



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“Evaluación de la variante polimórfica A45T del gen
NeuroD1/BETA2, en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 de
inicio temprano y tardío”.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

Maria Helena García Rodríguez



México DF.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado

Presidente: **Dra. Sobeida Sánchez Nieto**

Vocal: **M. en C. Omar Noel Medina Campos**

Secretario: **Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta**

1er. Suplente: **M. en C. Ma. de los Ángeles Granados Silvestre**

2º. Suplente: **Dra. María Guadalupe Ortiz López**

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 202 del Edificio F. Facultad de Química, UNAM.

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

Asesor: Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta -----

Supervisor Técnico: Dra. Guadalupe Ortiz López -----

Sustentante: María Helena García Rodríguez -----

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser como mi segunda casa y brindarme la oportunidad de formarme dentro de sus aulas como profesionista.

Al Hospital Juárez de México por facilitar recursos humanos y económicos para la realización de este trabajo de investigación.

A Tlacaehlel por enseñarnos a *volver a nacer*.

A mi padre por su amor y apoyo constantes.

A la Dra. Marta Menjivar le agradezco el inculcarme esa chispa de asombro ante los fenómenos y el enseñarme a plantearme retos, factores indispensables en esta carrera.

A la Dra. Lupita, Dra. Ángeles y la Mtra. Isela que siempre estuvieron pendientes del trabajo de esta tesis y por lo tanto, fueron imprescindibles para la realización de esta.

A Náyade por compartir conmigo los *pros* y *contras* de esta carrera y ser mi colaboradora directa en este trabajo (¡Muchas gracias por tu ayuda!).

A los compañeros del laboratorio 202 del edificio F: Agustín por sus chistes de mal gusto que ayudaban a pasar el rato, Adriana y Roxana por su ayuda oportunas en consultas teóricas.

A Jassón, Gabriel, Lirio, Atenea, Axinia y Edgardo mis hermanos de ideales y amigos.

A la Profra. Lorena y el Lic. Everardo que en gran parte les debo la formación que tengo. ¡Gracias tíos!

A la Clínica del Valle de Texcoco, la Dra. Mercedes y el corporativo.

A los economistas del CEMEES

INDICE

Introducción	1
Antecedentes	3
Páncreas	5
Anatomía	5
Embriología	5
Histología	6
Factores de transcripción	7
Metabolismo de carbohidratos	9
Insulina	11
Alteraciones de la homeostasis en la diabetes mellitus	14
Objetivo General	17
Objetivos particulares	17
Hipótesis	18
Diseño Experimental	19
Muestras	19
Pruebas bioquímicas	19
Glucosa	19
Colesterol	20
Triglicéridos	20
Determinación de hormonas	21
Insulina	21
Glucagon	22
Determinación de péptido C	24
Pruebas moleculares	25
Extracción de ADN	25
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	27
Análisis Polimórfico Conformacional de Cadena Simple (SSCP)	28
Secuenciación	29
Resultados	31
Discusión	42
Conclusiones	48
Apéndice I	49
Apéndice II	60
Bibliografía	70

Evaluación de la variante polimórfica A45T del gen *NeuroD1/BETA2* en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 de inicio temprano y tardío



"Una maravillosa aflicción, no muy común en hombres, en la cual la carne y los miembros se disuelven en la orina. Su causa es de naturaleza fría y húmeda, como la hidropesía, ya que el paciente nunca deja de formar agua; la corriente es tan persistente como un acueducto abierto. La naturaleza de la enfermedad es crónica, pero la vida del paciente corta, ya que la enfermedad ocasiona la muerte. Más aún, la vida es desagradable y dolorosa, con insaciable sed e ingestión excesiva de agua, la cual, es desproporcionada a la gran cantidad de orina que se produce. De abstenerse de tomar agua tanto la boca, como el cuerpo se secan y las vísceras se asemejan a las de una persona con severas quemaduras. El paciente presenta náusea, inquietud, sed y en poco tiempo sobreviene la muerte..."

Arateus de Capadocia (120-180 D.C.)

Introducción

La diabetes es una enfermedad sistémica, crónico degenerativa, con grados variables de predisposición hereditaria, ya que en su desarrollo participan diferentes combinaciones de genes junto con factores ambientales. Se caracteriza por hiperglucemia crónica debido a la deficiencia en la producción o acción de la insulina, lo que afecta el metabolismo intermedio de los carbohidratos, proteínas y grasas. Los principales síntomas de la hiperglucemia son la poliuria, polidipsia, pérdida de peso, algunas veces polifagia y visión borrosa.

