datos Adicionales:

Peso Actual: _____ Estatura: _____ Cintura: _____ Cadera: _____

Presión Arterial: _____

Observaciones:

Toma Alcohol: _____ Toma Refresco: _____ Que Marca: _____

Fuma: _____ Cirugías: _____ Ejercicio: _____

Tipo de Ejercicio: _____ Enfermedades Autoinmunes: _____

Antecedentes Heredo-Familiares:

Padres con DM? _____

Hermanos con DM? _____

Abuelos Paternos o Maternos con DM? _____

Tíos, Primos con DM? _____

Observaciones:

EXTRACCIÓN DE DNA

PROCEDIMIENTO

La técnica se hace en dos partes:

1ª Parte

1. Sacar del congelador los tubos con 10 mL de sangre total (de preferencia sólo 5 por sesión) y permitir que alcancen la temperatura ambiente (la sangre debe estar totalmente descongelada).
2. Mezclar suavemente por inversión y colocar en hielo.
3. Llevar, cada tubo, a un volumen de 35ml con solución sacarosa-tritón 2X fría.
4. Llevar a un volumen final de 50ml con agua desionizada y estéril.
5. Mezclar suavemente por inversión y dejar incubar 10min en hielo (mezclando de vez en cuando).
6. Centrifugar a 2000 rpm durante 15min a 4 °C.
7. Decantar el sobrenadante en un recipiente con hipoclorito de sodio y desechar.
8. Lavar el botón que queda con 5 ml de solución sacarosa triton 1X fría.
9. Centrifugar a 2000 rpm durante 15min a 4 °C.
10. Decantar el sobrenadante en un recipiente con hipoclorito de sodio y desechar. Se debe ver un pellet rosado, si no lavar nuevamente con sacarosa tritón 1X fría. (Si el botón no se utiliza inmediatamente, congelar a -70 °C hasta su uso).
11. Agregar 3ml de buffer de lisis nuclear, al pellet, y resuspender con una pipeta pasteur sellada de la punta.
12. Agregar 216µL de SDS al 10%, mezclar suavemente con la pipeta.
13. Agregar 100µL de Proteinasa K (5mg/ml) y mezclar suavemente con la pipeta.
14. Incubar en Baño María a 37 °C con agitación suave (25) toda la noche (mín. 8 – 10 hrs).

2ª Parte

15. Transferir toda la muestra a tubos cónicos estériles de 15ml.
16. Agregar 1ml de NaCl saturado y agitar vigorosamente (hay formación de espuma)
17. Centrifugar a 2000rpm durante 15min a 4 °C.
18. Transferir, *con mucho cuidado y con micropipeta*, el sobrenadante a otro tubo cónico de 15ml (**EL SOBRENADANTE ES LO QUE SIRVE**).
19. Agregar un volumen 2 veces igual al de la muestra de Etanol al 100% frío.
20. Mezclar suavemente por inversión (Se observa la hebra de DNA).
21. Sacar el DNA precipitado con una pipeta pasteur sellada de la punta.
22. Lavar el DNA precipitado con Etanol al 70%, dentro de un tubo Eppendorf, moviendo suavemente la pipeta.
23. Dejar secar completamente, a temperatura ambiente, el DNA que está adherido en la pipeta pasteur (Con la punta hacia arriba. El DNA seco es transparente).
24. Depositar el DNA en aprox. 200µL de buffer TE en un tubo Eppendorf estéril y dejar el tubo, con la pipeta dentro, 20min a 37 °C para incorporar la mayor cantidad posible de DNA.
25. Cuantificar el DNA (Lectura esperada de 1.7-2.0)

***Cuantificación de DNA.**- Hacer una dilución 1:200 de los 200µL de TE donde está contenido el DNA (5 µL muestra + 995µL de agua desionizada). Mezclar en el vortex 1-2 seg. Leer por duplicado a 260 y 280 nm. *Las preparaciones puras tienen valores de 1.7–2.0.*

- a) **Determinación de la Pureza:** Se realiza en un Espectrofotómetro UV – Visible a 260 nm para los Ácidos Nucleicos y 280 para la mezcla de Ácidos Nucleicos y Proteínas, de la siguiente manera.

Pureza: D.O. 260 nm. (Radio Idóneo: 1.8 – 2.0)
D.O. 280 nm.

- b) **Determinación de la Concentración:** Se determina la media entre ambas lecturas, que se hicieron por duplicado. En donde:

1.000 Abs $\approx$ 50 μ g/mL de DNA.

1.000 Abs $\approx$ 40 μ g/mL de RNA.

1.000 Abs $\approx$ 20 μ g/mL de Oligonucleótidos de Cadena Sencilla.

Concentración: Promedio de Lecturas a 260 nm x 10 = μ g/mL.

En donde:

Factor de Dilución: 200.

Relación Abs/ [C] = 1.000 Abs $\approx$ 50 μ g/mL de DNA.

1mL = 1000 μ L.

