

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO R230C DEL
GEN ABCA1 EN POBLACION ABIERTA”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
OSVALDO DANIEL CASTELAN MARTINEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA

ENERO DE 2008.



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.

DEDICATORIA

- **A madre Natividad de Jesús Martínez Martínez por iniciarme en este largo camino, así como a mi padre por hacer mí un hombre responsable.**
- **A mis hermanos Iván, Karen, Diana y Uriel por todo el apoyo, amor y su compañía en todo momento.**
- **A Silvia Rivas Contreras por todo su amor y comprensión en el desarrollo de este proyecto.**
- **A mis amigos Héctor, Flor, Carlos, Catalina, Rocío, Mario, Nemesio, Mariano, por su amistad incondicional en esta etapa de mi vida, de forma muy especial agradezco a Marcela su ayuda incondicional en todo momento.**

AGRADECIMIENTOS.

- **A cada uno de los sinodales Dr. Mario Altamirano Lozano, M. en C. Araceli García del Valle y ala M. en C. Raquel Retana Ugalde, el apoyo brindado en todo momento, así como sus valiosas aportaciones.**
- **A la Dra. Martha Legorreta Herrera por todas sus enseñanzas y por la confianza depositada en mí para la realización de este proyecto.**
- **A la Dra. Maria Teresa Tusié Luna por su asesoría en el desarrollo de este proyecto.**
- **Para la realización de este trabajo se contó con el financiamiento del proyecto PAPIME PE204105**

INDICE

1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCION.....	4
3. FUNDAMENTO TEÓRICO.....	5
3.1 Diabetes mellitus.....	5
3.2 Clasificación de la diabetes según su etiología genética.....	6
3.3 Complejidad genética de la diabetes tipo 2.....	7
3.4 Definición de las causas genéticas de la diabetes tipo 2 en la población mexicana.....	8
3.5 Síndrome metabólico.....	9
3.6 Gen ABCA1.....	11
3.7 Técnicas de biología molecular.....	15
3.7.1 Extracción de DNA.....	15
3.7.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	15
3.7.3 Electroforesis.....	19
3.7.4 Genotipificación del polimorfismo R230C.....	21
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
5. OBJETIVOS.....	23
5.1 Objetivo general.....	23
5.2 Objetivos particulares.....	23
6. HIPOTESIS.....	24
7. MATERIAL.....	25
7.1 Material Biológico.....	25
7.2 Material de laboratorio.....	25
7.3 Equipo.....	25
7.4 Reactivos.....	25
8. METODOLOGIA.....	27
8.2 Extracción de DNA.....	27
8.3 Amplificación.....	29
8.4 Electroforesis.....	30
8.5 Genotipificación del polimorfismo R230C.....	31
8.6 Análisis estadístico.....	31
9. RESULTADOS.....	32
9.1 Amplificación de los controles positivos y negativos.....	32
9.2 Amplificación de los controles positivos antes y después del corte con la enzima de restricción Bsp119I.....	33
9.3. Amplificación del DNA extraído de las muestras sanguíneas de personas voluntarias que participaron en el estudio.....	33
9.4 Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	34
9.5 Comparación de los parámetros clínicos y antropométricos con los diferentes genotipos obtenidos.....	35

9.6 Comparación de los genotipos con el padecimiento de diabetes y enfermedades asociadas.....	36
9.7 Asociación del polimorfismo R230C del gen ABCA1 con obesidad.....	37
10. DISCUSION DE RESULTADOS.....	38
11. CONCLUSION.....	41
12. ANEXOS.....	42
12.1 Abreviaturas.....	42
12.2. Preparación de reactivos.....	44
12.3 <i>Cuestionario</i>	46
13. BIBLIOGRAFIA.....	51

1. RESUMEN.

La epidemiología de la diabetes en México ha cambiado en menos de cuatro décadas, siendo actualmente un problema prioritario de salud en nuestro país. La diabetes tipo 2 representa la principal causa de muerte en mujeres y la segunda entre los hombres desde el año 2000 (Rull *et al*, 2005). Por esta razón es de suma importancia conocer las bases genéticas que condicionan el desarrollo de la enfermedad para el avance de nuevos tratamientos, así como para entender la influencia de los factores ambientales en la patogénesis de la enfermedad. En el presente trabajo se determinó el polimorfismo R230C del gen ABCA1 (ATP-binding cassette A1) asociado previamente con una mayor predisposición genética al desarrollo de la obesidad, la diabetes mellitus y la disminución en los niveles de la lipoproteína de alta densidad HDL. Para determinar la frecuencia del SNP (Single nucleotide polimorfism) se obtuvieron muestras sanguíneas de 115 personas voluntarias, de las cuales se aisló DNA utilizando papel FTA y se amplificó el polimorfismo a través de PCR.. La presencia del polimorfismo se evidenció con la digestión del producto de PCR obtenido empleando la enzima de restricción Bsp119I. Los fragmentos obtenidos se resolvieron en geles de poliacrilamida al 10% y los resultados obtenidos se visualizaron con una cámara de video acoplada a un transiluminador de luz UV. La frecuencia del polimorfismo en este estudio fue del 29.8 por ciento considerando tanto homocigotos como heterocigotos, Además no se encontró asociación del polimorfismo R230C con ninguno de los parámetros clínicos medidos en los personas participantes en el estudio, sin embargo se asoció con obesidad en el padre (P=0.003).

2. INTRODUCCION.

El alarmante incremento en la prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 (DT2) y otras características asociadas como la obesidad, la hipertensión y las dislipidemias en la población en general han llegado a ser un reto para los sistemas de salud de todo el mundo, principalmente por el enorme impacto socio-económico de la enfermedad. En México existen aproximadamente 3.6 millones de casos de diabetes mellitus (Olaiz *et al*, 2003). Por lo que comprender las bases genéticas de esta enfermedad representa una de las estrategias de tratamiento más prometedoras, además, la identificación de los genes involucrados en el desarrollo de DT2 es esencial para comprender la influencia de los factores ambientales en la patogénesis de la enfermedad.

La diabetes mellitus incluye un grupo de enfermedades que se caracterizan por el incremento de los niveles de glucosa causada por un daño en la secreción y/o la acción de la insulina, lo que origina daño tisular crónico y disfunción de diferentes órganos. La diabetes mellitus tipo 1 (DT1) se caracteriza por la deficiencia absoluta de secreción de insulina, en general es el resultado de una destrucción autoinmune de las células beta del páncreas. Por otro lado, la diabetes mellitus tipo 2 presenta una disminución progresiva de la secreción de insulina por las células beta del páncreas, lo que genera resistencia periférica a la insulina ocasionando incremento en la demanda de esta hormona.

La obesidad es un factor de riesgo para muchos rasgos metabólicos. El gen ABCA1 se ha propuesto como candidato para el síndrome metabólico porque los resultados sugieren asociación con la resistencia a la insulina además de niveles bajos de HDL-C (High Density Lipoprotein-Cholesterol) y riesgo cardiovascular (Phillips *et al*, 2006). La alta frecuencia de la variante funcional R230C de ABCA1 en la población mexicana provee la oportunidad de determinar asociación con niveles bajos de HDL-C, así como con otros rasgos clínicos y metabólicos (Villarreal *et al*, 2007). Además, la asociación de la variante R230C con el índice de masa corporal en mexicanos es más fuerte que la observada con los niveles bajos de HDL-C, finalmente, la variante es más frecuente en personas diabéticas y presenta un incremento en el riesgo de cuatro veces con respecto a los que no la presentan (Villarreal *et al*, 2007).

3. FUNDAMENTO TEÓRICO.

3.1 Diabetes mellitus.

La diabetes mellitus es un grupo de enfermedades metabólicas que se caracterizan por hiperglucemia como resultado de defectos en la secreción de insulina, la acción de la insulina o ambas. La hiperglucemia crónica de la diabetes se asocia con daño a largo plazo, disfunción y deterioro en varios órganos, especialmente en ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos (The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes Mellitus, 2003). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que el número de diabéticos se incrementará de 135 a 300 millones en los próximos 25 años. En México en el año 2000 habían 3.6 millones de casos (Olaiz *et al*, 2003).

Los síntomas de la hiperglucemia incluyen la poliuria, la polidipsia, la pérdida de peso, algunas veces con polifagia y visión borrosa (The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes Mellitus , 2003). A largo plazo las complicaciones de diabetes incluyen retinopatía con potencial pérdida de la visión; nefropatía que conduce a falla renal; neuropatía periférica con riesgo de úlceras en los pies y amputaciones, neuropatía autónoma que ocasiona disfunción gastrointestinal, genitourinaria y disfunción sexual (The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes Mellitus, 2003).

Se conocen dos grandes grupos de diabetes: 1) la diabetes tipo 1 (DT1) y 2) la diabetes tipo 2 (DT2). La primera aparece a una edad promedio de 12 años, sin obesidad, con tendencia a la pérdida de peso, a la acidosis y peligro de coma; los pacientes requieren insulina, y se considera una enfermedad autoinmune ya que es posible evidenciar anticuerpos dirigidos contra componentes de la célula β pancreática en la mayoría de los casos (Atkinson y Maclaren, 1994).

La DT2 es el término utilizado para los individuos quienes pueden o no cursar con resistencia a la insulina aunado a deficiencia secretoria de insulina de grado variable (Reaven *et al*, 1976). La mayoría de los pacientes con este tipo de diabetes son obesos y la obesidad por si sola es causa de algún grado de resistencia a la insulina (Bogardus *et*

al, 1985). La resistencia a la insulina puede mejorar con la reducción de peso y/o el tratamiento farmacológico que no incluye insulina, lo que permite disminuir el número de complicaciones de la enfermedad (Henry *et al*, 1986).

3.2 Clasificación de la diabetes según su etiología genética.

Aunque la diabetes se clasifica de acuerdo a criterios clínicos. Con base en su etiología genética la diabetes mellitus se puede clasificar en tres categorías principales (Tusie Luna, 2005):

1. Diabetes Monogénica. Esta ocurre como resultado de la alteración de un solo gen.

a) El defecto genético afecta la función de las células β -pancreáticas.

-MODY

- Diabetes neonatal

b) Defectos genéticos que alteran la acción de la insulina.

2. Diabetes Poligénica. Es el resultado del efecto de diversos genes alterados, cada uno con un efecto aditivo.

a) DT1 se origina por la destrucción autoinmune de las células β -pancreáticas originando la deficiencia absoluta de insulina (insulina-dependiente).

b) DT2 se debe a varias alteraciones involucradas con la síntesis, secreción y acción de la insulina, además de la producción de glucosa hepática. Comúnmente, más de uno de estos procesos está alterado en varios grados y la deficiencia de insulina no es absoluta (no insulina-dependiente). Este es el tipo de diabetes más frecuente, más del 90% de todos los casos.

3. Diabetes Mitocondrial. Esta forma se origina por mutaciones en el genoma mitocondrial.

3.3 Complejidad genética de la diabetes mellitus tipo 2.

En la mayoría de los pacientes, la DT2 es el resultado de alteraciones en varios genes, cada uno con un efecto parcial y aditivo. Sin embargo, una proporción significativa de casos de DT2 (5-10%) son el resultado por la alteración de un solo gen (Bell y Polonsky, 2001). Las formas monogénicas de diabetes generalmente se expresan en todos los individuos que presentan la mutación. En contraste, en la DT2 poligénica los factores ambientales juegan un importante papel favoreciendo o retrasando el desarrollo de la enfermedad.

En la DT2 poligénica, los genes involucrados en el desarrollo de la enfermedad (genes de susceptibilidad) ejercen solo un efecto parcial, de este modo el efecto de un solo gen no es suficiente para que se desarrolle la diabetes. Solo el efecto aditivo de estos genes, en ciertas combinaciones, confiere susceptibilidad genética. La enfermedad solo se desarrollara cuando ciertos factores de riesgo promueven su expresión, tal como la obesidad, el estilo de vida sedentario o las dietas ricas en grasas.

En las dos últimas décadas, el mapa genético y los modelos animales han demostrado que la DT2 es una enfermedad heterogénea en donde diferentes genes y combinaciones de estos confieren susceptibilidad. Por ejemplo, las regiones cromosómicas identificadas como loci de susceptibilidad a DT2 son diferentes en las poblaciones caucásicas y asiáticas (Witlshine *et al.*, 2001) se ha demostrado que aunque clínicamente la diabetes tipo 2 parece una sola entidad, realmente es un grupo de enfermedades con diferentes causas genéticas (Mori *et al.*, 2002) (Fig 1).

Las estrategias del mapeo genético permitieron identificar a la calpaína-10 como el primer gen asociado con susceptibilidad para la DT2, hecho que llevo a ser evidencia segura de la influencia de genes de susceptibilidad en diferentes poblaciones, el papel específico y la naturaleza de estas variantes parece diferir entre ellas (Lynn *et al.*, 2002; Cox, 2002).