Actualmente la diabetes se considera una pandemia con tendencia ascendente, estimaciones recientes refieren la existencia de 143 millones de enfermos en el mundo, cifra que podría duplicarse en el año 2030. Alrededor de 8.2% de la población entre 20 y 69 años padece diabetes y cerca de 30% de los individuos afectados desconoce que la tiene.

En México existen más de 4 millones de personas enfermas de las cuales poco más de 1 millón no han sido diagnosticadas. El tipo de diabetes más frecuente en la población mundial y en particular en la población mexicana es la de tipo 2. La frecuencia

correspondiente al tipo 1 es de 5 a 10%, la de tipo 2 varía entre 80 y 90%, del cual, entre 5 y 10% corresponde a la MODY y otro 5-10% se produce por diversos desórdenes genéticos.

La afección tiene gran repercusión social y económica en nuestro país, ya que ocupa el primer lugar de causas de defunción, después de la enfermedad isquémica de miocardio y además deriva hacia numerosas complicaciones clínicas.

Dado que la diabetes aparece a edades cada vez más tempranas, el trabajo de esta tesis se centra en el estudio del gen *NeuroDI/BETA2*, cuyo polimorfismo más común A45T se encuentra asociado al padecimiento de Diabetes Mellitus Tipo 1 (DMT1) en países como Japón, Dinamarca e India, entre otros; mientras que en China y Polonia se asocia al padecimiento de Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2).

Este gen se compone de dos exones, el exón 1 que no codifica para la proteína, pero que tiene el sitio de aceptor-splice y el exón 2 que codifica al factor de diferenciación neurogénico 1. Este último a su vez se divide en tres regiones: exón 2-1, 2-2 y 2-3.

El polimorfismo, asociado al desarrollo de diabetes, consiste en el cambio de una guanina por una adenina en el codón 45 ubicado en el exón 2-1 y esto implica el cambio de aminoácidos alanina por treonina.

El evaluar el polimorfismo A45T del gen *NeuroDI/BETA2* en pacientes diabéticos tipo 2 de inicio temprano y tipo 2 de inicio tardío, nos permite comprender mejor la naturaleza genética de la diabetes del mexicano y, al mismo tiempo, abre campo hacia el desarrollo de terapias preventivas, como la construcción de microarreglos específicos de la población mexicana.

Antecedentes

Diabetes mellitus es un síndrome orgánico multisistémico que tiene como característica el aumento de los niveles de glucosa en sangre o hiperglucemia, resultado de defectos en la secreción de insulina, en su acción o ambos. Se trata de una compleja enfermedad en la que coexiste un trastorno global del metabolismo de los hidratos de carbono, grasas y proteínas. Es multifactorial por la existencia de múltiples factores implicados en su patogénesis. (37).

La clasificación realizada por el comité de expertos de la ADA (*American Diabetes Association*) y la OMS (*Organización Mundial de la Salud*), de acuerdo con las causas de la enfermedad, es la siguiente:

- Diabetes Mellitus de tipo 1: Generalmente se diagnostica en la infancia. Está causada por un proceso autoinmune que destruye las células β pancreáticas por lo que no se produce insulina. Puede ser también de carácter idiopático.
- Diabetes Mellitus de tipo 2: Es mucho más común y corresponde aproximadamente al 90% de todos los casos de diabetes, generalmente se presenta en la edad adulta. El páncreas no produce suficiente insulina para mantener los niveles normales de glucosa en la sangre. Se asocia con la obesidad y el sedentarismo. (16). Dentro del tipo de la diabetes tipo 2 se encuentra un subtipo **MODY** (del inglés "*Maturity Onset Diabetes of the Young*" "diabetes de la madurez de inicio en el joven"), es rara o poco común, ocurre en menos del 1% de los diabéticos menores de 20 años. Es una patología cuyo modo de herencia es autosómica dominante y cuenta con 6 subtipos. (44).
- Diabetes gestacional: Consiste en la presencia de altos niveles de glucosa en la sangre que se desarrolla en cualquier momento durante el embarazo en una persona que no tiene diabetes.
- Otros tipos de diabetes (< 5% de todos los casos diagnosticados): Puede ser por un defecto genético en células beta pancreáticas, resistencia a la insulina determinada genéticamente, enfermedades del páncreas, por efectos hormonales o causada por fármacos.