50 μ g/mL de DNA x Factor de Dilución de 200 = 10.000

$$\begin{array}{ccc} 1 \text{ mL} & \swarrow \searrow & 1000 \mu\text{L} \\ x = 10 & & 10.000 \end{array}$$

Ejemplo:

Muestras
Procesadas
por
Duplicado.

1	{	λ	Absorbancia.	Concentración Promedio: 1.105 μ g/mL. Pureza Promedio: 1.906.
		260 nm.	0.115	
		280 nm.	0.061	
		Radio 1.	1.885	
2	{	260 nm.	0.106	
		280 nm.	0.055	
		Radio 2.	1.927	

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

1. *Sacarosa Tritón 2X:*

- Sacarosa 219 gr. (0.64M)
 - Tris-Base 2.42 gr. (0.02M)
 - MgCl_2 2.03 gr. (0.01M)
 - Tritón 100X 10mL. (2%)
1. Vaciar todos los reactivos a un vaso de precipitados de 1000 mL y agregar aproximadamente 800 mL de agua desionizada.
 2. Mezclar en el agitador magnético hasta que se homogenice.
 3. Ajustar el pH a 7.6.
 4. Aforar a 1L.
 5. Filtrar con membrana.
 6. Almacenar a 4 °C.

2. **Sacarosa Tritón 1X:** Tomar un volumen de Sacarosa 2X y agregar un volumen igual de agua desionizada. Mezclar hasta homogenizar. Almacenar a 4 °C.
3. **Buffer Lisis Nuclear:**
- Tris-Base 1.21gr. (10mM)
 - NaCl₂ 23.4 gr. (400mM)
 - Na₂EDTA 0.75gr. (2mM)
1. Vaciar todos los reactivos a un vaso de precipitados de 500 mL y agregar aprox. 300 ml de agua desionizada.
 2. Mezclar en el agitador magnético hasta que se homogenice.
 3. Aforar a 500 mL.
 4. Esterilizar en autoclave.
 5. Almacenar a Temperatura ambiente.
4. **Proteinasa K 5mg/mL:**
- Pesar 50mg de la proteinasa. (0.050 g)
 - Llevar a 10 mL.
 - Mezclar completamente.
 - Hacer alícuotas de 500 µL.
 - Almacenar a -20 °C.
5. **NaCl saturado:**
- Disolver 35grs de NaCl en 100 mL de agua desionizada.
 - Solubilizar lo más posible. (Queda una capa de sal en el fondo).
 - Almacenar a temperatura ambiente.
6. **Etanol 70%:** Tomar 70 mL del alcohol absoluto (100%) y agregar 30 mL de agua desionizada. Mezclar hasta homogenizar. Almacenar a 4 °C.
7. **Buffer TE:**
- Tomar 1 mL de Tris/HCL 10mM a pH8.0.
 - Agregar 200 µl de EDTA 0.5M a pH8.0.
 - Aforar a 100 mL.
 - Almacenar a temperatura ambiente.
8. **Tris/HCl 10mM a pH8.0:-**
- Pesar 30.275g de Tris/HCl.
 - Disolver con 150ml de agua desionizada.
 - Ajustar el pH a 8.0.
 - Aforar a 250 mL.
 - Esterilizar soluciones.
 - Almacenar a temperatura ambiente.

PROTOCOLS

PROTOCOLLO 1: PCR PARA RFLP.

Fecha: _____ **PCR #:** _____

Gen:	RFLP
1	1
2	2
3	3
4	4
5	5
6	6
7	7
8	8
9	9
10	10
11	11
12	12
13	13
14	14
15	15
16	16
17	17
18	18
19	19
20	20
21	21
22	22
23	23
24	24
25	25
26	26
27	27
28	28
29	29
30	30
31	31
32	32
33	33
34	34
35	35
36	36
37	37
38	38
39	39
40	40
41	41
42	42
43	43
44	44
45	45
46	46
47	47
48	48
49	49
50	50
51	51
52	52
53	53
54	54
55	55
56	56
57	57
58	58
59	59
60	60
61	61
62	62
63	63
64	64
65	65
66	66
67	67
68	68
69	69
70	70
71	71
72	72
73	73
74	74
75	75
76	76
77	77
78	78
79	79
80	80
81	81
82	82
83	83
84	84
85	85
86	86
87	87
88	88
89	89
90	90
91	91
92	92
93	93
94	94
95	95
96	96
97	97
98	98
99	99
100	100

Exón: . **# de Pares de Bases:** .

Temperatura de Alineamiento:_____.

[illegible]

PROTOCOLLO 2: PCR PARA SSCP

Fecha:_____. **PCR #:**_____.

Gen:_____.

Exón: _____ **# de Pares de Bases:** _____

Temperatura de Alineamiento:_____.

[illegible]

PROTOCOLO 3: RFLP

Fecha: _____ PCR #: _____

Gen: _____ RFLP SfuI®

Exón: _____ # de Pares de Bases: _____

Temperatura de Alineamiento: _____

Incubar 24 horas a 37 °C.

# Tubo	Amplicón	H ₂ O _μ L	Buffer H	Oligo5' _μ L
1	C (-)	5.9 _μ L	1 _μ L	0.62 _μ L
2	C (+)			
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				