

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y
NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"

***La variante Pro12Ala del gen del receptor de proliferación de
peroxisomas γ -2 (PPAR- γ 2) está asociada al riesgo de
insuficiencia renal crónica terminal en pacientes mexicanos
con diabetes mellitus tipo 2***

T E S I S D E P O S G R A D O

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO COMO ESPECIALISTA EN

E N D O C R I N O L O G Í A

PRESENTA

Dra. María Alejandra Ramos Guifarro

TUTOR: Dr. Carlos Aguilar Salinas

MEXICO, D.F., AGOSTO DE 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Carlos Aguilar Salinas¹ así como a la Dra. María Teresa Tusié Luna²

1. Departamento de Endocrinología y Metabolismo de Lípidos, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, México D.F.
2. Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” e Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

EL GEN PPAR γ

LA VARIANTE PRO12ALA DEL PPAR γ

SUJETOS Y MÉTODOS

MUESTRA

CRITERIOS DE DIAGNOSTICO DE DIABETES

DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

Genotipificación

Análisis estadístico

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

REFERENCIAS

ANEXOS

Resumen

La variante Pro12Ala del gen PPAR γ 2 ha sido estudiada extensamente en cuanto a su posible participación en la obesidad, la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2 (DT2) en distintas poblaciones. Pocos estudios a la fecha han evaluado su posible asociación a la nefropatía diabética (ND) y la insuficiencia renal crónica terminal (IRCT). Dos estudios recientes en las poblaciones alemana y brasileña reportaron a la variante Ala12 como un alelo protector en el desarrollo de la nefropatía diabética.

En el presente trabajo se estudiaron 337 individuos mexicanos no relacionados de los cuales 111 eran pacientes con DT2 e insuficiencia renal crónica terminal (DT2-IRCT), 49 pacientes con IRCT no diabéticos (IRCT-no DT2), 46 pacientes con DT2 de 10 años o más de evolución, normoalbuminúricos y sin evidencia de ND (DT2-no ND) y 131 sujetos sanos, normoglicémicos como control.

La frecuencia de los genotipos Ala12Ala/Pro12Ala fue significativamente más alta en el grupo de pacientes con DT2-IRCT al compararla con el grupo de sujetos control (31.5 vs 19.8%, OR= 1.86, IC 95% 1.04-3.33 p=0.037). Adicionalmente, la frecuencia del alelo Ala12 fue significativamente mayor en el grupo de pacientes con DT2-IRCT que en el grupo de pacientes con DT2-no ND (Ala12Ala/ Pro12Ala p=0.061) (Ala12 p=0.034). El análisis de regresión logística múltiple mostró que la presencia del alelo Ala12 se asoció significativamente al desarrollo de la IRCT en pacientes con DT2 (OR= 4.18 IC 95% 1.41-12.37, p= 0.012), y que la presencia de hipertensión arterial así como el tiempo de evolución de la diabetes se asociaron a la IRCT de manera independiente (OR= 4.71 C 95% 1.91-11.58, p= 0.001 y OR= 1.11 IC 95% 1.05-1.18, p=0.001 respectivamente). De manera interesante, la asociación fue exclusiva al rasgo de IRCT ya que este polimorfismo no mostró asociación al rasgo de DT2 (OR=1.06, IC 95% 0.56-2.00. p=0.888).

Contrario a lo reportado en otras poblaciones, el alelo Ala12 confiere un riesgo incrementado al desarrollo de IRCT en pacientes mexicanos con DT2. La confirmación de este hallazgo en un estudio prospectivo de mayor escala haría de este marcado molecular una herramienta predictiva útil en la prevención de la complicación crónica más importante asociada a la mortalidad de pacientes mexicanos con DT2.

Introducción

La diabetes es una enfermedad clínica y genéticamente heterogénea caracterizada por la elevación crónica de la glucosa plasmática y la predisposición al desarrollo de complicaciones micro y macro-vasculares.

La diabetes tipo 2 (DT2) es la forma más común, afecta alrededor de 150 millones de personas en el mundo y se estima que para el año 2025 este número se incrementará a 300 millones (Zimmet *et al*, 2001). El tratamiento de las complicaciones crónicas asociadas a esta patología consumen entre el 2-7% de los presupuestos de salud en muchos países desarrollados (Zimmet, 2003). Por su parte, la población mexicana muestra una de las prevalencias más altas de DT2 reportadas en el mundo (11%). En el año 2000 existían alrededor de 2 millones de individuos diabéticos y cerca de 300,000 de ellos desarrollaron la enfermedad antes de los 40 años (Dirección General de Información y Evaluación del Desempeño, Secretaría de Salud México, 2003).