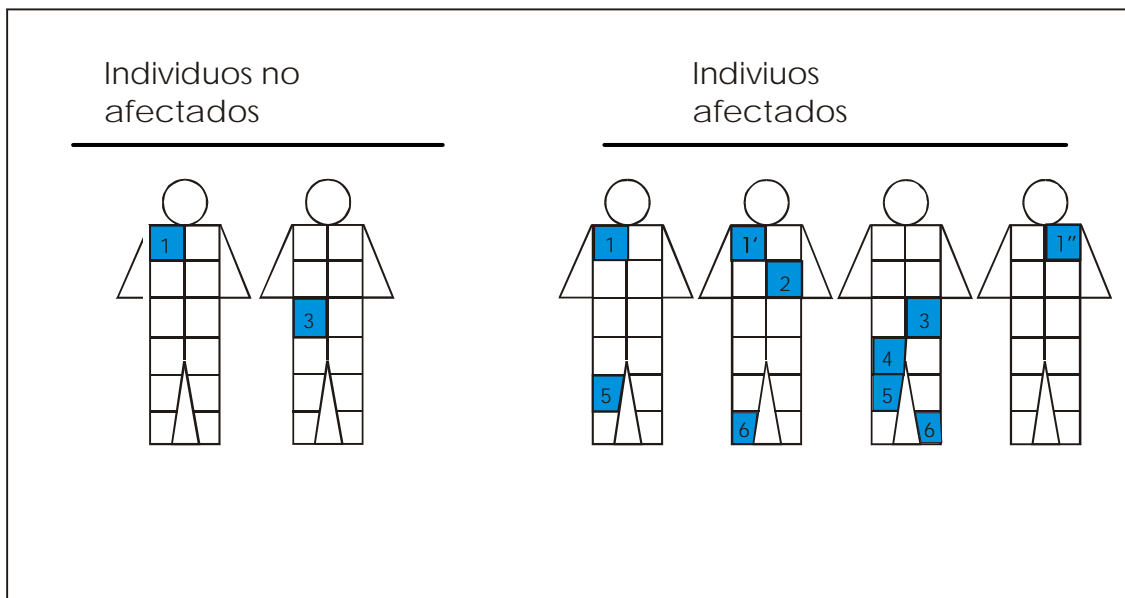


Figura 1. Complejidad Genética de la diabetes tipo 2. En la mayoría de los pacientes, la DT2 ocurre como resultado de una sutil alteración de varios genes (con mayor frecuencia polimorfismos de un solo nucleótido o SNP's). Diferentes genes de susceptibilidad (cuadros azules) están involucrados en el desarrollo de la enfermedad y el número y combinaciones de estos genes pueden ser distintos entre pacientes diabéticos. Los individuos sanos pueden portar genes de susceptibilidad y no desarrollar diabetes porque el efecto individual de cada gen no es suficiente para causar la expresión de la enfermedad. En la figura, el gen 1 participa como un gen de susceptibilidad en dos individuos diferentes. La mutación es diferente en cada individuo y se representa como variante 1 y 1'. Ocasionalmente uno de estos genes puede ser responsable para el desarrollo de diabetes (variante 1''). Ejemplos de este tipo de genes son aquellos que codifican para la glucocinasa, el factor nuclear de hepatocitos 1 α (HNF-1 α) y el factor transcripcional IPF-1, asociados a formas monogénicas de diabetes tipo 2. (tomado de Tusie Luna, 2005)

3.4 Definición de las causas genéticas de la diabetes mellitus tipo 2 en la población mexicana.

La prevalencia de diabetes en México ha crecido diez veces en los últimos 25 años, y actualmente es una de las más altas en todo el mundo (10.9%). En México catorce por ciento de los pacientes desarrollan la enfermedad antes de los 40 años (Rull *et al*, 2005). Esto sugiere que la población mexicana muestra una alta susceptibilidad a desarrollar diabetes, tal vez debido al tipo y número de genes involucrados, la influencia de los factores ambientales tal como cambios en el estilo de vida, la migración continua

de sujetos de áreas rurales a urbanas y la adquisición de hábitos dietéticos más occidentales.

Al analizar la participación de los genes previamente asociados con MODY en pacientes mexicanos, se encontró que solo se explicaba el 10% de la diabetes de aparición temprana en nuestra población (Aguilar Salinas *et al*, 2001). En la población mexicana se ha identificado una región en el cromosoma 2 que muestra una fuerte asociación a diabetes tipo 2, cuando se realizó un estudio de casos y controles en la misma población, se identificó una combinación de haplotipos definidos por tres variantes intrónicas en el locus de la calpaína-10 (CAPN10) que están asociados con un incremento significativo en la susceptibilidad de diabetes tipo 2.

La diabetes es una enfermedad compleja y genéticamente heterogénea. La identificación de genes de susceptibilidad y variantes en las secuencia necesariamente requiere el uso de diferentes metodologías que nos acerque a entender la patogénesis de la diabetes, ya que la definición de las bases genéticas de la diabetes podrá tener un impacto en la práctica clínica, por lo que, comprender la complejidad de la enfermedad que tiene diferentes causas genéticas permitirá desarrollar nuevas estrategias de tratamiento adecuado para cada paciente. Acercarnos al conocimiento de la etiología genética de la DT2 eventualmente resultará en una mejor calidad de vida y en una reducción significativa de la carga socio-económica que representa la enfermedad.

3.5 Síndrome metabólico

El síndrome metabólico es una enfermedad muy común asociada con incremento en el riesgo a padecer DT2 y enfermedades cardiovasculares (Phillips *et al*, 2006). Es un grupo heterogéneo de desordenes metabólicos, que tienen como componente central la resistencia a la insulina (Roche *et al*, 2005). La organización mundial de la salud (Alberti y Zimmet, 1998) definió el síndrome metabólico como el daño a la sensibilidad a la insulina, intolerancia a la glucosa o diabetes mellitus, en combinación con al menos dos trastornos metabólicos más, que incluyen la obesidad

abdominal, la dislipidemia, concentraciones plasmáticas de HDL-C y/o concentraciones plasmáticas elevadas de triglicéridos, hipertensión y microalbuminuria.

Los múltiples blancos genéticos involucrados con la patogénesis y progresión del síndrome metabólico podrían estar relacionados a la disfunción de la célula β -pancreática, la acción de la insulina, el metabolismo de la glucosa, la hipertensión, el metabolismo de lípidos y de lipoproteínas (Barroso *et al*, 2003).

En paralelo con el incremento en la incidencia de DT2, la incidencia de obesidad y del síndrome metabólico han aumentado de forma alarmante en el mundo y el resultado es un incremento en enfermedades cardiovasculares y muerte prematura (Isomaa *et al*, 2001). Es importante destacar que el genoma humano no ha cambiado en los últimos diez años, sin embargo la incidencia del síndrome metabólico se ha incrementado de forma exponencial, lo cual explica la importancia del medio ambiente en la patogénesis (Figura 2) (Roche *et al*, 2005). La obesidad se ha identificado como la clave etiológica que condiciona y predispone el desarrollo del síndrome metabólico (Kahn y Flier, 2000).



Figura 2. Desarrollo y progresión del síndrome metabólico. Modificada de Roche *et al*, 2005

3.6 Gen ABCA1.

El gen ABCA1 (de las siglas en inglés ATP-binding cassette transporter subfamilia A1) se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 9 y codifica una proteína clave que regula el transporte del colesterol y la formación de HDL (por sus siglas en inglés High Density Lipoprotein) (Santamarina *et al*, 2001). Los defectos en el gen ABCA1 ocasionan deficiencias genéticas raras como son la enfermedad de Tangier y la hipoalfalipoproteinemia familiar (FHA) (Brook-Wilson *et al*, 1999). Se han descrito distintas variaciones genéticas comunes en el gen ABCA1 asociadas con anomalías de los niveles de lípidos en el suero, especialmente con la disminución de los niveles en suero de HDL-colesterol (HDL-C), así como con el riesgo de enfermedad arterial coronaria por aterosclerosis (CAD) (Clee *et al*, 2001). Debido a que el descenso de los niveles plasmáticos de HDL-C se observa generalmente en la diabetes mellitus y esta condición se considera parte del mecanismo para la resistencia a la insulina, los polimorfismos del gen ABCA1 pueden estar asociados con la diabetes mellitus (Daimon *et al*, 2005).

En la diabetes tipo dos existe una relativa incapacidad del páncreas endocrino para secretar suficiente insulina y satisfacer el aumento de la demanda metabólica, lo que origina resistencia a la insulina que se asocia con obesidad y envejecimiento (Bruham *et al*, 2007). Sin embargo, el mecanismo preciso que origina la disfunción de las células β apenas empieza a entenderse. Un mecanismo propuesto es la lipotoxicidad, en la cual la acumulación de lípidos es tóxica, lo que conduce a la apoptosis de las células beta y a la pérdida de la secreción de insulina (Unger, 1995). Los triglicéridos y los ácidos grasos libres saturados (FFA's), tal como el palmitato, incrementan la producción de ceramida que puede inducir la disfunción de la célula beta y su muerte (Zhou *et al*, 1995), sin embargo el papel del colesterol en la modulación de la función y la supervivencia de la célula beta ha recibido poca atención (Bruham *et al*, 2007).

La proteína ABCA1 desempeña un papel crítico en la regulación de la homeostasis intracelular del colesterol (Oram y Lawn, 2001). El gen ABCA1 se expresa en las células beta y su ausencia, da como resultado la acumulación celular del colesterol con una marcada reducción en la secreción de la insulina *in vivo* y el deterioro progresivo en la tolerancia a la glucosa (Bruham *et al*, 2007). El defecto en la secreción de la insulina no se debe a la reducción en el número de las células beta, porque ABCA1 no está involucrado en el desarrollo de los islotes o en el mantenimiento de número de estas células (Bruham *et al*, 2007). La ausencia ABCA1 origina una disminución en el flujo de colesterol que da como resultado su acumulación intracelular en la membrana citoplasmática (Chakravarthy y Semenkovich, 2007) (Figura 3). En apoyo de este concepto, se ha demostrado que los individuos con diabetes tipo 2 tienen una mayor frecuencia de polimorfismos relacionados a la pérdida de función ABCA1 en comparación con la población normoglucémica (Daimon *et al*, 2005)

La alta frecuencia de la variante funcional R230C de ABCA1 en la población mexicana provee la oportunidad de determinar posibles asociaciones con niveles bajos de HDL-C, así como con otros rasgos clínicos y metabólicos (Villarreal *et al*, 2007).

El gen ABCA1 es un candidato para explicar el origen del síndrome metabólico debido a que se ha demostrado asociación con la resistencia a la insulina (Phillips *et al*, 2006). La variante R230C se ha asociado con obesidad y por ende con el

síndrome metabólico, además, la variante es más frecuente en personas diabéticas con un incremento en el riesgo de cuatro veces con respecto a los que no la presentan (Villarreal *et al*, 2007).

Recientemente la variante R230C se caracterizó como un alelo de riesgo para el desarrollo de diabetes tipo 2 en la población mexicana, interesantemente la asociación fue significativamente mayor en el grupo de aparición temprana (OR=3.776), esto es relevante ya que una proporción importante de los sujetos diabéticos en México presentan la enfermedad antes de los 40 años (Villarreal *et al*, 2007).

El polimorfismo de un solo nucleótido R230C (rs9282541) se encuentra en el exon 7 del gen ABCA1 y denota el cambio de una citosina por una timina, dando como resultado el cambio del aminoácido arginina por cisteína en la posición 230 de la proteína ABCA1. La naturaleza de los aminoácidos involucrados es muy diferente; mientras la arginina es un aminoácido básico, cargado positivamente e hidrofílico, la cisteína es hidrofóbica y contiene un grupo sulfhídrico (Villareal *et al*, 2007), lo cual sugiere un cambio de funcionalidad de la proteína ABCA1.

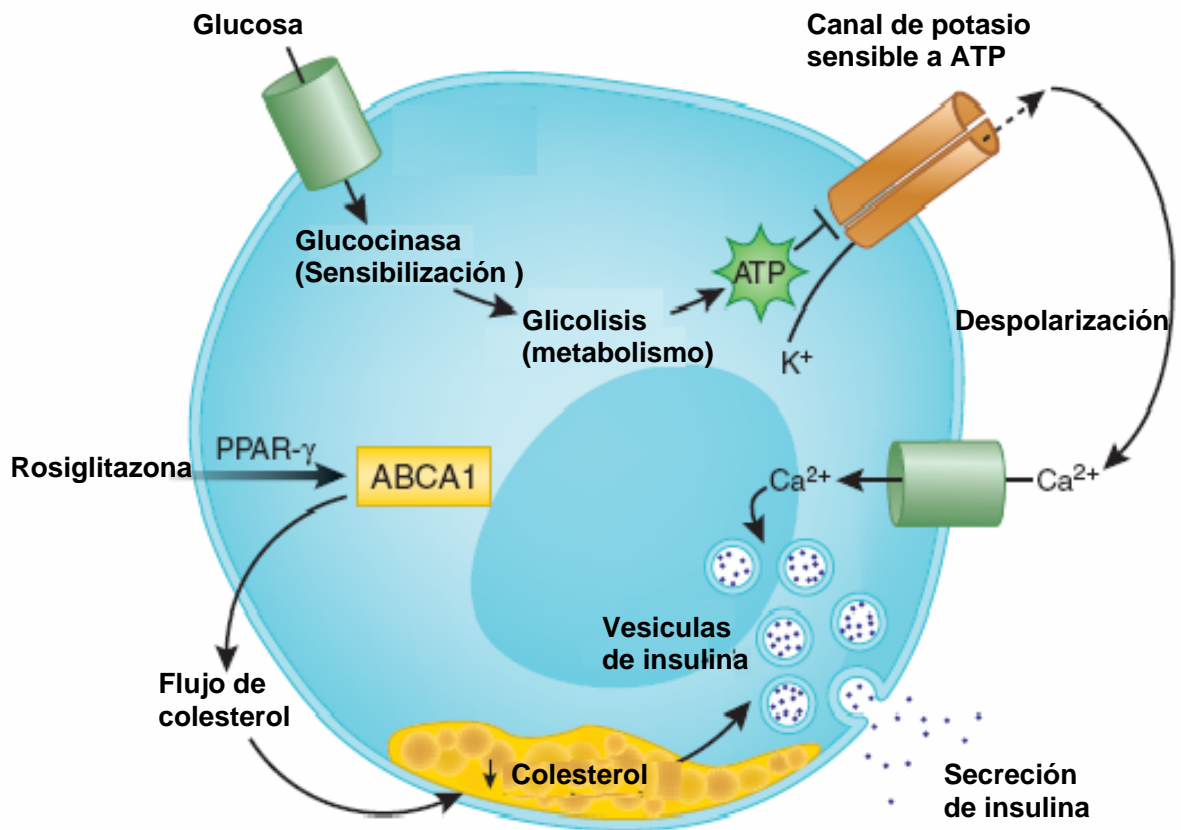


Figura 3. Vías involucradas en la secreción de insulina en las células β -pancreáticas. La vía “clásica” involucra un transportador de glucosa (conocido como transportador de glucosa 2, GLUT2), sensibilizado por glucocinasa y el metabolismo (glicólisis) para producir ATP, lo cual permite el cierre de los canales de K^+ sensibles a ATP. Esta despolarización de la membrana citoplasmática abre los canales voltaje-dependientes de Ca^{++} , la entrada de Ca^{++} causa la exocitosis de insulina. La proteína ABCA1 en las células β es crítica para la secreción de insulina por la modulación de la homeostasis del colesterol intracelular. Este efecto es independiente del transportador de glucosa, la sensibilización y el metabolismo. El incremento en la secreción mediada por el fármaco rosiglitazona (el cual activa PPAR- γ) requiere el ABCA1, lo que sugiere que la regulación de los niveles de colesterol en la membrana afecta la función de las células β en la diabetes mellitus tipo 2. Tomado y modificado de Chakravarthy y Semenkovich, 2007.