Una de las claves para entender las causas de la enfermedad es el análisis de loci de susceptibilidad, es decir, aquellos genes con una marca genética específica (alelo polimórfico) que se presenten con mayor frecuencia en pacientes que en controles, ya que una asociación significativa de este tipo facilita la detección de personas con mayor riesgo para desarrollar la enfermedad. **(32, 42).**

La diabetes tipo MODY se caracteriza por una herencia autosómica dominante y una temprana edad de aparición, no es insulino dependiente y al igual que la DMT2 está causada por la disfunción de las células β , aunque debido a la mutación de un solo gen. En la variante MODY se han detectado mutaciones en el gen de la glucocinasa (MODY2) y en factores transcripcionales, tales como el factor nuclear hepático 1 α (*HNF-1 α* , MODY3), factor nuclear hepático 4 α (*HNF-4 α /HNF 4A*, MODY1), factor nuclear hepático 1 β (*HNF-1 β / TCF2 / VHNF-1*, MODY5), factor 1 promotor de la insulina (*IPF-1 / IDX1 / PDX1*, MODY4) y el factor de diferenciación neurogénico 1 (*NeuroD1/BETA2*, MODY6). **(18, 25, 30).** Éste último activa al gen de la insulina, induce neurogénesis y tiene un papel esencial en la morfogénesis y diferenciación de células β pancreáticas. **(41).** De tal manera que, los genes cuya mutación causa MODY han resultado ser esenciales para el correcto desarrollo y funcionamiento de la célula β . Por tanto, su estudio permite una aproximación sencilla al conocimiento de las causas de disfunción en dicha célula, a la vez que revela posibles genes candidatos de susceptibilidad a la diabetes.

Se ha sugerido que en el desarrollo de la DMT2 participan genes de susceptibilidad, principalmente los relacionados con el desarrollo pancreático. Sus estudios deberán estar encaminados al conocimiento de la frecuencia de esta enfermedad en distintas poblaciones, ya que no sigue un patrón de herencia mendeliana específico. **(26).**

PÁNCREAS

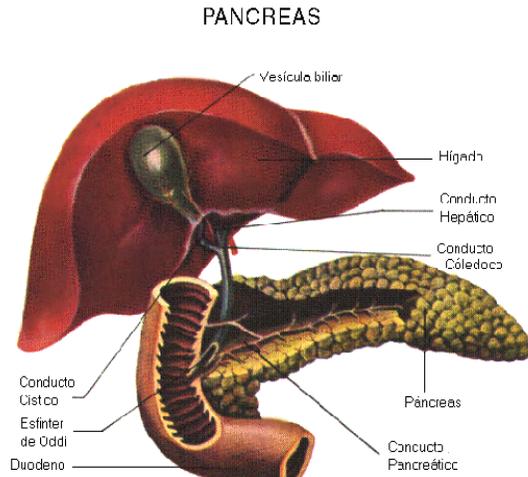


Fig. 1 Anatomía del páncreas

Anatomía:

El páncreas es un órgano glandular de secreción tanto exócrina como endocrina, lobulada racemosa u órgano retroperitoneal situado posteroinferior al estómago entre la concavidad del duodeno y el hilio esplénico. Tiene forma cónica con un proceso unciforme medial e inferior. Su longitud oscila entre 15 y 20 cm, tiene una anchura de unos 3.8 cm, un grosor de 1.3 a 2.5 cm y pesa 70 g (Fig. 1).

El páncreas está constituido por dos órganos funcionalmente distintos:

Páncreas exócrino: Principal glándula digestiva, encargado del procesamiento de los alimentos ingeridos para su absorción.

Páncreas endócrino: Órgano en donde se sintetizan insulina, glucagon, somatostatina y polipéptido pancreático, se encarga de modular la absorción de los alimentos y su almacenamiento en la célula.

Embriología:

El páncreas proviene principalmente del endodermo con aportes del mesodermo para algunas estructuras. Se forma de los esbozos, ventral y dorsal, en el mesenterio dorsal. Durante el desarrollo y a causa de las rotaciones de las asas intestinales ambos esbozos se unen formando un páncreas único.