Una de las complicaciones crónicas más frecuentes en pacientes con DT2 es la insuficiencia renal crónica terminal (IRCT). A pesar de que no se cuenta con datos de la prevalencia de la IRCT asociada a DT2 en la población mexicana, está documentado que la población mexicana-americana tiene 4.5 a 6.6 veces más riesgo de desarrollar IRCT que los blancos no hispanos (Haffner *et al*, 1989) (Pugh *et al*, 1995).

En el desarrollo de la DT2 participan distintos genes de susceptibilidad cuya expresión es modulada por factores ambientales la dieta o el grado de actividad física. Adicionalmente, en el riesgo al desarrollo de complicaciones como la nefropatía diabética y la IRCT participan distintos genes y regiones cromosómicas de susceptibilidad (Seaquist *et al*, 1989) (Imperatore *et al*, 1998) (Placha *et al*, 2005).

Por su parte, la prevalencia de esta DT2 en pacientes diabéticos sigue en aumento a pesar del conocimiento detallado de muchos de los factores de riesgo asociados tales como el consumo de dietas altas en grasas o la inactividad física (Zimmet, 2003) (Rychlik *et al*, 1998). Por lo tanto, entender el origen genético de esta patología representa hasta el momento una de las estrategias más seguras como para el control de esta enfermedad y de sus complicaciones asociadas.

En este sentido, numerosos estudios en las últimas décadas han estudiado el posible papel de distintos genes en la susceptibilidad al desarrollo de la DT2 analizando variantes de secuencia en distintos genes vinculados con la señalización de insulina y al proceso secretorio de esta hormona en la célula β pancreática (McCarthy, 2004).

Uno de los genes que ha mostrado consistentemente asociación al riesgo de DT2 es el gen PPAR γ (del inglés, peroxisome proliferator activated receptor gamma).

PPAR γ es un factor de transcripción que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares. Participa en los procesos de diferenciación de adipocitos, inflamación y apoptosis, así como en el metabolismo de carbohidratos y lípidos (Desvergne *et al*, 1999) (Berger *et al*, 1999). Este factor de transcripción se cree influye en la expresión genética de forma indirecta y usualmente de una forma negativa, a través de la competencia con otros factores de transcripción. Esto parece ser particularmente cierto para los genes implicados en los efectos inmunomoduladores de las diferentes isoformas del PPAR incluyendo la represión del IFN γ en células T (Cunard, R. 2004) y fibrinógeno en hepatocitos suprimidos.

Su actividad de transactivación depende de la unión al receptor de ácido retinóico RXR. La formación de heterodímeros resulta en su unión a elementos de respuesta específicos en múltiples genes (Jpenberg *et al*, 2004). Se conocen al menos cuatro isoformas resultado de sitios alternos de inicio de la transcripción y procesamiento alternativo del mensajero (Zhu *et al*, 1995) (Fajans *et al*, 1997) (Fajans *et al*, 1998). Los hipoglucemiantes tiazolidinedionas son potentes agonistas de la actividad de PPAR γ (Lehmann *et al*, 1995).

La variante PPAR γ 2 se expresa predominantemente en adipocitos (Yen *et al*, 1997). Ante la ausencia de antagonistas farmacológicos del receptor lo que la única forma de ver los efectos de la pérdida de función del PPAR son las variantes alélicas que condicionan mutaciones inactivantes del mismo. En particular el cambio de un residuo de prolina por uno de alanina (Pro12Ala) presente en la isoforma PPAR- γ 2 se ha asociado al riesgo al desarrollo de la DT2 en distintas poblaciones (Altshuler *et al*, 2000). Es la variante más prevalente del PPAR γ con una frecuencia alélica que va desde 2% a 23% en diferentes grupos étnicos (Altshuler *et al* 2000). In Vitro esta variante parece estar asociada con una menor activación transcripcional. (Deeb, S.S., *et al*. 1998)

Pro12Ala ha mostrado también asociación a la resistencia a la insulina y la obesidad en distintos grupos étnicos (Masud *et al*, 2003) (Hiroki *et al*, 2004) (Hasstedt *et al*, 2001) (Lindi *et al*, 2002). Adicionalmente, dos estudios recientes en las poblaciones brasileña y alemana reportaron asociación de este mismo polimorfismo a un menor riesgo para el desarrollo de la nefropatía diabética (Caramori *et al*, 2003; Herrman *et al*, 2002).