3.7 Técnicas de biología molecular.

3.7.1 Extracción de DNA.

Las técnicas para el análisis del DNA se han extendido en muchas áreas de la investigación. Desafortunadamente el transporte de las muestras del punto de la recolección implica riesgos y la posibilidad de que se degraden de la muestra debido a la variación en la temperatura, además que la sangre es un excelente medio de cultivo para diversos microorganismos. El DNA extraído también se puede degradar en el laboratorio, lo que origina problemas para el re-análisis de las muestras (Smith y Burgoyne, 2004).

En este protocolo se utiliza el papel FTA® para el almacenamiento de las muestras biológicas de sangre. Estas tarjetas se emplean en la identificación humana forense (Vanek *et al* 2001, Hsiao *et al* 1999). El proceso requiere de un lavado simple "*in-situ*", en donde las impurezas se eliminan y la muestra de DNA se conserva en el papel. El almacenaje del material en estos papeles permite la reutilización del DNA en cualquier momento, además de espacio-eficiente de almacenaje a temperatura ambiente y un transporte barato de la muestra por correo. La facilidad de transporte y del almacenaje de muestras en seco hace al papel un medio práctico para que los investigadores adquieran colecciones grandes de muestras de referencia (Smith y Burgoyne, 2004).

3.7.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa, cuyas iniciales en inglés son PCR ("Polymerase chain reaction"), es una técnica que desarrollo Kary Mullis a mediados de los años 80. Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de DNA específico (Mackay *et al*, 2002).

El método utiliza un par de oligonucleótidos sintéticos también conocidos como primers, iniciadores o cebadores, cada uno hibrida a una hebra del DNA blanco de doble cadena (dsDNA), este par extiende una región que se puede reproducir

exponencialmente. El primer hibridado actúa como un sustrato para la enzima DNA polimerasa, sintetiza una hebra complementaria mediante la adición secuencial de desoxiribonucleótidos (Mackay *et al*, 2002).

La secuencia de los oligonucleótidos iniciadores es responsable de la amplificación específica del fragmento deseado, y para su diseño es indispensable conocer la secuencia del DNA blanco. Este es uno de los parámetros más importantes que determina la especificidad de la PCR, su elección y diseño debe ser muy cuidadoso. Idealmente, en cada 100µl de la reacción, la concentración aceptable de cada oligonucleótido oscila entre 0.05 y 1.0 µM, el uso de concentraciones mayores favorece la amplificación de regiones inespecíficas y la formación de dímeros de oligonucleótidos (Barrera *et al* 1993, Rodríguez y Barrera 2004).

La PCR es tan sensible que la amplificación puede hacerse teóricamente a partir de una sola molécula de DNA. Los genes de una sola copia en el genoma se pueden amplificar fácilmente. La concentración de DNA blanco en la reacción depende de la fuente utilizada, e idealmente se requieren aproximadamente 10^5 copias de DNA blanco, esto es, de 300 ng a 1 µg de DNA genómico humano (Barrera *et al* 1993, Innis *et al* 1990).

La enzima DNA polimerasa termoestable que más se utiliza para la PCR es la *Taq* (aislada a partir de la bacteria *Thermophilus aquaticus*, que habita en aguas termales). Su índice de error en la incorporación es de 1 a 4×10^{-4} bases y amplifica sin dificultad segmentos de hasta 3000 pb (Barrera *et al* 1993, Rodríguez y Barrera 2004).

La concentración de iones magnesio también es importante en la especificidad de la reacción. Concentraciones muy altas conducen a una baja especificidad, dando como resultado productos indeseables, mientras que las concentraciones mínimas necesarias disminuyen el índice de incorporaciones erróneas de nucleótidos. El ion Mg^{2+} se utiliza como cofactor para la actividad enzimática de la mayoría de las DNA polimerasas. Para una reacción estándar se recomienda utilizar una concentración final de $MgCl_2$ entre 0.5 y 2.5 mM (Barrera *et al* 1993, Innis *et al* 1990).

Al igual que el $MgCl_2$, las concentraciones mínimas necesarias de dNTP's disminuyen el índice de incorporaciones erróneas de nucleótidos, mientras que las concentraciones muy altas disminuyen la especificidad de la reacción, por lo que la concentración de dNTP's también debe optimarse. Concentraciones entre 20 y 200 μ M proporcionan resultados óptimos, se debe igualar la concentración de cada uno de los cuatro dNTP's (Barrera *et al* 1993, Innis *et al* 1990).

Teóricamente, en condiciones óptimas el nivel de amplificación del DNA en la PCR aumenta en forma exponencial con cada ciclo; sin embargo en la práctica, después de determinado número de ciclos, la amplificación se detiene gradualmente. Entra primero a una fase lineal y luego a una estacionaria, a la que se denomina fase de "meseta" se debe al agotamiento de la actividad enzimática y a la insuficiencia para llevar a cabo la extensión del número masivo de complejos DNA blanco-oligonucleótidos, presentes en los ciclos que anteceden a este fenómeno. Esto puede evitarse si se aumenta el tiempo de extensión en los últimos ciclos de la reacción o la cantidad de la enzima, aunque lo recomendable es ajustar el número de ciclos de tal manera que la amplificación se realice al obtenerse los niveles máximos de amplificación en una reacción que presente comportamiento lineal. El número de ciclos promedio oscila entre 20 y 30, dependiendo de la cantidad de DNA inicial (Barrera *et al* 1993, Innis *et al* 1990). Las temperaturas de desnaturalización varían de 92 a 98°C y las de extensión (70 a 74°C) generalmente son estándares para todas las reacciones. La temperatura que tiene el efecto más crítico en la especificidad es la de alineación, la cual está determinada principalmente por la temperatura media de fusión (T_M) de los oligonucleótidos (Barrera *et al* 1993).

Los oligonucleótidos se aparean a una determinada temperatura de alineación por complementaridad al DNA blanco. El alto grado de complementaridad entre las bases nitrogenadas de los oligonucleótidos y del DNA blanco permite utilizar altas temperaturas de alineación, lo que favorece la especificidad de la reacción (Barrera *et al* 1993, Innis *et al* 1990). Cuando esta temperatura es muy baja existe mayor probabilidad de que los oligonucleótidos se apareen a regiones no específicas del DNA blanco y que también se extiendan, toda vez que la polimerasa *Taq* posee actividad aún a bajas temperaturas. Utilizando temperaturas de hibridación entre 55 a 65°C se reducen grandemente los sucesos de apareamiento inespecífico (Barrera *et al* 1993) (Figura 4).

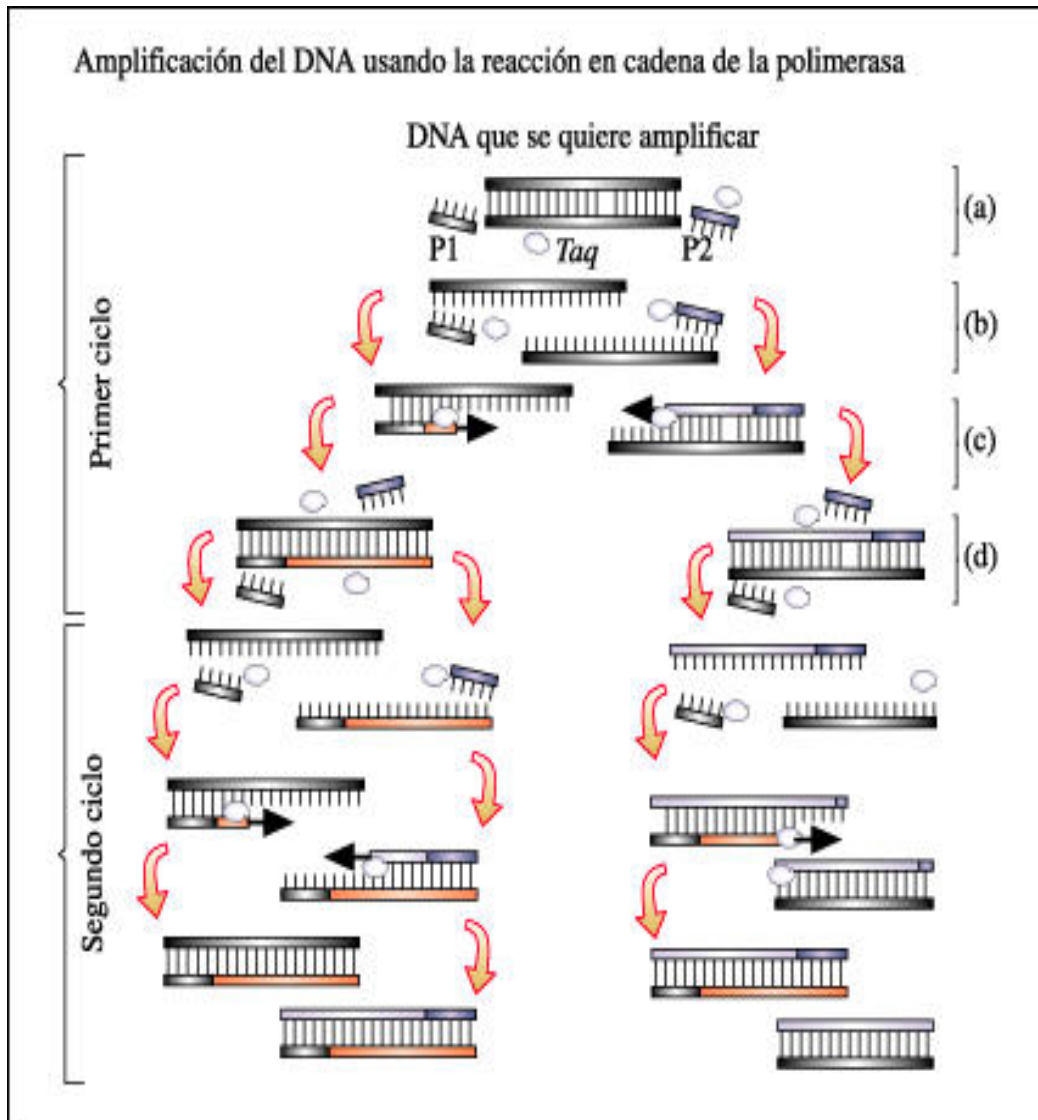


Figura 4 .- Reacción en cadena de la polimerasa. a). La mezcla de reacción contiene la secuencia de DNA que se quiere amplificar, dos oligonucleótidos sintéticos (P1 y P2) que servirán como cebadores, una DNA polimerasa termoestable (Taq) y los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato -dATP, dGTP, dCTP y dTTP-. b). La mezcla de reacción se somete a ciclos sucesivos, durante la desnaturalización, que se realiza por calentamiento de la mezcla a 95 °C, se separan las dos cadenas del DNA molde. c). Durante la hibridación, la temperatura se reduce para permitir el apareamiento de las bases de ambos cebadores en el sitio donde encuentran una secuencia complementaria. d). Durante la fase de elongación, la mezcla se calienta a 72 °C, temperatura a la cual la DNA polimerasa extiende la cadena complementaria a partir del extremo 3' de los cebadores. Al finalizar cada ciclo, la cantidad de DNA molde disponible para el ciclo siguiente aumenta al doble. Tomado de www.educa.aragob.es/iescarin/depart/biogeno

3.7.3 *Electroforesis*

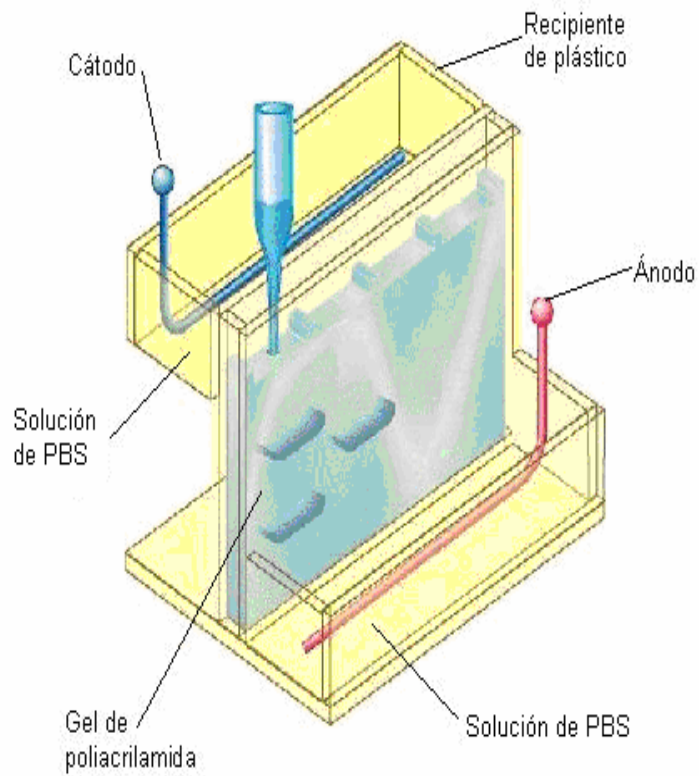
Cerca del pH neutro, las moléculas de DNA tienen una carga negativa y por ende migran hacia el electrodo positivo durante la electroforesis en gel. Debido a que la matriz del gel restringe la difusión aleatoria de las moléculas, las que tienen la misma longitud migran juntas como una banda cuyo ancho iguala al del carril en el que se colocó la mezcla de DNA original al comienzo del corrimiento electroforético. Las moléculas más pequeñas se mueven más rápidamente que las grandes, de manera que las moléculas de diferentes tamaños migran como bandas distintivas (Lodish *et al*, 2005).