El **esbozo ventral** surge del conducto colédoco y por tanto a la derecha, tras el giro se desplaza posteriormente arrastrando dicho conducto hasta la izquierda a un nivel

inmediatamente inferior al esbozo principal o izquierdo. Tras la fusión de los parénquimas el conducto del esbozo principal degenera quedando como accesorio y el páncreas menor (ahora proceso unciforme) aporta su conducto como principal (Fig. 2).

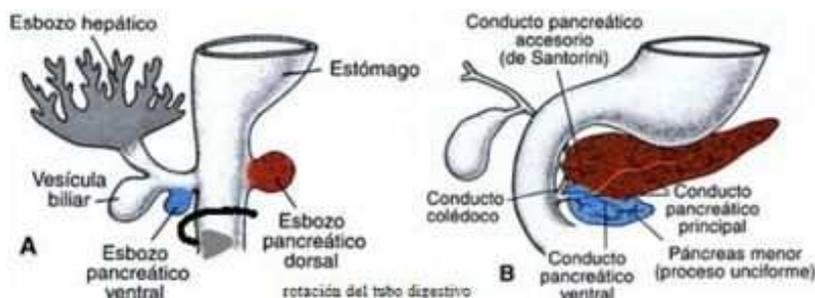


Fig 2 Embriología del páncreas. A) Rotación del tubo digestivo. B) Páncreas maduro.

Histología:

La parte exócrina contiene unas glándulas llamadas acinos cerosos que son redondos u ovalados con células epiteliales.

La parte endocrina se agrupa en islotes de Langerhans. Dichos islotes son micro órganos compuestos por las siguientes subunidades:

Células alfa: Tipo de células pancreáticas ubicadas en los islotes de Langerhans. En ellas se sintetiza y libera glucagon, hormona que eleva el nivel de glucosa en la sangre. Representan entre el 10 - 20% del volumen del islote y se distribuyen de forma periférica.

Células beta: Tipo de célula pancreática ubicada en los islotes de Langerhans. Producen y liberan insulina, hormona que regula el nivel de glucosa en la sangre. En los diabéticos tipo I las células beta han sido dañadas y no son capaces de producir la hormona.

Células delta: Tipo de célula pancreática ubicada en los islotes de Langerhans. Producen somatostatina, hormona que se cree regula la producción y liberación de la insulina por las células beta, así como la producción y liberación del glucagon por las células alfa.

Células PP: Ubicada en el islote de Langerhans. Producen y libera polipéptido pancreático.

FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Los factores de transcripción son proteínas que tras ser estimuladas por señales citoplasmáticas tienen la capacidad de regular la expresión génica en el núcleo celular. Pueden ser activados o desactivados selectivamente por otras proteínas, a menudo como paso final de la cadena de transmisión de señales intracelulares. **(4)**.

Varios factores de transcripción de la familia homeodominio, *Basic Helix-Loop-Helix* (bHLH) juegan un papel en el desarrollo del páncreas. La región básica de los factores bHLH está localizada en el extremo N-terminal de la primera hélice y es requerida para interactuar con el ADN. La familia de factores de transcripción bHLH puede ser dividida en tres clases:

Clase A: Se caracteriza por su distribución ubicua en los tejidos y por su capacidad para unirse al ADN como homodímero o heterodímero con miembros de la clase B.

Clase B: Son tejido-específicos y se unen al ADN como un heterodímero con miembros de la clase A.

Clase C: Se caracterizan por un motivo de cierre de leucina, localizado en la región C-terminal de la proteína. También dimeriza vía el cierre de leucina y no interactúa con la clase A o B. **(14)**.

El subtipo MODY es causado por mutaciones en un conjunto de genes que codifican reguladores transcripcionales de las células beta (Fig. 3). Entonces, es muy importante conocer el papel central que juegan los genes MODY en el desarrollo y función de las células beta, pues permitiría formular estrategias destinadas a tratar diversas formas de diabetes. **(35)**.