Los mecanismos mediante los cuales el gen PPAR- γ 2 y sus variaciones pueden influir sobre el desarrollo de nefropatía diabética no está bien dilucidado. El sitio principal de expresión de este gen son los adipocitos quienes generan y secretan PAI-1, angiotensina II y colágeno tipo IV. Se puede pensar entonces que una disminución de los niveles de PPAR γ 2 en preadipocitos reduce los niveles de estas sustancias produciendo un efecto antiinflamatorio reduciendo la progresión de la nefropatía.

En este estudio se analizó el papel de la variante Pro12Ala del gen PPAR γ en el desarrollo de la DT2 y el riesgo de IRCT en pacientes mexicanos con o sin DT2.

Sujetos y Métodos

Se analizaron un total de 337 sujetos mexicanos no relacionados distribuidos en los siguientes grupos: a) 111 pacientes con DT2 e IRCT en lo sucesivo (DT2-IRCT), b) 46 pacientes con DT2 normoalbuminúricos y sin nefropatía diabética (DT2-no ND), c) 49 pacientes con IRCT no diabética (IRCT-no DT2) (glomeruloesclerosis, lupus eritematoso sistémico, ideopática) y d) 131 individuos control.

La DT2 fue diagnosticada de acuerdo a los criterios propuestos por la OMS (The Expert Comité on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003). El diagnóstico de IRCT en pacientes con DT2 se realizó con base al requerimiento de diálisis como terapia sustitutiva y niveles de creatinina sérica > 4 mg/dl. Todos los pacientes con DT2 sin ND mantenían normoalbuminuria al menos 10 años después del diagnóstico de diabetes. La hipertensión arterial se definió como niveles de presión sistólica > 140 mmHg y/o una presión diastólica con niveles > 90 mmHg o bien el uso de terapia antihipertensiva. Los sujetos control fueron seleccionados de la población abierta en la Ciudad de México. Como individuos control para DT2 se incluyeron sujetos mayores de 45 años, normoglicémicos sin antecedentes de DT2 en padres o abuelos.

El proyecto fue aprobado por los Comités de Investigación de las Instituciones participantes.

Determinaciones bioquímicas

Todas las determinaciones se realizaron en muestras de sangre obtenidas después de un ayuno de 9-12 horas. La glucosa se midió utilizando el método de glucosa-oxidasa y la microalbuminuria a través de un método inmunoturbidimétrico (Boehringer, Mannheim).

Genotipificación

El DNA genómico se obtuvo a partir de sangre total utilizando un método libre de fenol (Buffone y Darlington, 1985). Para la determinación del polimorfismo Pro12Ala del gen PPAR- γ 2 se utilizó PCR-SSCP de acuerdo a la metodología descrita por Deeb *et al*, 1998. Todos los sujetos homocigotos para el alelo Ala12 y algunos sujetos con los fenotipos Pro12Pro y Pro12Ala seleccionados al azar, fueron analizados también por secuenciación directa. Los genotipos fueron concordantes en el 100% de los casos. La

secuenciación se realizó utilizando el estuche de reactivos de Big Dye Terminator v3 de ABI Prism y un secuenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems).

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como promedios y desviaciones estándar. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS v10 (SPSS, Chicago Ill, USA). Las características clínicas se compararon utilizando la prueba de χ^2 o la prueba de T de Student. Las distribuciones genotípicas se probaron para el Equilibrio de Hardy-Weinberg. Las frecuencias alélicas y genotípicas se compararon utilizando la prueba de χ^2 . El análisis de regresión logística múltiple se utilizó para determinar la asociación de factores independientes con la IRCT. El valor de $p < 0.05$ se consideró como estadísticamente significativo.

Resultados

Las características clínicas más relevantes de los grupos en estudio se muestran en la Tabla 1.

Los pacientes con IRCT (con DT2 o sin DT2) presentaron con mayor frecuencia hipertensión arterial que los pacientes con DT2 normoalbuminúricos (DT2-no ND) (83.8% vs 15.2% $p < 0.001$).