Después de finalizada la electroforesis, es posible detectar las moléculas de DNA por medio de la tinción del gel con colorantes fluorescentes, como el bromuro de etidio, que se une al DNA y se intercala entre los pares de bases. La unión concentra al etidio en el DNA y también incrementa su fluorescencia intrínseca, como resultado, cuando el gel se ilumina con la luz ultravioleta, las regiones del gel que contienen DNA fluorescen con mayor intensidad que las regiones del gel sin DNA (Lodish *et al*, 2005).

Se utilizan dos tipos alternativos de matrices de gel: la poliacrilamida y la agarosa. La poliacrilamida tiene una capacidad elevada de resolución pero solo puede separar las moléculas de DNA dentro de un intervalo de tamaño estrecho. Por lo tanto, la electroforesis a través de poliacrilamida puede diferenciar moléculas de DNA que solo difieren en un par de bases pero únicamente cuando la molécula tiene hasta algunos cientos de pares de bases. La agarosa tiene una potencia resolutiva menor que la poliacrilamida pero permite diferenciar moléculas de DNA que cuentan con decenas o incluso centenas de kilopares de bases (Watson *et al*, 2006) (figura 5).

Electroforesis en gel de poliacrilamida

La migración del ADN depende de su carga y su peso molecular.



Las bandas se revelan con Bromuro de etidio

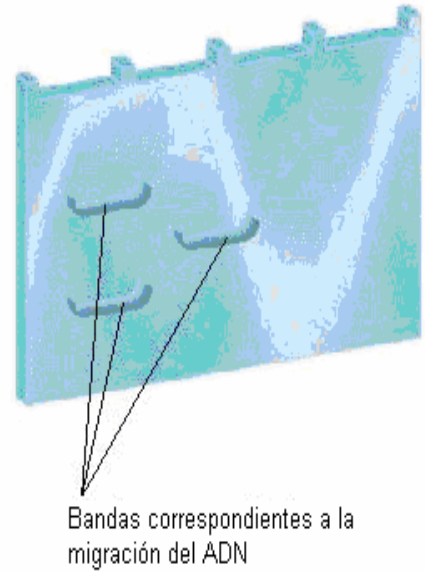


Figura 5.- Esquema de la electroforesis en gels de poliacrilamida. Modificado de <http://almez.cnice.mecd.es/tema1/electroforesis.JPG>

3.7.4 Genotipificación del polimorfismo R230C

Las endonucleasas de restricción (ER) son enzimas que escinden las moléculas de DNA de doble hélice en sitios determinados por medio del reconocimiento de secuencias específicas. En los casos típicos las enzimas de restricción que se emplean en biología molecular reconocen secuencias cortas (4-8 pb), que por lo general son palíndromos y las cortan en una posición determinada dentro de la secuencia (Watson *et al.*, 2006) (Figura 6).

Para realizar la genotipificación del polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) R230C del gen ABCA1 se utilizó un primer mutagénico que inserta una mutación en el producto obtenido en la amplificación por PCR, con esta modificación del primer antisentido se introducen dos adeninas en lugar de dos timinas, si a esto se le suma la presencia de una citocina presente en el genotipo que no presenta el polimorfismo R230C, entonces se crea un sitio de restricción para la endonucleasa Bsp119I. Por lo tanto aquellas personas que presentan el polimorfismo R230C no generan el sitio de restricción para la endonucleasa y por consiguiente el producto obtenido de la amplificación no se corta por la enzima.

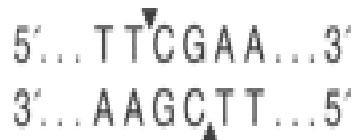


Figura 6.- Sitio de corte de la enzima Bsp119I

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El cambio demográfico y epidemiológico por el cual está pasando México ha conducido a que la población tenga una mayor esperanza de vida, por lo que se observa un crecimiento elevado de la población adulta mayor, en quienes el riesgo de morir por enfermedades crónico degenerativas se incrementa. El aumento en la incidencia de enfermedades como la diabetes mellitus y otras características asociadas como es la obesidad, la hipertensión y las dislipidemias en la población en general es un reto importante para el sistema de salud, debido al enorme impacto socioeconómico de estas enfermedades.

En México, la mortalidad por diabetes ha mostrado un incremento sostenido durante las últimas décadas hasta llegar a ocupar el primer lugar de mortalidad en mujeres y el segundo lugar en hombres. Además en México el catorce por ciento de las personas con diabetes desarrollan la enfermedad antes de los 40 años de edad lo cual sugiere que la población mexicana muestra una alta susceptibilidad a desarrollar diabetes, tal vez, debido al tipo y número de genes involucrados, a los factores ambientales como son el cambio en el estilo de vida y la adquisición de hábitos dietéticos más occidentalizados. Un motivo adicional de inquietud es que la enfermedad suele aparecer casi siempre con problemas de obesidad o sobrepeso; el 85% de los diabéticos en México presentan esta característica.

Por otro lado la diabetes, al igual que otras enfermedades, como la hipertensión, la obesidad y la aterosclerosis tiene un claro componente genético. Se han identificado distintos genes y regiones cromosómicas que confieren susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad. Comprender las bases genéticas de la diabetes puede tener un impacto importante en la práctica clínica, entendiendo a la diabetes como una enfermedad multifactorial con diferentes causas genéticas, lo que permitirá la identificación de tratamientos más apropiados con un mejor pronóstico para cada paciente. Vislumbrar el componente genético de la diabetes conducirá a un incremento en la sobrevivencia y una mejor calidad de vida; disminuirá significativamente el costo socioeconómico de la enfermedad, además permitirá implementar la prevención primaria de la enfermedad dirigida principalmente a disminuir los factores de riesgo modificables en personas sanas, para retardar o prevenir la aparición de la enfermedad.

5. OBJETIVOS.

5.1 Objetivo general.

Determinar la frecuencia con la que se encuentra distribuido el polimorfismo R230C del gen ABCA1 en una muestra de la población abierta.

5.2 Objetivos particulares

❖ Establecer la frecuencia del polimorfismo R230C en una muestra de población abierta.

❖ Evaluar si existe correlación entre el índice de masa corporal y la presencia del polimorfismo R230C

❖ Conocer si se presenta alguna correlación entre la presencia del polimorfismo R230C y el incremento en la presión sanguínea tanto sistólica como diastólica.

6. HIPOTESIS.

El polimorfismo R230C del gen ABCA 1 se asoció previamente con un mayor riesgo a padecer DT2, además de asociarse con un incremento en el índice de masa corporal y el riesgo de presentar síndrome metabólico en la población mestiza mexicana, entonces, determinar la frecuencia de esta variante en una muestra de sujetos jóvenes de la población abierta podría evidenciar su asociación a alguno de estos rasgos particularmente un mayor índice de masa corporal y un mayor diámetro de cintura..

7. MATERIAL.

7.1 Material Biológico

- Muestras de sangre proveniente de 115 voluntarios
- DNA humanos controles positivos y negativos para el polimorfismo R230C.

7.2 Material de laboratorio.

- Guantes de látex.
- Cubre bocas
- Probeta de 25mL, 50mL y 1000mL
- Puntas para micropipetas: 10 μ L, 200 μ L, 1000 μ L, nuevas libres de nucleasas y estériles.
- Tubos Eppendorf: 1.5 mL, nuevos y estériles.
- Tijeras
- Vasos de precipitados de 50mL, 100mL y 1000mL.

7.3 Equipo

- Balanza analítica, Scientech
- Cámara de electroforesis Bio-Rad.
- Campana de flujo laminar, Veco
- Fuente de Poder Bio-Rad
- Microcentrífuga, Eppendorf 5415C
- Micropipetas Eppendorf: 2.5 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 1000 μ L.
- Micropipetas Gilson: p20, p200, p1000.
- Micro-Punch, Harris
- Termociclador, Eppendorf
- Vortex Genie 2, Daigger
- Transiluminador.
- Analizador de geles Bio-Rad

7.4 Reactivos

- Ácido bórico, USB.
- Agua destilada estéril.
- Agua calidad Millipore.

- Acrilamida ICN.
- Amortiguador PCR 10X
- APS al 10%
- Bis acrilamida, Sigma.
- Bromuro de etidio Sigma
- Cloruro de magnesio 25mM, Sigma.
- dNTP's (desoxirribonucleótidos de trifosfato), Pharmacia.
- Etanol al 70% Merck.
- EDTA, Sigma.
- EDTA 0.5M pH 8.0
- Ficoll, Sigma
- Gelatina 20 mg/mL, Sigma.
- Marcador de peso de molecular 50 pb promega
- Mezcla de Primers o cebadores 20 μ M, para detectar al gen
Foward: GTC TGT GCA ATG GAT CAA AAT CA
Reverse: GCT TCA GGA TGT CCA TGT TGG TTC
- Sacarosa, Sigma
- SDS (Dodecilsulfato de sodio), Sigma
- Reactivo duodecil sulfato de sodio 10% y EDTA pH 8.0 0.5M.
- Solución de carga sin colorante.
- Solución de acrilamida/Bisacrilamida al 30%
- Taq polimerasa 5 U/ μ L (AmpliTaq DNA polimerasa), Roche
- TEMED
- TBE 10X
- TBE 1X
- Tris, GibcoBRL
- Tris pH 8.0 2.0M

8. METODOLOGIA.

A 115 personas voluntarias que acudieron al laboratorio de inmunología molecular con 12 horas de ayuno se les tomaron 10 mL de sangre, además de medidas antropométricas (talla, la circunferencia del abdomen, la circunferencia de la cadera y su peso). Todos los voluntarios llenaron un cuestionario del que se recavo información sobre su estatus socio-cultural, su lugar de origen, antecedentes familiares, alimentación y algunos síntomas asociados con la obesidad y la diabetes mellitus. Todos los participantes firmaron un consentimiento informado para la utilización de su material genético..

8.1 Medidas antropométricas.

El perímetro de la cintura de cada persona participante en el estudio se obtuvo midiendo la circunferencia a la altura de la última costilla flotante y el perímetro máximo de la cadera a nivel de los glúteos. Con estos datos se calculo el índice cintura cadera (ICC) dividiendo la circunferencia de la cintura en centímetros entre el perímetro de la cadera en centímetros.

El índice de masa corporal (IMC) se obtuvo de la división de la masa en kilogramos entre el cuadrado de la estatura expresada en metros.

8.2 Extracción de DNA.

Se realizó la extracción de DNA para los 115 voluntarios utilizando papel FTA, como se indica a continuación:

- Se limpió perfectamente el área de trabajo con etanol al 70%, se utilizaron guantes y cubrebocas. No se permitió la presencia de corrientes de aire.
- Se etiquetó sobre el papel FTA el nombre y la clave correspondiente a cada persona voluntaria.

- Se limpió la superficie donde se realizó la punción con etanol al 70%, se permitió evaporar el etanol y con una lanceta estéril se realizó una punción sobre el dedo.
- El papel FTA se humedeció con las gotas de sangre llenando la totalidad del área delimitada por el círculo.
- Se dejó secar la sangre.
- Se rotularon tubos eppendorf de 1.5 mL con la clave correspondiente a cada voluntario.
- Se realizaron perforaciones de 1mm de diámetro en el papel FTA con ayuda de un microperforador (micro-puncher).
- Se colocaron de 5 círculos de 1mm del papel FTA con sangre dentro del tubo eppendorf, según su clave correspondiente.
- Se adicionaron 200 μ L del reactivo duodecil sulfato de sodio 10% y EDTA pH 8.0 0.5M.
- Se agitó a temperatura ambiente a baja velocidad en el vortex por 5 minutos.
- Se decantó con cuidado el reactivo, limpiando con un papel absorbente limpio el remanente del reactivo de la boca del tubo.
- Se adicionaron 200 μ L de agua destilada estéril libre de nucleasas a cada muestra. Se lavó a temperatura ambiente a baja velocidad en el vortex por 5 minutos.
- Se decantó el agua, limpiando con un papel absorbente el remanente del agua de la boca del tubo.
- Se repitió el paso anterior una vez más.
- El agua se retiró con ayuda de una micropipeta y una punta de 1000 μ L con mucho cuidado.
- Los tubos se cubrieron con papel parafilm y se realizaron pequeñas perforaciones. Se colocaron los tubos en el termociclador a 55°C hasta que se secaron completamente.

8.3 Amplificación.

- Se realizó la mezcla de reacción como se indica en la tabla, adecuando la cantidad de cada reactivo de acuerdo con el número de reacciones realizadas por corrida.

Reactivo	Para 1 reacción	Concentración por reacción	Para 40 reacciones.
H ₂ O calidad Millipore	13.65 µL	-----	546 µL
Amortiguador PCR 10X	2.0 µL	1 X	80 µL
25mM de MgCl ₂	2.0 µL	2.5 µM	80 µL
5mM de dNTP's	1.0 µL	200 nM	40 µL
5 U/µL de Taq	0.1 µL	0.5 U	4 µL
Mezcla de oligonucleótidos sentido y antisentido	0.25 µL	250 nM	10 µL
Volumen total	19 µL	-----	760 µL

- La mezcla de reacción se preparó en un tubo eppendorf de 1.5 mL y posteriormente se fraccionó en alícuotas de 19 µL en tubos de 0.2 mL.
- Se adicionaron dos círculos de papel FTA previamente tratado para la extracción del DNA de cada voluntario a su tubo correspondiente. Por cada serie de reacciones se adicionaron tres controles negativos (sin DNA).
- La amplificación del gen se realizó en el termociclador de acuerdo con el siguiente programa de ciclaje:

- 1.- 94 °C por 5 minutos.
- 2.- 55 °C por 2 minutos.
- 3.- 72 °C por 2 minutos.
- 4.- 94 °C por 45 segundos.
- 5.- Repertir del paso 2 al 4, 35 ciclos.
- 6.- 55 °C por 2 minutos.
- 7.- 72 °C por 5 minutos.
- 8.- 20 °C por 50 minutos- Terminar.

En cada ensayo se corrieron 25 muestras de las personas voluntarios, tres controles positivos y seis controles negativos.