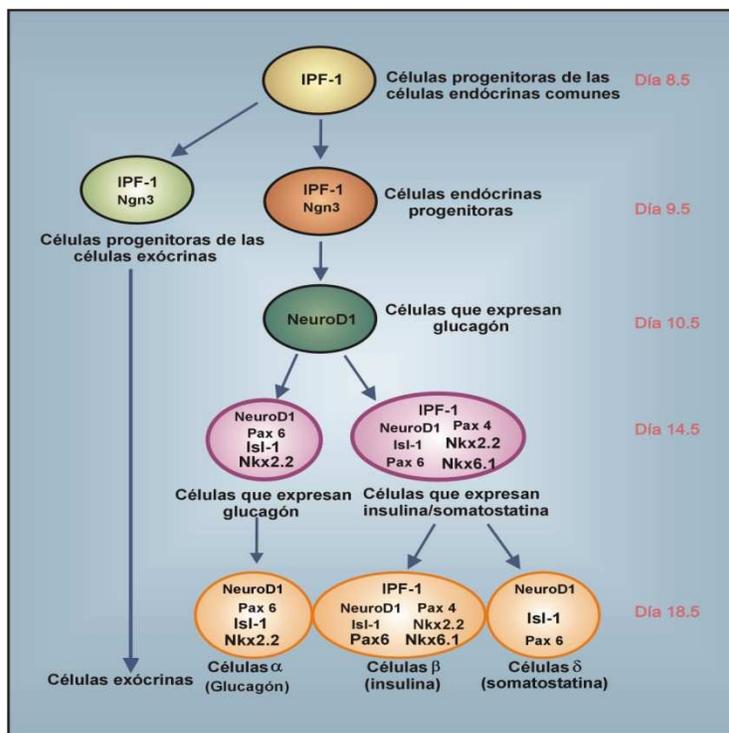


Fig. 3. Morfogénesis pancreática.

NeuroD1/BETA2 pertenece a la familia de factores de transcripción bHLH clase B y está involucrado en el desarrollo de las células del islote y en la transcripción del gen de insulina. Como todos los factores de clase B, no tiene la capacidad de unirse por sí solo al ADN, necesita formar heterodímeros con proteínas bHLH clase A (como la E47 o la E12) los cuales se unen con alta afinidad al complejo E-box insulina, activando la transcripción del gen de la insulina en la célula beta pancreática. (24).

En el humano, el gen *NeuroD1/BETA2* contiene dos exones y ha sido localizado en la banda del cromosoma 2q32. El exón 1 codifica parte de la región 5'-no traducida del mRNA NeuroD1 y el exón 2 codifica para 11 nucleótidos de la región 5'-no traducida y los 356 aminoácidos de la proteína NeuroD1. Para su estudio, el exón 2 ha sido fragmentado en tres regiones: Exón 2-1 con 483pb, exón 2-2 con 564pb y exón 2-3 con 447pb.

Se sabe que mutaciones heterocigotas en este gen ocasionan MODY6. Existe también un polimorfismo común que consiste en un cambio de una guanina por una adenina en el codón 45 ubicado en el exón 2-1, lo cual altera la secuencia de aminoácidos de la proteína al sustituirse una alanina por una treonina (A45T). (11).

Estudios recientes en ratones homocigotos *NeuroDI-null* mostraron un desarrollo de diabetes y muerte a los 3 ó 5 días de nacidos. En el estudio histológico del páncreas de estos ratones, se encontró un reducido número de islotes y específicamente de células beta, esto indica que la activación del gen es importante en la morfogénesis o diferenciación del páncreas y por ende en la homeostasis de la glucosa. **(36)**.

METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS

La alteración de los valores normales de la concentración plasmática de la glucosa se asocia a una serie de manifestaciones patológicas como la diabetes que ocasiona desequilibrios metabólicos e induce daños en los tejidos a través de la glucosilación inespecífica de las proteínas, provocando insuficiencia renal, ceguera y lesiones cardiovasculares entre otras complicaciones. Para adaptarse a las distintas situaciones fisiopatológicas que alteran la glucemia, el organismo ha desarrollado una serie de mecanismos homeostáticos intrínsecos que le permiten mantener los valores de la concentración de glucosa en la sangre en el margen fisiológico que asegure la salud. **(9)**.