La distribución de los genotipos y frecuencias alélicas en los distintos grupos de estudio de acuerdo al origen y la presencia o no de IRCT se muestran en la Tabla 2.

Los genotipos Ala12Ala/Ala12Pro se encontraron con más frecuencia en los pacientes con IRCT (DT2-IRCT + IRCT-no DT2) al compararlos con el grupo control, sin embargo, esta diferencia no alcanzó significancia estadística ($p=0.062$). Al comparar los grupos de IRCT de manera separada con los controles, se observó que los genotipos Ala12Ala/Ala12Pro eran estadísticamente más frecuentes en el grupo de pacientes con (DT2-IRCT + IRCT-no DT2) (31.5 vs 19.8%, OR=1.86, IC 95% 1.04-3.33, $p=0.037$).

De manera semejante, al compararlos con el grupo control la frecuencia del alelo Ala12 fue significativamente más frecuente en el grupo total de pacientes con IRCT (DT2-IRCT + IRCT-no DT2) y en los pacientes con DT2 e IRCT (DT2-IRCT) ($p=0.015$ y 0.008 respectivamente), pero no en los pacientes con IRCT no diabética (IRCT-no DT2) ($p=0.524$). Las frecuencias genotípicas no mostraron desviaciones significativas del equilibrio de Hardy-Weinberg en ninguno de los grupos analizados.

Adicionalmente, la frecuencia del alelo A12 fue significativamente más alta en los pacientes diabéticos con IRCT (DT2-IRCT) que en los pacientes diabéticos sin nefropatía diabética (DT2-no ND) ($p=0.034$). De forma similar los genotipos Ala12Ala/Pro12Ala fueron más frecuentes en los pacientes diabéticos con IRCT al compararlos con los diabéticos sin nefropatía, sin embargo, esta diferencia no alcanzó significancia estadística ($p=0.061$) (Tabla 3). Además, la frecuencia del alelo Ala12 fue similar en el grupo de pacientes diabéticos sin nefropatía (DT2-no ND) (8.7%) y en los controles sanos (9.9% $p=0.716$).

No hubo diferencias entre los portadores del alelo Ala12 con respecto a la edad, el tiempo de evolución de la diabetes o la hipertensión arterial en los pacientes con o sin IRCT (DT2-IRCT o DT2-no ND). Adicionalmente, el análisis de regresión logística múltiple evidenció que la presencia del alelo Ala12 (OR 4.18 IC 95% 1.41-12.37, $p=0.012$), la hipertensión arterial (OR 4.71 IC 95% 1.91-11.58, $p=0.001$) y el tiempo de

evolución de la diabetes (OR 1.11 IC 95% 1.05-1.18) son factores de riesgo independientes para la IRCT en pacientes con DT2.

Por otra parte, debido a que la frecuencia más alta del alelo Ala12 se observó en el grupo de pacientes con DT2-IRCT y no en el grupo de pacientes con IRCT-no DT2, evaluamos la posible asociación del polimorfismo Pro12Ala al riesgo al desarrollo de diabetes. Al comparar al grupo de DT2 (pacientes con y sin IRCT) con los controles normoglicémicos, observamos que la frecuencia del alelo Ala12 así como la frecuencia de los genotipos Ala12Ala/Ala12Pro no diferían significativamente (OR=1.06, IC 95% 0.56-2.00, p=0.888) (Tabla 4).

Discusión

La enfermedad renal crónica es una entidad multifactorial que presenta prevalencias variables en las distintas poblaciones. Evidencia genética sugiere que existen distintos genes de susceptibilidad para el desarrollo de la nefropatía diabética (Rincon-Choles *et al*, 2005) (Placha *et al*, 2005) cada uno de los cuales tiene un efecto parcial y aditivo en el desarrollo de esta complicación y que la presencia de hiperglicemia crónica favorece su expresión (Sale *et al*, 2006). En este sentido uno de los genes que ha sido vinculado al desarrollo de la ND es el gen PPAR- γ localizado en el cromosoma 3, en un locus relacionado de manera independiente a la ND en estudios de tamizaje genómico en Indios Pima (Imperatore *et al*, 1998).

En el presente estudio, las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo Pro12Ala de PPAR- γ 2 obtenidas en los individuos sanos analizados son similares a las reportadas para la población Mexicana-Americana (frecuencia del alelo Ala12 de 9.9 y 11%, respectivamente) (Cole *et al*, 2000) (Parra *et al*, 2004).