8.4 Electroforesis

- Se prepararon geles de poliacrilamida al 10%.
- A cada tubo de la reacción de PCR, se le adicionaron 10 μ L de solución de carga 5X, se agitó con ayuda de la micropipeta hasta que se obtuvo una mezcla homogénea.
- Se cargaron 10 μ L de cada mezcla en cada pozo del gel de poliacrilamida (se utilizó un pozo por cada amplificación).
- En un tubo eppendorf de 0.5mL se realizó una dilución 1:20 del marcador de peso molecular de 50 pb y se agregaron 10 μ L de la solución de carga 5X. Se adicionan 5 μ L de esta mezcla en un pozo del gel de poliacrilamida.
- Se efectuó el corrimiento electroforético a 170 volts por 90 minutos.
- El gel se tiñó con bromuro de etidio por cuatro minutos (6 μ L de la solución 100 mg/mL, por cada 100 mL de agua destilada).
- Se eliminó la solución de tinción y el gel se lavo con agua destilada por cuatro minutos.
- El gel se colocó en el transiluminador que se encuentra acoplado al analizador de geles.

8.5 Genotipificación del polimorfismo R230C.

- En un tubo eppendorf se preparó la mezcla de reacción para la digestión según el número de reacciones que se realizaron se adicionaron los siguientes reactivos:

Reactivo	1 Rx	30 Rx
Agua libre de nucleasas	3.5 μL	105 μL
Buffer Tango 10X	1.0 μL	30 μL
Endonucleasa Bsp119I	0.5 μL	15 μL

- Se mezcló y separó la mezcla de reacción en alícuotas de 5 μL .
- En un sitio diferente de donde se realizó la amplificación se agregaron 5 μL del producto de PCR de cada muestra a su tubo correspondiente para la digestión con la enzima de restricción. Se agitó suavemente.
- Se incubó la mezcla de reacción para la digestión durante 2 horas a 37 °C.
- Para evidenciar la presencia del polimorfismo del gen se realizó un corrimiento electroforético, de la misma forma en la se realizó para la amplificación del gen.

8.6 Análisis estadístico.

Los cálculos se realizaron utilizando el paquete estadístico SPSS versión 10 (SPSS Chicago, II). Las medias, desviaciones estándar y frecuencias se calcularon de las medidas obtenidas y de datos obtenidos en el cuestionario. El análisis de covarianza se utilizó para construir un modelo cuantitativo. La edad, el género, el tabaquismo y diabetes mellitus tipo 2 (DT2) se incluyeron como covariantes y el genotipo se incluyó como factor fijo en el modelo (GLM univariado).

Las diferencias entre la frecuencia de los alelos, genotipos y fenotipos en las personas estudiadas, así como, el equilibrio de Hardy-Weinberg se analizaron con la prueba de χ^2 . De las 115 personas que participaron en el estudio 11 fueron excluidas del análisis estadístico para evitar sesgos por consanguinidad.

9. RESULTADOS.

9.1 Amplificación de los controles positivos y negativos.

Se preparó la mezcla de reacción para la amplificación del fragmento del gen ABCA1 que incluye el polimorfismo R230C tal como se describe en materiales y métodos. Se adicionaron 19 μ L de la mezcla de reacción a cada tubo eppendorf, se adicionó 1 μ L de DNA de cada uno de los controles positivos y en los tubos etiquetados como controles negativos, se adicionó 1 μ L de agua, después de 35 ciclos a los amplicones obtenidos se les adicionó solución amortiguadora de carga y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%, los resultados se muestran en la figura 7.

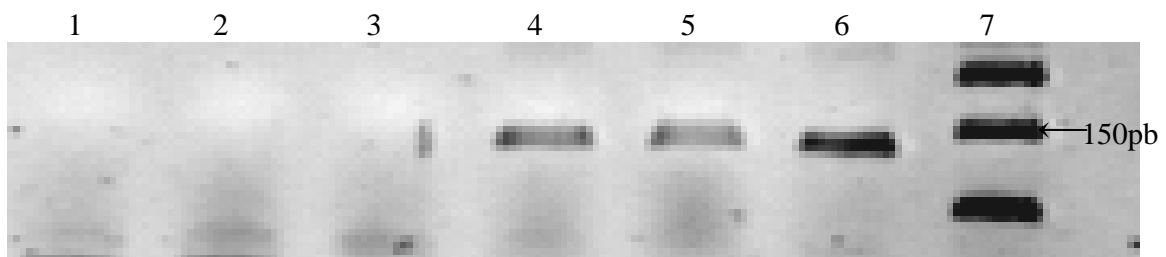


Figura 7. Electroforesis de controles negativos y controles positivos. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% de controles negativos (Mezcla se reacción sin DNA) carriles 1 al 3. En los carriles 4, 5 y 6 se muestra el corrimiento electroforético del amplicón obtenido de tres controles positivos. Las muestras control positivos amplificaron un producto de PCR de 135pb. En el carril 7 se observa el marcador de peso molecular en escalera de 50pb.

9.2 Amplificación de los controles positivos antes y después del corte con la enzima de restricción Bsp119I.

Para determinar si en los controles positivos (fragmentos de DNA de sujetos que presentan el polimorfismo de forma homocigoto o heterocigoto previamente analizados por secuenciación directa) se presentaba el sitio de restricción de la enzima Bsp119I, los controles positivos se sometieron a amplificación con la mezcla de reacción y los amplicones así obtenidos se digirieron con la enzima de restricción Bsp119I tal y como se describe en materiales y métodos. Los resultados se presentan en la figura 8.

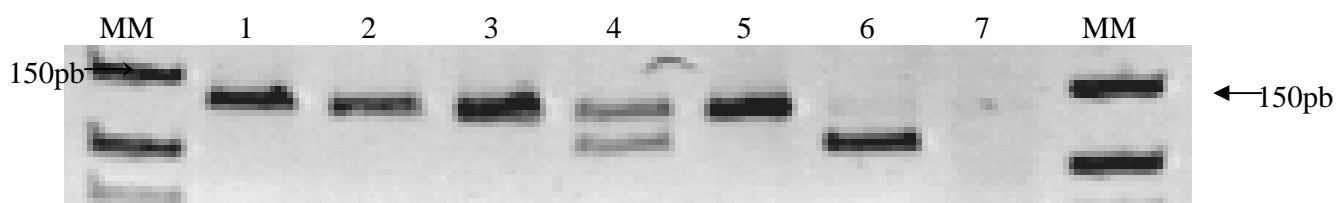


Figura 8. Corrimiento electroforético del producto de PCR antes y después de la digestión con la endonucleasa de restricción Bsp119I. Gel de acrilamida al 10% del corrimiento de los amplicones de los controles positivos antes y después del corte con la enzima de restricción Bsp119I. Carriles 1 y 2 corresponden al control con el genotipo C230C antes y después de la digestión respectivamente; carriles 3 y 4 son la amplificación del control con el genotipo R230C antes y después del corte con la enzima; carriles 5 y 6 corresponden a la amplificación del control con el genotipo R230R antes y después de la digestión; carril 7 control negativo (sin DNA); carriles MM, marcador de peso molecular de 50bp.

9.3. Amplificación del DNA extraído de las muestras sanguíneas de personas voluntarias que participaron en el estudio.

El DNA de cada voluntario se extrajo de las muestras sanguíneas con la metodología mencionada en materiales y métodos. La amplificación se realizó utilizando la misma mezcla de reacción para los controles positivos y negativos. La digestión de cada amplicón se realizó con la endonucleasa de restricción Bsp119I de acuerdo con lo establecido en el apartado de metodología. En cada corrida se amplificaron 25 muestras de DNA de personas voluntarias, 3 controles positivos y 7

controles negativos. El figura 9 muestra los amplicones antes y después de la digestión con la enzima de restricción Bsp119I de las muestras de DNA de algunos voluntarios.

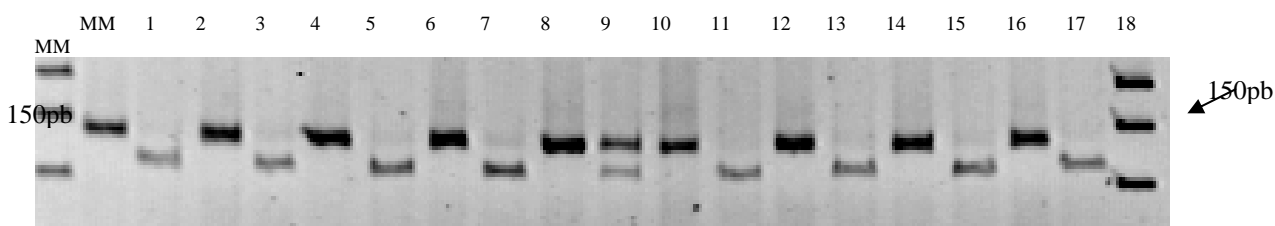


Figura 9. Corrimiento electroforetico de amplicones antes y después de la digestión con la endonucleasa Bsp119I. Gel de acrilamida al 10% del corrimiento del producto de PCR obtenido a partir del DNA de personas voluntarias antes y después del corte con la endonucleasa de restricción Bsp119I. Carril 1 y 2 corresponden a la muestra 84 antes y después del corte con la enzima, respectivamente. Carril 3 y 4 corresponden a la muestra 85 antes y después del corte con la enzima, respectivamente. En los carriles 5 y 6 se observa la muestra 86 antes y después de la digestión con la enzima. Carril 7 y 8 corresponden a la muestra 87 antes y después del corte con la enzima, respectivamente. En los carriles 9 y 10 se muestra la amplificación del voluntario número 88 antes y después del corte con la enzima, respectivamente. Carriles 11 y 12 corresponden al amplicon de muestra 89 antes y después de la digestión con la enzima. Carril 13 y 14 corresponden a la muestra 90 antes y después del corte con la enzima, respectivamente. En los carriles 15 y 16 se encuentran los productos de PCR de la muestra 91 antes y después de la digestión con la enzima. El amplicón de los carriles 17 y 18 pertenece a la muestra 92 antes y después del corte con la enzima, respectivamente. Los carriles MM corresponden al marcador de peso molecular de 50pb.

9.4 Equilibrio de Hardy-Weinberg

Se calculó el equilibrio de Hardy-Weinberg a partir de las frecuencias alélicas y genotípicas para conocer si la muestra analizada es representativa de la población en general (tabla 1).

Tabla 1. Frecuencias alélicas y genotípicas

Genotipo	(%)	Alelo	(%)
RR	67.04	R	80
RC	32.91	C	20
CC	4.04	P= 0.00022	

RR individuos homocigotos para el alelo común, RC individuos heterocigotos para el polimorfismo y CC individuos homocigotos para el alelo raro. R alelo común y C, es el alelo raro. P de la comparación de los genotipos de acuerdo a las frecuencias esperadas y las observadas del equilibrio de Hardy-Weinberg.

9.5 Comparación de los parámetros clínicos y antropométricos con los diferentes genotipos obtenidos.

Se relacionaron los diferentes genotipos obtenidos con los parámetros clínicos y antropométricos evaluados (Peso, talla, IMC, cintura, cadera, ICC, TAS y TAD y edad). No se observó diferencia significativa entre las personas que presentaban el polimorfismo (R230C/C230C) y las personas que no presentaron el polimorfismo (tabla 2).

Tabla 2. Asociación de los genotipos con lo parámetros clínicos medidos

Característica	R230R	R230C/C230C	P
Número	73	31	
Hombres (%)	64.5	56.2	0.516
Edad	26.0 ± 8.38	24.5 ± 7.1	0.495
Peso	65.3 ± 14.6	64.0 ± 10.8	0.859
Talla	1.62 ± 0.09	1.60 ± 0.08	0.557
IMC	24.5 ± 4.1	24.8 ± 4.3	0.929
Cintura	84.8 ± 12.1	83.1 ± 11.0	0.785
Cadera	98.0 ± 13.7	99.2 ± 8.5	0.920
ICC	0.85 ± 0.07	0.80 ± 0.06	0.589
TAS	109.0 ± 11.9	107 ± 10.1	0.686
TAD	68.3 ± 9.2	68.5 ± 8.1	0.530

IMC es el índice de masa corporal, ICC es el índice cintura cadera, TAS es la tensión arterial sistólica y TAD es la tensión arterial diastólica. Los valores representan la media + la desviación estandar. El valor de P compara a R230C/C230C con R230R con la prueba de χ^2 , los valores se ajustaron a edad, genero, tabaquismo y diabetes mellitus tipo 2

9.6 Comparación de los genotipos con el padecimiento de diabetes y enfermedades asociadas.

Se compararon los genotipos obtenidos de acuerdo a la presencia o no de DT2, dislipidemias, obesidad e hipertensión arterial, utilizando la información obtenida del cuestionario que cada persona lleno para participar en el estudio. Además los genotipos se compararon con el padecimiento de alguna de estas enfermedades por parte de sus padres, los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Frecuencia de genotipos

Enfermedad	R230R	%	R230C/C230C	%	P
Diabetes	1.4		0		1.000
Dislipidemias	2.7		3.2		1.000
Obesidad	19.2		15.2		0.306
Hipertensión arterial	4		0		0.315
Diabetes en el padre	20.9		22.2		0.545
Dislipidemias en el padre	11.7		23.1		0.2
Obesidad en el padre	18.2		50		0.003*
Diabetes en la madre	13		20		0.377
Dislipidemias en la madre	9.6		14.8		0.479
Obesidad en la madre	30.4		51.7		0.066

Los valores representan el porcentaje de cada enfermedad por genotipo. El valor de P compara a R230C/C230C con R230R con la prueba de χ^2 .

9.7 Asociación del polimorfismo R230C del gen ABCA1 con obesidad

Se realizó un modelo de herencia dominante para determinar si la presencia del polimorfismo (R230C/C230C) aumenta el riesgo a la obesidad. Los genotipos C230C/R230C no fueron más frecuentes en personas obesas con respecto a las no obesas en la población analizada (tabla 4).