La mayor parte de los carbohidratos que se ingieren en la dieta son absorbidos en el intestino mediante el simportador con sodio y acceden al hígado a través de la vena porta, ya que este órgano tiene gran flexibilidad metabólica para adaptarse a las distintas circunstancias y mantener la homeostasis de la glucosa. El resto de glucosa que no captan los hepatocitos se distribuye a otros tejidos u órganos como el cerebro, tejido adiposo y tejido muscular, que utilizan este carbohidrato como fuente de energía. Para que la glucosa se introduzca en la célula, se necesita de la participación de la insulina que es secretada en pulsos discretos hacia la vena porta **(19)**. La elevación de la concentración de la glucosa en el plasma y la consiguiente liberación de la insulina por el páncreas motiva en el hígado la activación de: la síntesis de glucógeno, la glucólisis y la transformación de piruvato generado en acetilCoA, la cual se utiliza como sustrato para la síntesis de los ácidos grasos cuyo destino inmediato es la oxidación mitocondrial y la consiguiente generación de ATP.

Tras la ingesta, y como consecuencia de la rápida captación de la glucosa por las células de diferentes tejidos, su concentración plasmática desciende y se restablece el valor normal de la glucemia, lo que frena la tasa de liberación de la insulina por el páncreas.

Cuando el organismo entra en fase de ayuno, el descenso adicional de la concentración de la glucosa plasmática motiva que las células α del páncreas secreten glucagon. La caída del cociente insulina/glucagon dirige el metabolismo celular de los distintos órganos y tejidos, así como su perfecta interconexión e integración, asegurando el suministro continuo de glucosa al cerebro. En el estado de ayuno, la gluconeogénesis hepática es la vía principal que mantiene la glucemia. El hígado exporta glucosa a cerebro y músculo. En éste último, el piruvato y el lactato originados en la degradación glucolítica se transportan al hígado, donde se utilizan como precursores de la glucosa en la vía gluconeogénica, completándose así el denominado ciclo de Cori (glucosa-lactato). También la alanina, generada por la transaminación del piruvato, se puede convertir en glucosa en el hígado, cerrando el ciclo glucosa-alanina. A medida que el ayuno se prolonga, las reservas hepáticas de glucógeno se agotan. La gluconeogénesis a partir de lactato y alanina continúa, pero este proceso sólo recupera la glucosa que previamente se había convertido en lactato y alanina en los tejidos periféricos. Como el cerebro consume glucosa continuamente, es necesaria su síntesis a partir de otras fuentes carbonadas. Uno de los sustratos que aporta carbonos es el glicerol liberado en la lipólisis del tejido adiposo y que entra a nivel de la glucólisis. Los ácidos grasos que se movilizan de los adipocitos constituyen una buena fuente energética que se utilizará con preferencia a la glucosa en la mayoría de los tejidos. En el hígado, la oxidación de los ácidos grasos aporta la mayor parte del ATP necesario para la gluconeogénesis. Sin embargo, en el estado de ayuno sólo una pequeña parte de acetil-CoA que se libera en la β -oxidación entra en el ciclo del ácido cítrico para su completa oxidación. El destino principal de esta molécula es la formación hepática de cuerpos cetónicos que se liberan a la sangre y que se captan en los tejidos que pueden utilizarlos como fuente energética.

En el cerebro, aunque constituyen el combustible alternativo a la glucosa, los cuerpos cetónicos no satisfacen por completo las necesidades energéticas de las células, para las cuales siempre es necesario el suministro de glucosa.

En el músculo esquelético, los cuerpos cetónicos evitan que se produzca la hidrólisis de las proteínas, ya que, a medida que los ácidos grasos se oxidan en el hígado, aumenta la concentración de cuerpos cetónicos en el plasma y, en consecuencia, las células demandan

menos glucosa y menos aminoácidos gluconeogénicos. En estas condiciones, no se activa la proteólisis ni tiene lugar, por tanto, la destrucción del fundamental tejido muscular.

Estas interrelaciones están coordinadas a través del glucagon, cuyo efecto es la estimulación de la glucogenólisis y la liberación de la glucosa desde el hígado, así como la movilización de los ácidos grasos en el tejido adiposo.

Con la realimentación, la glucosa requiere un tiempo de adaptación: inicialmente las células hepáticas apenas captan glucosa, debido a que la mayor parte de la glucosa que recibe a través de la vena porta, se distribuye al cerebro y a otros tejidos periféricos. El hígado permanece en estado gluconeogénico durante algunas horas después de la ingesta con el fin principal, no de liberar glucosa a la sangre, sino de proporcionar glucosa fosforilada para restablecer las reservas del glucógeno hepático. Pero, a medida que la concentración plasmática de glucosa se eleva, también aumenta la velocidad de captación de ésta por el hígado que la utiliza para obtener energía mediante la glucólisis; su exceso, queda disponible para la síntesis de glucógeno y, seguidamente, los metabolitos procedentes de la degradación oxidativa de la glucosa se destinarán a la síntesis de ácidos grasos y triacilgliceroles.