Mientras que numerosos estudios han mostrado asociación del polimorfismo Pro12Ala al riesgo al desarrollo de la DT2, el papel de esta variante no ha sido demostrado en todas las poblaciones (Manzini *et al*, 1999). En la mayoría de los estudios el alelo Ala12 parece tener un papel protector en el desarrollo de DT2 (Altshuler *et al*, 2000). En nuestro estudio, por el contrario la variante Pro12Ala no mostró asociación a la DT2 en el grupo de pacientes analizados, consistente con estudios similares en la población Mexicana-Americana (Cole *et al* 2000; Parra *et al*, 2004).

En este sentido es particularmente interesante que identificamos asociación del alelo Ala12 al desarrollo de la IRCT en pacientes con DT2 y que esta asociación mostró ser independiente a la presencia de hipertensión arterial o al tiempo de evolución de la diabetes.

Contrario a nuestros resultados, el alelo Ala12 se ha reportado como de protección para el desarrollo de nefropatía diabética en dos reportes previos en las poblaciones alemana y brasileña (Hermann *et al*, 2002) (Caramori *et al*, 2003). En ambos estudios, a diferencia del nuestro, se incluyeron tanto pacientes con estadios tempranos de nefropatía diabética como pacientes con IRCT. En el reporte de la población Brasileña, se sugiere la asociación de este polimorfismo a la IRCT, y en el segundo de la población alemana, la asociación a la IRCT no alcanzó significancia estadística. Lo anterior es relevante ya que distintos estudios han mostrado que los genes y loci de susceptibilidad a la nefropatía diabética y a la IRCT son aparentemente distintos (Placha *et al*, 2005).

Consistente con nuestros resultados un estudio en pacientes con DT2 de la Isla de Java en Indonesia mostró asociación del alelo Ala12 con distintas complicaciones vasculares como la presencia de infarto, la nefropatía y la neuropatía (Danawati *et al*, 2005).

Los mecanismos por los cuales la variante Pro12Ala del PPAR- γ 2 se vincula al desarrollo de IRCT en pacientes con DT2 no son conocidos. Estudios *in vitro* han mostrado que la proteína con la sustitución Ala12 tiene una reducción de la capacidad de unión a su elemento de respuesta en los distintos genes blanco y una disminución en su actividad de transactivación (Deeb *et al*, 1998). Por lo tanto, fenotipos deletéreos como la DT2 o la IRCT son más consistentes con la pérdida de función de la proteína (Hegele *et al*, 2000). En este sentido, las tiazolidinedionas (TZD), agonistas de PPAR- γ empleados como hipoglucemiantes orales han mostrado tener efectos benéficos en distintos tipos de daño renal tanto en modelos animales como en humanos (Chung *et al*, 2005) (Cuzzocrea, 2004). Adicionalmente, las TZD reducen la microalbuminuria en pacientes con DT2 (Imano *et al*, 1998) (Nakamura *et al*, 2001). Este efecto puede estar mediado a través de la inhibición de la proliferación celular por el factor de crecimiento plaquetario (Nicholas *et al*, 2001) y la disminución de la expresión de citocinas como el TNF- α o la IL-6 en condiciones de estrés inflamatorio (Xiong *et al*, 2004). Por lo tanto, un alelo con disminución de función como el alelo Ala12, es más consistente con la asociación a la IRCT en pacientes con DT2, observada en este estudio.

Sin embargo, las discrepancias observadas entre un posible efecto protector o deletéreo del alelo Ala12 sobre la nefropatía diabética pueden estar dadas por las diferencias étnicas en las poblaciones hasta ahora estudiadas, así como por el diseño del estudio, en particular por los fenotipos analizados (inclusión únicamente de pacientes con IRCT en nuestro estudio). Queda aún por determinar si este alelo es directamente responsable del desarrollo de la insuficiencia renal cónica, o si se trata de un marcador en desequilibrio de ligamiento con otra variante dentro del gen o en el mismo locus. En cualquier caso, el estudio de este polimorfismo tiene un potencial valor predictivo en la práctica clínica. Por lo tanto es importante a través de un estudio prospectivo a gran escala, estimar el riesgo de pacientes con DT2 portadores del alelo Ala12 de desarrollar IRCT, así como valorar el posible efecto benéfico de fármacos como los inhibidores de la ECA (enzima convertidora de angiotensina) en la prevención o retraso de la IRCT en pacientes.