Tabla .4 Asociación del polimorfismo R230C con obesidad

Obesidad	Genotipo n (%)		OR	IC 95%	P
	R230R	C230C/R230C			
Personas obesas	14 (60.9)	9 (39.1)	0.58	0.22-1.53	0.000
Personas no obesas	59 (72.8)	22 (27.2)			

OR del inglés Odds Ratio, IC es el intervalo de confianza. El valor de P se ajusto a edad, genero, tabaquismo y diabetes mellitus tipo 2

9. RESULTADOS.

9.1 Amplificación de los controles positivos y negativos.

Se preparó la mezcla de reacción para la amplificación del fragmento del gen ABCA1 que incluye el polimorfismo R230C tal como se describe en materiales y métodos. Se adicionaron 19 μ L de la mezcla de reacción a cada tubo eppendorf, se adicionó 1 μ L de DNA de cada uno de los controles positivos y en los tubos etiquetados como controles negativos, se adicionó 1 μ L de agua, después de 35 ciclos a los amplicones obtenidos se les adicionó solución amortiguadora de carga y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%, los resultados se muestran en la figura 7.

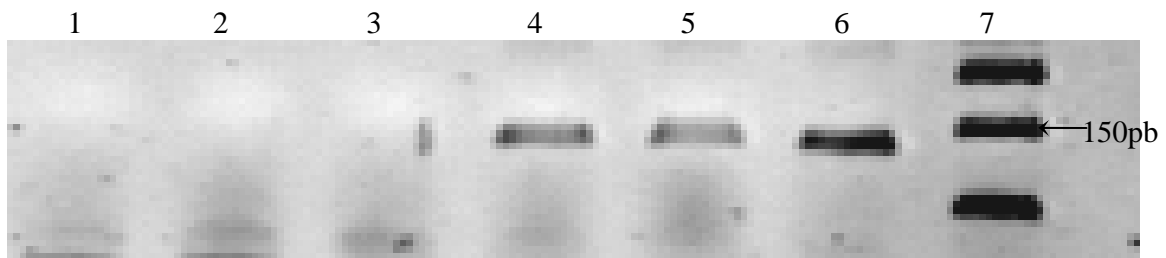


Figura 7. Electroforesis de controles negativos y controles positivos. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% de controles negativos (Mezcla se reacción sin DNA) carriles 1 al 3. En los carriles 4, 5 y 6 se muestra el corrimiento electroforético del amplicón obtenido de tres controles positivos. Las muestras control positivos amplificaron un producto de PCR de 135pb. En el carril 7 se observa el marcador de peso molecular en escalera de 50pb.

9.2 Amplificación de los controles positivos antes y después del corte con la enzima de restricción Bsp119I.

Para determinar si en los controles positivos (fragmentos de DNA de sujetos que presentan el polimorfismo de forma homocigoto o heterocigoto previamente analizados por secuenciación directa) se presentaba el sitio de restricción de la enzima Bsp119I, los controles positivos se sometieron a amplificación con la mezcla de reacción y los amplicones así obtenidos se digirieron con la enzima de restricción Bsp119I tal y como se describe en materiales y métodos. Los resultados se presentan en la figura 8.

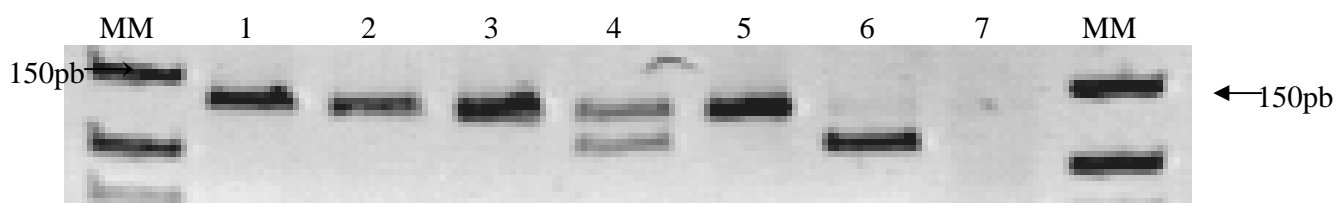


Figura 8. Corrimiento electroforético del producto de PCR antes y después de la digestión con la endonucleasa de restricción Bsp119I. Gel de acrilamida al 10% del corrimiento de los amplicones de los controles positivos antes y después del corte con la enzima de restricción Bsp119I. Carriles 1 y 2 corresponden al control con el genotipo C230C antes y después de la digestión respectivamente; carriles 3 y 4 son la amplificación del control con el genotipo R230C antes y después del corte con la enzima; carriles 5 y 6 corresponden a la amplificación del control con el genotipo R230R antes y después de la digestión; carril 7 control negativo (sin DNA); carriles MM, marcador de peso molecular de 50bp.

9.3. Amplificación del DNA extraído de las muestras sanguíneas de personas voluntarias que participaron en el estudio.

El DNA de cada voluntario se extrajo de las muestras sanguíneas con la metodología mencionada en materiales y métodos. La amplificación se realizó utilizando la misma mezcla de reacción para los controles positivos y negativos. La digestión de cada amplicón se realizó con la endonucleasa de restricción Bsp119I de acuerdo con lo establecido en el apartado de metodología. En cada corrida se amplificaron 25 muestras de DNA de personas voluntarias, 3 controles positivos y 7

controles negativos. El figura 9 muestra los amplicones antes y después de la digestión con la enzima de restricción Bsp119I de las muestras de DNA de algunos voluntarios.

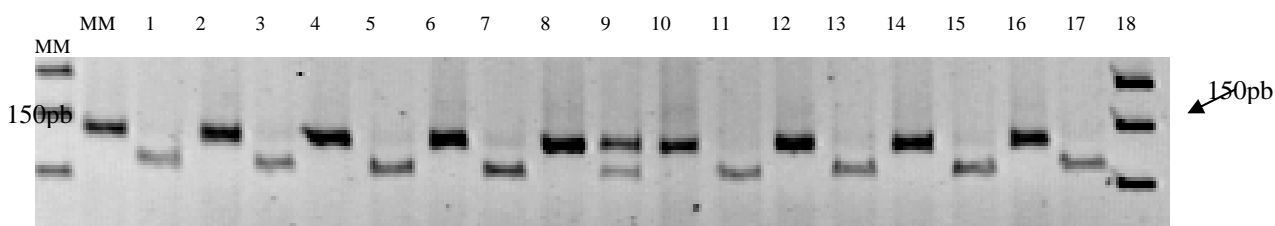


Figura 9. Corrimiento electroforetico de amplicones antes y después de la digestión con la endonucleasa Bsp119I. Gel de acrilamida al 10% del corrimiento del producto de PCR obtenido a partir del DNA de personas voluntarias antes y después del corte con la endonucleasa de restricción Bsp119I. Carril 1 y 2 corresponden a la muestra 84 antes y después del corte con la enzima, respectivamente. Carril 3 y 4 corresponden a la muestra 85 antes y después del corte con la enzima, respectivamente. En los carriles 5 y 6 se observa la muestra 86 antes y después de la digestión con la enzima. Carril 7 y 8 corresponden a la muestra 87 antes y después del corte con la enzima, respectivamente. En los carriles 9 y 10 se muestra la amplificación del voluntario número 88 antes y después del corte con la enzima, respectivamente. Carriles 11 y 12 corresponden al amplicon de muestra 89 antes y después de la digestión con la enzima. Carril 13 y 14 corresponden a la muestra 90 antes y después del corte con la enzima, respectivamente. En los carriles 15 y 16 se encuentran los productos de PCR de la muestra 91 antes y después de la digestión con la enzima. El amplicón de los carriles 17 y 18 pertenece a la muestra 92 antes y después del corte con la enzima, respectivamente. Los carriles MM corresponden al marcador de peso molecular de 50pb.

9.4 Equilibrio de Hardy-Weinberg

Se calculó el equilibrio de Hardy.Weinberg a partir de las frecuencias alélicas y genotípicas para conocer si la muestra analizada es representativa de la población en general (tabla 1).

Tabla 1. Frecuencias alélicas y genotípicas

Genotipo	(%)	Alelo	(%)
RR	67.04	R	80
RC	32.91	C	20
CC	4.04	P= 0.00022	

RR individuos homocigotos para el alelo común, RC individuos heterocigotos para el polimorfismo y CC individuos homocigotos para el alelo raro. R alelo común y C, es el alelo raro. P de la comparación de los genotipos de acuerdo a las frecuencias esperadas y las observadas del equilibrio de Hardy-Weinberg.

9.5 Comparación de los parámetros clínicos y antropométricos con los diferentes genotipos obtenidos.

Se relacionaron los diferentes genotipos obtenidos con los parámetros clínicos y antropométricos evaluados (Peso, talla, IMC, cintura, cadera, ICC, TAS y TAD y edad). No se observó diferencia significativa entre las personas que presentaban el polimorfismo (R230C/C230C) y las personas que no presentaron el polimorfismo (tabla 2).

Tabla 2. Asociación de los genotipos con los parámetros clínicos medidos

Característica	R230R	R230C/C230C	P
Número	73	31	
Hombres (%)	64.5	56.2	0.516
Edad	26.0 ± 8.38	24.5 ± 7.1	0.495
Peso	65.3 ± 14.6	64.0 ± 10.8	0.859
Talla	1.62 ± 0.09	1.60 ± 0.08	0.557
IMC	24.5 ± 4.1	24.8 ± 4.3	0.929
Cintura	84.8 ± 12.1	83.1 ± 11.0	0.785
Cadera	98.0 ± 13.7	99.2 ± 8.5	0.920
ICC	0.85 ± 0.07	0.80 ± 0.06	0.589
TAS	109.0 ± 11.9	107 ± 10.1	0.686
TAD	68.3 ± 9.2	68.5 ± 8.1	0.530

IMC es el índice de masa corporal, ICC es el índice cintura cadera, TAS es la tensión arterial sistólica y TAD es la tensión arterial diastólica. Los valores representan la media + la desviación estandar. El valor de P compara a R230C/C230C con R230R con la prueba de χ^2 , los valores se ajustaron a edad, genero, tabaquismo y diabetes mellitus tipo 2

9.6 Comparación de los genotipos con el padecimiento de diabetes y enfermedades asociadas.

Se compararon los genotipos obtenidos de acuerdo a la presencia o no de DT2, dislipidemias, obesidad e hipertensión arterial, utilizando la información obtenida del cuestionario que cada persona lleno para participar en el estudio. Además los genotipos se compararon con el padecimiento de alguna de estas enfermedades por parte de sus padres, los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3.Frecuencia de genotipos

Enfermedad	R230R	%	R230C/C230C %	P
Diabetes	1.4		0	1.000
Dislipidemias	2.7		3.2	1.000
Obesidad	19.2		15.2	0.306
Hipertensión arterial	4		0	0.315
Diabetes en el padre	20.9		22.2	0.545
Dislipidemias en el padre	11.7		23.1	0.2
Obesidad en el padre	18.2		50	0.003*
Diabetes en la madre	13		20	0.377
Dislipidemias en la madre	9.6		14.8	0.479
Obesidad en la madre	30.4		51.7	0.066

Los valores representan el porcentaje de cada enfermedad por genotipo. El valor de P compara a R230C/C230C con R230R con la prueba de χ^2 .

9.7 Asociación del polimorfismo R230C del gen ABCA1 con obesidad

Se realizó un modelo de herencia dominante para determinar si la presencia del polimorfismo (R230C/C230C) aumenta el riesgo a la obesidad. Los genotipos C230C/R230C no fueron más frecuentes en personas obesas con respecto a las no obesas en la población analizada (tabla 4).

Tabla .4 Asociación del polimorfismo R230C con obesidad

Obesidad	Genotipo n (%)		OR	IC 95%	P
	R230R	C230C/R230C			
Personas obesas	14 (60.9)	9 (39.1)	0.58	0.22-1.53	0.000
Personas no obesas	59 (72.8)	22 (27.2)			

OR del inglés Odds Ratio, IC es el intervalo de confianza. El valor de P se ajusto a edad, genero, tabaquismo y diabetes mellitus tipo 2

10. DISCUSION DE RESULTADOS

El ABCA1 (ATP-binding cassette transporter subfamilia A miembro 1) es una proteína integral de membrana que regula el paso limitante de la biogénesis de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) para el flujo celular del colesterol y los fosfolípidos hacia las HDL (Brunham, *et al*, 2007). Aunque esta función es bien conocida, la información sobre como puede estar involucrado en la patogénesis de enfermedades frecuentes como el síndrome metabólico y la DT2 es aún limitada. La alta frecuencia de la variante funcional R230C del gen ABCA1 en la población Mexicana provee la oportunidad de analizar posibles asociaciones con características metabólicas y clínicas (Villareal-Molina *et al*, 2007).

En el presente estudio se realizó el análisis genético del DNA proveniente de 104 personas voluntarias no relacionadas. Con la metodología utilizada se obtuvo la amplificación de DNA por la técnica de PCR de un fragmento de 135pb (Figura 7) y después de la digestión con la endonucleasa de restricción Bsp119I fue posible detectar tres genotipos diferentes: el homocigoto para el polimorfismo C230C, el heterocigoto para el polimorfismo R230C y finalmente el homocigoto que no presenta el polimorfismo R230R (figura 8). La frecuencia del polimorfismo R230C de forma heterocigota como homocigota es de 29.8 por ciento, que es mayor a la frecuencia reportada por Villareal-Molina *et al* la cual es del 20 por ciento para la suma de ambos genotipos. Es posible entonces que la muestra analizada en este trabajo muestre un mayor porcentaje de ancestría indígena con respecto a la originalmente analizada por Villarreal Molena y col.

Con base a las frecuencias alélicas y genotípicas se calculó el equilibrio de Hardy Weinberg, el cual describe si la muestra analizada muestra una distribución genotípica propia de una muestra no sesgada (Iniesta *et al*, 2005). En nuestro estudio la muestra analizada no mostró este equilibrio obteniendo una p altamente significativa al comparar las frecuencias de cada uno de los genotipos de acuerdo a las esperadas y las obtenidas experimentalmente ($P=0.00022$). Esto sugiere que la muestra analizada podría tener errores de genotipificación del polimorfismo o bien tener un sesgo específico de selección (e.g existencia de parentesco entre los individuos). En este sentido se re-

analizaron los datos identificando relación de parientes entre algunos de los 115 miembros incluidos originalmente (se excluyeron 11 individuos), sin embargo al excluir a individuos relacionados del análisis este desequilibrio se mantuvo.