Conclusiones

En síntesis, en este estudio se identificó al alelo Ala12 de PPAR- γ 2 asociado al riesgo al desarrollo de insuficiencia renal crónica terminal en pacientes mexicanos con diabetes tipo 2. La identificación de la variante Ala12 de PPAR- γ 2 como un alelo de riesgo para la IRCT contribuye al entendimiento de las bases moleculares de esta complicación crónica y tiene además un importante potencial predictivo. Más de la mitad de los pacientes en diálisis en nuestro país son diabéticos. La IRCT además de imponer una enorme carga a los sistemas de salud, tiene costos económicos y sociales muy elevados. La validación de este hallazgo en un estudio prospectivo permitirá contar con un marcador de riesgo molecular para la prevención o el retraso de la IRCT en pacientes mexicanos con DT2.

Bibliografía

ALTSHULER D, HIRSCHHORN JN, KLANNEMARK M, *et al*: The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 26:76-80, 2000

BERGER RJ, LEIBOWITZ MD, DOEBBER TW *et al*: Novel peroxisome activated receptor (PPARgamma) and PPARdelta ligands produce distinct biological effects. *JBC* 274: 6718-6725, 1999

BUFFONE GJ, DARLINGTON GJ: Isolation of DNA from biological specimens without extraction with phenol. *Clin Chem* 31:164-165, 1985

CANANI LH, GERCHMAN F, GROSS JL: Familial clustering of diabetic nephropathy in Brazilian type 2 diabetic patients. *Diabetes* 48:909-913, 1999

CARAMORI ML, CANANI LH, COSTA LA, *et al*: The human peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 (PPARgamma2) Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 52:3010-3013, 2003

COLE SA, MITCHELL BD, HSUEH WC, *et al*: The Pro12Ala variant of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 (PPAR-gamma2) is associated with measures of obesity in Mexican Americans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24:522-524, 2000

CUZZOCREA S: Peroxisome proliferator-activated receptors gamma ligands and ischemia and reperfusion injury. *Vascul Pharmacol* 41:187-95, 2004

[CHUNG BH](#), [LIM SW](#), [AHN KO](#), *et al*: Protective effect of peroxisome proliferator activated receptor gamma agonists on diabetic and non-diabetic renal diseases. *Nephrology* 10:S40-43, 2005

DANAWATI CW, NAGATA M, MORIYAMA H, *et al*: A possible association of Pro12Ala polymorphism in peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 gene with obesity in native Javanese in Indonesia. *Diabetes Metab Res Rev* 21:465-469, 2005

DEEB SS, FAJAS L, NEMOTO M, *et al*: A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet* 20:284-287, 1998

DESVERGNE B, WAHLI W: Peroxisome proliferator activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 20 649-688, 1999

Dirección General de Información y Evaluación del Desempeño, Secretaría de Salud: Estadísticas de mortalidad en México: muertes registradas en el año 2001. *Salud Pública de México* 44:565-576, 2003

FAJAS L, AUBOEUF D, RASPE E, *et al*: The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem* 272:18779-18789, 1997

- FAJAS L, FRUCHART JC, AUWERX J, *et al*: PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett* 438:55-60, 1998
- HAFFNER SM, MITCHELL BD, PUGH JA, *et al*: Proteinuria in Mexican Americans and non-Hispanic whites with NIDDM. *Diabetes Care* 12:530-536, 1989
- HASSTEDT SJ, REN QF *et al*: Effect of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 pro(12)ala variant on obesity, glucose homeostasis, and blood pressure in members of familial type 2 diabetic kindreds. *J.Clin Endo Metab* 86: 536-541, 2001
- HEGELE RA, CAO H, HARRIS SB, *et al*: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 P12A and type 2 diabetes in Canadian Oji-Cree. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2014-2019, 2000
- HERRMANN SM, RINGEL J, WANG JG, *et al*: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 polymorphism Pro12Ala is associated with nephropathy in type 2 diabetes: The Berlin Diabetes Mellitus (BeDiaM) Study. *Diabetes* 51:2653-2657, 2002
- HIROKI M, IKEGAMI H *et al*: Association of Pro12Ala polymorphism of PPAR γ gene with insuline resistance and related diseases. *Diab Res Clin Prac* 66: S63-S67, 2004
- IMANO E, KANDA T, NAKATANI Y, *et al*: Effect of troglitazone on microalbuminuria in patients with incipient diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 21:2135-2139, 1998
- IMPERATORE G, HANSON RL, PETTITT DJ, *et al*: Sib-pair linkage analysis for susceptibility genes for microvascular complications among Pima Indians with type 2 diabetes. Pima Diabetes Genes Group. *Diabetes* 47:821-830, 1998
- JPENBERG A, TAN NS, GELMAN L, *et al*; In vivo activation of PPAR target genes by RXR heterodimers. *EMBO J* 23: 2083-2091, 2004.
- KROLEWSKI AS, WARRAM JH, CHRISTLIEB AR, *et al*: The changing natural history of nephropathy in type I diabetes. *Am J Med* 78:785-794, 1985
- LEHMANN JM, MOORE LB, SMITH-OLIVER TA *et al*: An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome-activated receptor gamma(PPARgamma). *J Biol Chem* 270: 12953-12956, 1995
- LINDI VI, UUSITUPA MI, LINDSTROM J, *et al*: Association of the Pro12Ala polymorphism in the PPAR-gamma2 gene with 3-year incidence of type 2 diabetes and body weight change in the Finnish Diabetes Prevention Study. *Diabetes* 51:2581-2586, 2002
- MANCINI FP, VACCARO O, SABATINO L, *et al*: Pro12Ala substitution in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 is not associated with type 2 diabetes. *Diabetes* 48:1466-1468, 1999

MASUD S, YE S, SAS GROUP: Effect of the peroxisome proliferator activated receptor-gamma gene Pro12Ala variant on body mass index: a meta-analysis. *J Med Genet* 40:773-780, 2003

McCARTHY MI. Progress in defining the molecular basis of type 2 diabetes mellitus through susceptibility-gene identification. *Hum Mol Genet* 13 Spec No 1:R33-41, 2004

NAKAMURA T, USHIYAMA C, SUZUKI S, *et al*: Effect of troglitazone on urinary albumin excretion and serum type IV collagen concentrations in Type 2 diabetic patients with microalbuminuria or macroalbuminuria. *Diabet Med* 18:308-313, 1001

NICHOLAS SB, KAWANO Y, WAKINO S, *et al*: Expression and function of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in mesangial cells. *Hypertension* 37:722-727, 2001

PARRA EJ, HOGGART CJ, BONILLA C, *et al*: Relation of type 2 diabetes to individual admixture and candidate gene polymorphisms in the Hispanic American population of San Luis Valley, Colorado. *J Med Genet* 41:e116, 2004

PLACHA G, CANANI LH, WARRAM JH, *et al*: Evidence for different susceptibility genes for proteinuria and ESRD in type 2 diabetes. *Adv Chronic Kidney Dis* 12:155-169, 2005

[PUGH JA](#), [MEDINA RA](#), [CORNELL JC](#), *et al*: NIDDM is the major cause of diabetic end-stage renal disease. More evidence from a tri-ethnic community. [Diabetes](#) 44:1375-1380, 1995

RINCON-CHOLE H, THAMEEM F, LEHMAN DM, *et al*: Genetic basis of diabetic nephropathy. *Am J Ther* 12:555-561, 2005

RYCHLIK I, MILTENBERGER-MILTENYI G, RITZ E: The drama of the continuous increase in end-stage renal failure in patients with type II diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* 8:6-10, 1998

SALE MM, FREEDMAN BI: Genetic determinants of albuminuria and renal disease in diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* 21:13-6, 2006

SEAQUIST ER, GOETZ FC, RICH S, *et al*: Familial clustering of diabetic kidney disease. Evidence for genetic susceptibility to diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 320:1161-1165, 1989

World Health Organization-International Society of Hypertension: Guidelines for the management of hypertension. Guidelines Subcommittee. *J Hypertens* 17:151-183, 1999

XIONG Z, HUANG H, LI J, *et al*: Anti-inflammatory effect of PPARgamma in cultured human mesangial cells. *Ren Fail* 26:497-505, 2004

YEN CJ, BEAMER BA, NEGRI C, *et al*: Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma (hPPAR gamma) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR gamma 2 missense mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 241:270-274, 1997

ZIMMET P, ALBERTI KG, SHAW J. Global and social implications of the diabetic epidemic. *Nature* 414: 782-787, 2001