Se realizaron comparaciones de la presencia del polimorfismo con parámetros antropométricos como el índice de masa corporal y el índice de cintura cadera. Para el análisis, los resultados se concentraron en dos grupos dependiendo de su genotipo. La comparación no mostró diferencia estadísticamente significativa entre los genotipos (tabla 2). Este resultado se puede explicar por el promedio de edad de las personas que participaron en el estudio que oscila en los 25 años en ambos grupos (tabla 2), es importante considerar que los participantes son personas sanas pertenecientes a la comunidad universitaria, razón por la cual no es muy poco frecuente la presencia de DT2, incremento en la presión arterial o dislipidemia.

Se realizaron comparaciones de los genotipos con el padecimiento de diabetes, dislipidemias, obesidad e hipertensión arterial, no se detectó diferencia entre ninguna de estas enfermedades con la presencia del polimorfismo, sin embargo al analizar los antecedentes familiares de obesidad, diabetes y dislipidemias de los individuos estudiados, se encontró una diferencia significativa en la existencia de antecedentes de obesidad paterna entre los genotipos, que es mayor en los padres de los individuos que presentan el polimorfismo R230C de forma homocigoto o heterocigoto (R230C/C230) ($P=0.003$) (Tabla 3). Este hallazgo es de suma importancia ya que indica que puede existir una relación entre la presencia de la variante C230 y la predisposición al desarrollo de obesidad, que probablemente no se manifiesta en las personas que participaron en el estudio por tratarse de sujetos jóvenes, por lo que sería conveniente realizar un seguimiento de las personas que tienen el polimorfismo para determinar si estas desarrollarán sobrepeso u obesidad con la edad.

Se realizó un análisis con un modelo de herencia dominante para determinar si el polimorfismo contribuye a la predisposición al desarrollo de obesidad, el resultado fue que no existe un incremento en el riesgo a padecer obesidad por la presencia del polimorfismo R230C ($OR=0.58$). Este resultado no concuerda con lo descrito por Villarreal *et al*, quienes encontraron que la presencia de la variante en modelo de herencia dominante incrementa en 2.527 veces el riesgo de padecer obesidad. Una posible explicación a esta diferencia de resultados es la edad de los sujetos analizados

así como una mayor proporción de hombres en el presente estudio (la mitad son hombres), a diferencia del estudio realizado por Villarreal *et al* en el que el promedio de edad es de 40 años con una mayor proporción de mujeres, lo cual es congruente con el hecho de que la obesidad en México es más frecuente en sujetos mayores de 30 y es más prevalente en el sexo femenino (ENSANUT 2006).

11. CONCLUSION

El polimorfismo R230C es muy frecuente en la población estudiada. A pesar de ello no detectamos asociación entre la presencia del polimorfismo y la obesidad quizá debido al tamaño de la muestra considerando que la prevalencia de obesidad en la muestra analizada fue relativamente baja (15.2%). Sin embargo, fue posible demostrar la asociación del polimorfismo con la presencia de obesidad en los padres.. La disminución en el riesgo entre la presencia del polimorfismo y el grupo de personas que no presentan la variante podría deberse a que las personas participantes dentro del estudio en su gran mayoría son jóvenes sobre los cuales todavía el estilo de vida y el factor predisponente del gen no han actuado.

12. ANEXOS.

12.1 Abreviaturas.

°C. Grados centígrados.

ABCA1. ATP-binding cassette transporter A1.

DNA. Deoxyribonucleic acid

APS. Persulfato de amonio.

cbp. Cuanto baste para.

dsDNA. Deoxyribonucleic acid doble strand

dNTP's. Desoxirribonucleótidos trifosfatos.

DT1. Diabetes tipo 1.

DT2. Diabetes tipo 2.

EDTA. Ácido etilendiaminotetracético.

HDL-C. High Density Lipoprotein-Cholesterol.

IC. Intervalos de confianza

ICC. Índice cintura cadera

IMC. Índice de masa corporal

μL. Microlitros.

μM. Micromolar.

mg. Miligramos.

mL. Mililitros.

μg. Microgramos.

mM. Milimolar.

M. Molar.

ng. Nanogramos.

nM. Nanomolar.

OD. Odds Ratio

TAD. Presión arterial diastólica.

TAS. Presión arterial sistólica

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa.

pb. Pares de bases.

rpm. Revoluciones por minuto.

Taq. *Thermophilus aquaticus*.

TBE. Tris-Ácido bórico-EDTA.

TEMED. N,N,N,N, Tetrametiletilendiamina.

SDS. Docecylsulfato de sodio.

SNP. Single nucleotide polymorphisms

UV. Ultravioleta

12.2. Preparación de reactivos.

- ❖ Docecylsulfato de sodio al 10% (SDS 10%).

Dodecylsulfato de sodio..... 10 g
Agua destilada cbp.....100 MI
Esterizar en el autoclave.

- ❖ Acetato de sodio 3M pH

Acetato de Sodio.....246.09 g
Agua destilada cbp.....1000 mL
Ajustar el pH con ácido acético y esterilizar en autoclave

- ❖ Marcador de peso de molecular

Marcador de peso molecular 50 bp.....1 µL
Agua destilada.....20 µL

- ❖ Acrilamida/Bisacrilamida al 30%

Acrilamida.....29 g
Bisacrilamida.....1 g
Agua destilada cbp.....100 mL
Se utilizó guantes y cubrebocas para manipular la acrilamida debido a que es neurotóxica.

- ❖ TBE 10X (Tris-ácido bórico-EDTA)

Tris 1M.....121.10 g
Ácido bórico.....61.38 g
EDTA 50 mM.....14.61 g
Agua destilada cbp.....1000 mL

- ❖ TBE 1X

TBE 10X.....100mL
Agua destilada cbp.....1000mL

❖ Preparación del gel de poliacrilamida al 10%

Agua destilada.....	2.24 mL
Acrilamida/Bisacrilamida.....	1.68 mL
TBE 10X.....	1.0 mL
APS al 10%.....	80 µL
TEMED.....	6 µL

❖ Reactivo FTA preparado en el laboratorio

SDS al 10%.....	5 mL
EDTA pH 8.0 0.5M.....	20 mL
Agua destilada estéril cbp.....	50 mL

❖ Amotiguador PCR 10X, libre de Mg⁺⁺

KCl 2.5 M.....	2 mL
Tris pH 8.3 2.0 M.....	0.5 mL
Gelatina 20 mg/mL.....	0.5 mL
Agua destilada estéril cbp.....	10 mL

❖ Solución de carga sin colorante

EDTA pH 8.5 0.5 M.....	3.0 mL
Tris pH 8.0 2.0 M.....	0.5 mL
SDS al 10%.....	1 mL
Ficoll.....	2 g
Sacarosa.....	6 g
Agua destilada cbp.....	20 mL

❖ APS al 10%.

Persulfato de amonio	1 g
Agua destilada	10 MI
Fraccionar en alícuotas de 250 µL y congelar a -20°C	

12.3 Cuestionario.

ANALISIS DE GENES CANDIDATOS EN OBESIDAD Y LA DIABETES

MELLITUS TIPO 2

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

Fecha: ____/____/____			Clasif: ____/____			No.Exp.			Estado civil			
Fecha nacimiento ____/____/____			Edad			Teléfono						
Nombre:						Tel. algún familiar						
Domicilio:						E-mail						
Lugar de nacimiento:						Lengua:						
ANTROPOMETRIA												
Peso	Talla	IMC	C. Abd	C Cadera	Índice Cintura/Cadera		P. Sistólica	P. Diastólica				
kg	cm		cm	cm								
ESTUDIOS DE LABORATORIO Y GENETICA											FECHA: _____	
TG	CT	HDL	LDL	GLU	Cr	AU	INS	HBA1	HOMA	ApoA1	Apo B	Alelo ABCA1
CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE ALIMENTOS												
1. Nunca o menos de una vez a la semana						5. 5-6 veces a la semana						
2. 1-2 veces a la semana						6. Una vez al día						
3. Una vez a la semana						7. 2-3 veces al día						
4. 3-4 veces a la semana						8. Mas de 3 veces al día						
Jugos de frutas						Fruta fresca / deshidratada			/			
Verduras hoja verde						Café, té, atole			/ /			
Arroz, pastas			/			Gelatina, nieve, helado, flan			/ /			
Cereal, pan, tortilla			/ /			Refrescos (se excluyen dietéticos)						
Pan de dulce, galletas			/			Chocolate, pasteles, golosinas, azúcar			/ /			
Carne de cerdo, vísceras			/			Alimentos fritos, empanizados, capeados						
Huevos, leguminosas			/			Zanahoria, chayote, papa			/ /			
Queso, pollo, res			/ /			Aceite, mantequilla, crema, aderezos			/ /			
Mariscos, pescados			/			Comida rápida (pizza, hamburguesa)						
Leche, yogurt			/			Cacahuates, nueces, pistaches						
CANTIDAD Y TIPO DE ALIMENTOS QUE CONSUME HABITUALMENTE											LUGAR	
DESAYUNO Hora: _____												
COLACION Hora: _____												
COMIDA Hora: _____												
COLACION												

Hora: _____		
CENA Hora: _____		

CONSUMO DE TABACO Y ALCOHOL

¿Actualmente fuma?	Sí (1) _____ No (2) _____	NUNCA (0) _____
¿Cuántos cigarrillos fuma (fumaba) y con qué frecuencia?	Diario (1) _____ Semanal (2) _____ Mensual (3) _____ Ocasional(4) _____	Frecuencia _____ Cantidad _____
¿Durante cuánto tiempo ha fumado regularmente?	Menos de un mes (0)	Años _____
¿Actualmente toma alcohol?	Nunca (0) Si (1) No (2)	_____
Aproximadamente, ¿cuántas copas toma (tomaba), con que frecuencia, durante cuánto tiempo?	Diario (1) _____ Semanal (2) _____ Mensual (3) _____ Ocasional (4) _____	Frecuencia _____ Cantidad _____ Meses _____ Años _____
ACTIVIDAD FÍSICA	SI NO	¿Cuál?
# VECES A LA SEMANA		¿Tiene alguna incapacidad para moverse?
DURACIÓN		

CUESTIONARIO ESTATUS SOCIOECONOMICO

		Ocupación: _____
Ingreso promedio: \$ _____ Mensual	Escolaridad:	Primaria _____ Secundaria _____ Preparatoria _____ Comercial _____ Profesional _____ Postgrado _____ Ninguna _____
Medio de transporte: Autobús _____ Pesero _____ TAXI _____ Auto Particular _____ Otro _____		
Vivienda: Tipo de vivienda: Propia _____ Rentada _____ Prestada _____ OTRO _____		

ANTECEDENTES HEREDO-FAMILIARES

	¿Vive? (Si/No)	Edad (años)	Causa	DM (Si/no)	C. I (Si/no)	Nefrop. diabética (Si/no)	Dislipidemia (Si/no)	Obesidad (Sí/No)	Otra
Padre									
Abuelo p									
Abuela p									
Madre									
Abuelo m									
Abuela m									
Hermanos									
Otros									

LUGAR DE NACIMIENTO

ESCOLARIDAD

Padre		
Madre		
Abuelo Paterno		
Abuela paterna		
Abuelo materno		
Abuela materna		
ANTECEDENTES PERSONALES PATOLOGICOS		
ANT. GINECO-OBSTETRICOS	Menarca	años Frecuencia y duración de los ciclos _____ x ____ días
Irregularidades menstruales	S N Cuáles?	
Embarazos: _____ #	Edad 1er.embarazo: _____ años	Edad último embarazo _____ años
Peso productos al nacer	_____, _____, _____, _____, _____, _____, _____, _____, _____	
Ha tenido algún aborto, óbito o alguno de los productos tuvo malformaciones?		____ S ____ N
Fecha última menstruación	____/____/____ D/M/A	Se encuentra en climaterio _____ S ____ N
Edad de presentación	_____ años	Recibe sustitución estrogénica _____ S ____ N
COMORBILIDADES		
DIABETES MELLITUS	¿Tiene DM?	NO Fecha de diagnóstico: ____/____/____ D/M/A
Glucemia promedio último año: _____ mg/dl	SI	Edad de diagnóstico _____ años
Tratamiento actual Dieta (1), Metformin (2), Sulfonilurea (3) Sulfonilurea+Biguanida (4), HipoGlucemiante + Insulina diurna (5) , Monoterapia con Insulina (6)		Opción: _____ Dosis: _____
HIPERTENSION ARTERIAL	¿Tiene HAS?	NO Fecha de diagnóstico: ____/____/____ D/M/A
	SI	Edad de diagnóstico _____ años
Tratamiento actual Diurético (1) Betabloqueador (2) Inhibidor de ECA (3) Bloqueador de canales de calcio (4) Bloqueador de receptores A.T. II (5) Otro (6) _____		Opción: _____ Dosis: _____
ALBUMINURIA O MICROALBUMINURIA	NO	Creatinina > 2 mg/dl SI NO
	SI	Edad de diagnóstico _____ años
OBESIDAD	SI NO	Edad de inicio _____ años Peso al nacer _____ Kg
Peso > _____ Kg.	F: ____/____/____ D/M/A	Peso < _____ Kg F: ____/____/____ D/M/A
Peso más reciente _____ Kg	Peso hace 1 año _____ Kg.	Peso habitual _____ Kg
Cambio crónico de peso	NO SI	¿CUANTO? _____ Kg tiempo
Cambio agudo de peso	NO SI	¿CUANTO? _____ Kg tiempo
¿POR QUÉ?		
Tratamiento		
DISLIPIDEMIA	Alguna vez se le han medido las concentraciones de:	
	Colesterol	SI NO Concentración _____ mg/dl
	Triglicéridos	SI NO Concentración _____ mg/dl
	Colesterol HDL	SI NO Concentración _____ mg/dl

	Coolesterol LDL	SI	NO	Concentración	mg/dl
¿Recibe algún tratamiento hipolipemiente?		SI	NO	OTROS MEDICAMENTOS	
Estatinas (1) Fibratos (2) Estatina + Fibratos (3) Acido nicotínico (4) Resinas (5)					
Presenta alguna de los siguientes síntomas:		PADECE OTRA (S) ENFERMEDAD (ES) INTERCURRENTES??			
1. Dolor ardoroso en miembros inferiores		SI	NO		
2. Parestesias		SI	NO		
3. Calambres		SI	NO		
4. Diarrea sin causa aparente		SI	NO		
5. Ulceras en pies		SI	NO		
6. Callosidades en pies		SI	NO		
7. Micosis en pies		SI	NO		
8. Mareo al cambio de posición		SI	NO		
9. Palpitaciones		SI	NO		
10. Impotencia		SI	NO		
11. Disuria		SI	NO		
12. Orina espumosa		SI	NO		
13. Aumento reciente en cifras de presión arterial		SI	NO		
14. Edema palpebral matutino		SI	NO		
15. Disminución de la agudeza visual		SI	NO		
16. Dolor en tórax en relación a esfuerzos		SI	NO		
17. Disnea de esfuerzo		SI	NO		
18. Alteraciones transitorias en sensibilidad o fuerza en M.Inf´ s		SI	NO		
19. Claudicación intermitente		SI	NO		
20. Diaforesis nocturna		SI	NO		
21. Historia de fotocoagulación		SI	NO	Fecha	___/___/___ D/M/A
22. Amputaciones		SI	NO	Fecha	___/___/___ D/M/A
23. Ha sufrido un infarto al miocardio		SI	NO		
24. Ha sufrido una embolia		SI	NO		
25. Anormalidades en el electrocardiograma		SI	NO		
ENTREVISTADOR:					

12.4 Hoja de consentimiento informado.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO

Estudio de genes candidatos para obesidad y diabetes tipo 2 en sujetos

INTRODUCCIÓN: La siguiente información describe el protocolo y su papel como participante. El investigador contestará cualquier pregunta sobre ésta forma o el estudio.