ZIMMET P. The burden of type 2 diabetes: are we doing enough? *Diabetes Metab* 2: 6S9-S18, 2003

ZHU Y, QI C, KORENBERG JR, *et al*: Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor γ (mPPAR γ) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR γ isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7921-7925, 1995

Anexos

Tabla 1. Características clínicas y determinaciones bioquímicas de los sujetos incluidos en el estudio

	IRCT		DT2/no-ND	Controles
	DT2	no-DT2		
<i>N</i>	111	49	46	131
Hombres (%)	55 (49)	24 (49)	19 (41)	64 (49)
Edad (años)	59.8 ± 9.8	40.5 ± 17.9*†	57.5 ± 13.4	57.7 ± 9.0‡
Evolución de la diabetes (años)	21.9 ± 10.1	---	16.4 ± 6.1*	---
IMC (kg/m ²)	ND	24.6 ± 7.2	26.7 ± 4.9	25.7 ± 3.0†
Glucosa plasmática en ayuno (mg/dl)	184.2 ± 108.6	89.2 ± 9.6*†	205.6 ± 90.9	88.6 ± 11.8*†

Promedio ± DS o *n* (%). **p*<0.001 comparada con DT2-IRCT, †*p*<0.001 comparada con DT2/no-ND, ‡*p*<0.001 comparada con IRCT-no-DT2/. ND no determinada.

Tabla 2. Distribución genotípica y frecuencias alélicas de la variante Pro12Ala de PPAR-γ2 en sujetos con IRCT y controles sanos

	Total IRCT	IRCT		Controles
		DT2	no-DT2	
Genotipo (<i>n</i>)	160	111	49	131
<i>Pro12Pro</i>	113 (0.706)	76 (0.685)	37 (0.755)	105 (0.801)
<i>Pro12Ala</i>	40 (0.250)	28 (0.252)	12 (0.245)	26 (0.198)
<i>Ala12Ala</i>	7 (0.044)	7 (0.063)	0	0
*Odds ratio (IC 95%)	1.68 (0.97-2.90)	1.86 (1.04-3.35)	1.31 (0.60-2.85)	
*valor de <i>p</i> vs. Controles	0.062	0.037	0.497	
Frecuencia alélica				
<i>Pro12</i>	266 (0.831)	180 (0.811)	86 (0.878)	236 (0.901)
<i>Ala12</i>	54 (0.169)	42 (0.189)	12 (0.122)	26 (0.099)
Odds ratio (IC 95%)	1.84 (1.12-3.02)	2.02 (1.19-3.40)	1.27 (0.61-2.62)	
Valor de <i>p</i> vs. Controles	0.015	0.008	0.524	

*De la comparación de Ala12Ala/Pro12Ala vs. Pro12Pro

Tabla 3. Distribución genotípica y frecuencias alélicas de la variante Pro12Ala en pacientes con DT2 y presencia o no de IRCT.

	DT2	
	IRCT	no-ND
Genotipo (n)	111	46
<i>Pro12Pro</i>	76 (0.685)	38 (0.826)
<i>Pro12Ala</i>	28 (0.252)	8 (0.174)
<i>Ala12Ala</i>	7 (0.063)	0
*Odds ratio (IC 95%)	2.25 (0.96-5.23)	
*Valor de p	0.061	
Frecuencia alélica		
<i>Pro12</i>	180 (0.811)	84 (0.913)
<i>Ala12</i>	42 (0.189)	8 (0.087)
Odds ratio (IC 95%)	2.33 (1.07-5.11)	
Valor de p	0.034	

* De la comparación de individuos con genotipo *Ala12Ala/Pro12Ala* vs. *Pro12Pro*

Tabla 4. Distribución genotípica del polimorfismo Pro12Ala de PPAR- γ 2 en sujetos DT2 y controles sanos

<i>Individuos</i>	<i>n</i>	Genotipo			<i>Frecuencia de Ala</i>	<i>p</i> *
		<i>Pro/Pro</i>	<i>Pro/Ala</i>	<i>Ala/Ala</i>		
DT2	157	114 (0.756)	36 (0.229)	7 (0.044)	0.159	
Controles	131	105 (0.801)	26 (0.199)	0	0.099	0.888

*Valor de p de la comparación de *Ala12Ala/Pro12Ala* vs. *Pro12Pro*. OR=1.06, IC 95% 0.56-2.00