PROPÓSITO DEL ESTUDIO: El propósito del estudio es estudiar los defectos genéticos asociados al desarrollo de obesidad y diabetes tipo 2 en sujetos mexicanos

PROCEDIMIENTOS A SEGUIR:

Usted ha sido invitado a participar en el estudio como control. Su participación sólo requiere de la toma de una muestra de sangre (20 ml) adicional a las muestras de sangre requeridas para sus exámenes médicos y del llenado de un cuestionario para evaluar su historia médica.

MOLESTIAS POR SU PARTICIPACIÓN: Se obtendrá una muestra de sangre en ayuno. La cantidad total de sangre obtenida no implica riesgos para su salud. El estudio no modificará su condición médica. Los exámenes de laboratorio requeridos para el estudio no tendrán ningún costo para usted.

BENEFICIO PARA LOS PARTICIPANTES: Los resultados aportarán información nueva e importante sobre las causas genéticas para el desarrollo de obesidad y diabetes tipo 2 en sujetos mexicanos. El participante no obtendrá un beneficio directo. Los exámenes genéticos no tendrán costo para usted.

CONFIDENCIALIDAD: Los datos obtenidos de su persona son absolutamente confidenciales, no pueden ser utilizados con otro fin. Usted será informado de cualquier hallazgo obtenido en esta investigación. El DNA obtenido solo será empleado para el estudio de genes que potencialmente participan en la génesis de la obesidad y la diabetes tipo 2.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA:

Yo _____ declaro libre y voluntariamente que acepto participar en este estudio. Es de mi conocimiento que seré libre de retirarme de la presente investigación en el momento que lo desee. También puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación en el estudio. Recibiré, si así lo solicito, los resultados de mi participación. Debo informar, tan pronto como sea posible, a los investigadores, de cualquier cambio importante que ocurra en mi estado de salud, incluyendo el consumo de medicamentos, suspensión o inicio de algún hábito (ej. Tabaquismo) o cambio de domicilio. Las muestras obtenidas sólo podrán ser utilizadas para los fines de este estudio.

He comprendido el contenido de ésta carta de consentimiento, mis dudas han sido resueltas y voluntariamente acepto participar en este estudio:

Firma del investigador y fecha

Firma del paciente y fecha

Firma del testigo, parentesco y fecha.

13. BIBLIOGRAFIA.

Aguilar Salinas CA, Rojas R, Gómez-Pérez FJ, García E, Valles V, Rios-Torres JM, Franco A, Olaiz G, Sepúlveda J, Rull JA. Early onset type 2 diabetes in a Mexican, population-based, nation-wide survey: Am J Medicine. 2002. 113:569-574.

Aguilar Salinas C, Reyes Rodríguez E, Ordóñez Sánchez ML, Arellano Torres M, Ramírez Jiménez S, Domínguez López A, Martínez Francois J., Velazco Pérez ML, Alpizar ., García García E, Gómez Pérez F., Rull J., Tusié- Luna M.T. Early Onset type 2 diabetes: metabolic and genetic characterization in the Mexican population. J Clin Endo Metab. 2001. 86(1):220-6.

Alberti K, Zimmet P. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Past 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus, provitional report of a WHO consultation. Diabetic Medicine. 1998. 15:539-553.

Atkinson MA, Maclaren NK. The pathogenesis of insulin dependent diabetes. N Engl J Med. 1994. 331:1428-1436.

Barrera SH, Ortiz LR, Rojas MA y Reséndiz PD. Reacción en cadena de la polimerasa. Ciencia y desarrollo. 1993. 18: 50-60.

Barroso I, Luan J, Middelberg RP, Harding AH, Franks PW, Jakes RW, Clayton D, Schafer AJ, O' Rahilly S, Wareham NJ. Candidate gene association study in type 2 diabetes indicates a role for genes involved in beta. Cell function as well as insulin action. Public Library of Science Biology. 2003. 1:41-55.

Bell GI, Polonsky KS. Diabetes mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function. Nature. 2001. 414:788-91.

Bogardus C, Lillioja S, Mott DM, Hollenbeck C, Reaven G. Relationship between degree of obesity and in vivo insulin action in man. Am J Physiol. 1985. 248:E286-E291.

Brook-Wilson A, Marcil M, Clee S, Zhang L, Roomp K, van Dam M, Yu L, Brewer C, Collins J, Molhuizen H, Loubser O, Fichter K, Ashbourne-Excoffone K, Sensen C, Scherer S, Mott S, Denis M, Martindale D, Frolich J, Morgan K, Koop B, Pimstone S, Kastelein J. Mutation in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. Nat Genet. 1999. 22:347-351.

Bruham L, Kruit J, Pape T, Timmins J, Reuwer A, Vasanji Z, Marsh B, Rodrigues B, Johnson J, Parks J, Verchere B, Hayden M. β -cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment. Nat Med. 2007. 13(3):340-347.

Clee SM, Zwinderman AH, Engert JC, Zwarts KY, Molhuizen H, Roomp K, Jukema J, van Wijland M, van Dam M, Hudson TJ, Brook-Wilson A. Common genetic variation in ABCA1 is associated with altered lipoprotein levels and a modified risk for coronary artery disease. *Circulation*. 2001. 103: 1198-1205.

Chakravarthy MV y Semenkovich CF. The ABCs of β -cell dysfunction in type 2 diabetes. *Nature Medicine*. 2007. 13: 241-242: 3.

Cox NJ. Calpain 10 and genetics of type 2 diabetes. *Curr Diab*. 2002. Rep 2: 186-190.

Daimon M, Kido T, Baba M, Oizumi T, Jimbu Y, Kamedad, Yamaguchi H, Ohnuma H, Tominaga M, Maramatsu M, Kato T. Association of ABCA1 gene polymorphisms with type 2 DM in a Japanese population. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2005. 329: 205-210.

Laura del Bosque P, Carlos A. Aguilar-S, Maria Teresa Tusié L, Salvador RamírezJ, Maribel Rodríguez-T, Erika Ramírez, M.L. Velasco, Alfredo Ramírez S, Francisco Gómez P, Craig L. Hanis, Nancy J. Cox, and Graeme I. Bell. Association of the calpain-10 gene with type 2 diabetes mellitus in a Mexican population. *Molecular Genetics and Metabolism* 81: 122-126, 2004.

Henry RR, Wallace P, Olefsky JM. Effects of weight loss on mechanisms of hyperglycemia in obese non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*. 1986. 35:990-998.

Hsiao KM, Lin HM, Pan H, Li TC, Chen SS, Jou SB, Chiu YL, Wu MF, Lin CC, Li SY: Application of FTA® Sample Collection and DNA Purification System on the Determination of CTG Trinucleotide Repeat Size by PCR-Based Southern Blotting. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 1999. 13:188-193.

Innis M. Gelfand D. PCR protocols. A guide to methods and applications. USA: Academic Press, Inc., 1990: 3-12.

Instituto Nacional de Salud Publica. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006.

Iniesta R, Guinó E, Moreno V. Análisis Estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac Sanilt*. 2005; 19(4):333-41.

Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, Taskinen MR, GroopL. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2001. 24:683-689.

Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*. 2000. 106:473-481.

Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C.A., Krieger M., Scout Matthew., Zipursky S.L., Darnell James. *Biología Celular y Molecular*. Quinta edición. Editorial Médica Panamericana. Santa fe de Bogota. Colombia. 2005. pp: 371-373.

Lynn S, Evans JC, White C, Frayling TM. Variation in the calpain-10 gene affects glucose levels in the British population. *Diabetes*. 2002. 51: 247-250.

Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res*. 2002; 30(6): 1292-1305.

Molen JV., Frisse LM., Fullerton SM., Qian Y., Bosque-Plata L., Hudson RR., Di Rienzo A. Population Genetics of CAPN10 and GPR35: Implications for the Evolution of Type 2 Diabetes Variants. *Am. J. Hum. Genet*. 2005. 76:548-560.

Mori Y, Otabe S, Dina C, Yasuda K, Populaire C, Lecoeur C, Vatin V, Durand E, Hara K, Okada T, Tobe K, Boutin P, Kadowaki T and Froguel P. Genome-wide search for type 2 diabetes in Japanese affected sib-pairs confirms susceptibility genes on 3q, 15q, 20q and identifies two candidate loci on 7p and 11p. *Diabetes*. 2002. 51: 1247-1255.

Olaiz G, Rojas R, Barquera S, Shamah T, Aguilar C, Craviota P, López P, Hernandez M, Tapia R, Sepúlveda J. Encuesta nacional de salud. 2000. Tomo 2. La salud de los adultos. Cuernavaca, Morelos, México: Instituto Nacional de Salud Pública (ISBN 968-6502-72-6); 2003.

Oram JF, Lawn RM. ABCA1. The gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. *J. Lipid. Res*. 2001. 42:1173-1179.

Phillips C, Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F, McManus R, Roche HM. Genetic and nutrient determinants of the metabolic syndrome. *Curr Opin Cardiol* 21:185-193, 2006

Reaven GM, Bernstein R, Davis B, Olefsky JM. Nonketotic diabetes mellitus: insulin deficiency or insulin resistance?. 1976. *Am J Med*. 60:80-88.

Roche HM, Phillips C, Gibney MJ. The metabolic syndrome: the crossroads of diet and genetics. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2005. 64:371-377.

Rodríguez SI, Barrera SH. La reacción de cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*. 2004; 7:323-335.

Rull JA, Aguilar-Salinas CA, Rojas R, Rios-Torres JM, Gómez-Pérez FJ, Olaiz G. Epidemiology of type 2 diabetes in Mexico. *Arch Med Res*. 2005 36(3):188-96.

Smith LM & LA Burgoyne. Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA® data basing paper. *BMC Ecology*. 2004. 4:1-11.

Santamarina F, Remaley AT, Neufeld EB. Regulation and trafficking of the ABCA1 transporter. *J. Lipid Res.* 2001. 42:1339-1345.

The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2003. 26: S5-S19.

Tusie Luna MT. Genes and Type 2 Diabetes Mellitus. *Archives of Medical Research.* 2005. 36:210-222.

Unger RH. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes.* 1995. 44:863-870.

Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Advan. Physiol. Edu.* 2005; 29: 151-59.

Vanek D, Hradil R, Budowle B: Czech population data on 10 short tandem repeat loci of SGM Plus system kit using DNA purified in FTA cards. *Forensic Science International* 2001, 119:107.

[Villarreal M, Aguilar-SA, Rodriguez M, Riano D, Villalobos CM, Coral-Vazquez R, Menjivar M, Yescas GP, Konisberg FM, Romero HS, Tusie LM, Canizales QS.](#) The ABCA1 R230C Variant Affects HDL-cholesterol Levels and Body Mass Index in the Mexican Population: Association with Obesity and Obesity-Related Comorbidities. *Diabetes.* 2007 56(7):1881-7.

Villarreal-Molina MT, Flores-Dorantes MT, Arellano-Campos O, Villalobos-Comparan M, Rodríguez-Cruz M, Miliar-García A, Huertas-Vazquez A, Menjivar M, Romero-Hidalgo S, Wachter NH, Tusie-Luna MT, Cruz M, Aguilar-Salinas CA, Canizales-Quinteros S; The Metabolic Study Group. Association of the ATP-binding cassette transporter A1 R230C Variant with Early-Onset Type 2 Diabetes in the Mexican Population. *Diabetes.* 2007 Nov 14 [Epub ahead of print].

Watson J.D., Baker TA., Bell SP., Gann A., Levine M., Losick R. *Biología Molecular del Gen.* Quinta edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid. España. 2006. pp: 689-695.

Wiltshire S, Hattersley AT, Hitman GA, Walker M, Levy JC, Sampson M, O'Rahilly S, Frayling TM, Bell JI, Lathrop M, Bennett A, Ranjit D, Fletcher C, Groves CJ, Jones E, Prestwich P, Simecek N, Subba PV, Wishart M, Foxon R, Howell S, Smedley D, Cardon LR, Menzel S, McCarthy MI. A genome wide scan for loci predisposing to type 2 diabetes in the U.K. population (The Diabetes UK Warren 2 Repository): Analysis of 573 pedigrees provides independent replication of susceptibility locus on chromosome 1. *Am J. Hum. Genet.* 2001. 69: 553-569.

Zhou YP, Grill V. Long term exposure to fatty acids and ketones inhibits β -cell function in human pancreatic islets of Langerhans. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1995. 80:1584-1590.

<http://almez.cnice.mecd.es/tema1/electroforesis.JPG>

www.educa.aragob.es/iescarin/depart/biogeo