Estos ajustes metabólicos desencadenados por la insulina y el glucagon tienen lugar en cortos intervalos de tiempo. A más largo plazo actúan otros mecanismos reguladores para mantener en equilibrio la ingesta de nutrientes y el gasto energético, de manera que el organismo de los mamíferos se mantenga en una homeostasis perfectamente controlada **(19)**.

INSULINA

Ésta es una hormona que se produce en las células beta del páncreas, el gen que la codifica se encuentra en el brazo corto del cromosoma 11. NeuroD1/BETA2 media la transcripción de este gen uniendo al elemento E-box con el conductor-desencadenador de la insulina **(2)**. La primera macromolécula en la secuencia de su síntesis es la **pre-insulina**, la cual es transportada al retículo endoplásmico, en donde forma su configuración terciaria y sufre una sulfa-oxidación apareciendo dos puentes disulfuros en la molécula, generándose en esta forma la **pro-insulina**. En el aparato de Golgi se estructura una membrana alrededor de un número determinado de moléculas, constituyéndose un

gránulo. En el cual, bajo la acción de enzimas de naturaleza proteolítica, es escindida progresivamente la molécula de pro-insulina, dando lugar como productos finales a cantidades equimolares de insulina y péptido C, proceso que no se completa totalmente quedando un pequeño porcentaje de pro-insulina. Adicionalmente existe captación de zinc, formándose gránulos de zinc-insulina. El transporte de los gránulos hacia la membrana plasmática se hace a través de microtúbulos de actina impulsados por filamentos ciliares contráctiles y los gradientes de potencial electroquímico. Los gránulos se fusionan a la membrana celular y son secretados por exocitosis hacia el espacio extracelular en donde se disuelven. La insulina en forma de monómero, junto al péptido C, difunden hacia los capilares en forma equimolar. También existe una pequeña secreción de pro-insulina (10% de la insulina).

La secreción de insulina está regulada por la interacción de sustratos, del sistema nervioso autónomo, de hormonas y de señales intercelulares (paracrinas). La glucosa, aminoácidos (arginina y leucina), cetoácidos y ácidos grasos constituyen los estímulos primarios, ya que al metabolizarse incrementan la concentración de ATP inhibiendo los canales de potasio ATP sensibles y favoreciendo el flujo de calcio al citosol al abrir los canales electrosensibles de este catión. El calcio se une a una proteína (la calmodulina) que en su forma activa interactúa con otras proteínas como la *proteína cinasa C*, que a su vez activa al citoesqueleto promoviendo la síntesis de miosina para formar los cilios contráctiles que permitirán la secreción de los gránulos de insulina reclutados en la célula beta pancreática.

La interregulación entre glucosa e insulina mantiene los niveles de glucemia en un estrecho margen fisiológico. La célula beta tiene la sensibilidad de percibir pequeños cambios de la concentración de glucosa respondiendo de inmediato con una secreción insulínica proporcional. En condiciones normales, si existe mayor demanda por una elevación mantenida de la glucosa, aumenta la sensibilidad a ella y luego es capaz de estimular la replicación de las células beta. Estos efectos tienen una distinta secuencia temporal: en segundos responde a los cambios de la glucemia, en minutos aumenta la sensibilidad y en semanas se adapta incrementando la masa celular. Estos mecanismos garantizan un ajuste del sistema a diferentes cargas de glucosa y cualquier defecto resulta en un cambio de equilibrio y al desorden metabólico.

La incorporación de la glucosa a la célula se hace por mecanismos diferentes dependiendo del tejido. La insulina ejerce su acción para el control de la glucosa de manera indirecta a través del receptor de la insulina.

El receptor de la insulina se clasifica dentro de aquellos que tienen actividad de tirosina cinasa. Su gen está localizado en el brazo corto del cromosoma 19 humano y está constituido por 22 exones distribuidos a lo largo de 150 kb. Su transcripción da lugar a una proteína precursora que al ser procesada origina dos cadenas α y dos cadenas β . El receptor de la insulina sólo se expresa en músculo, tejido adiposo, hígado y páncreas como un tetrámero donde las cadenas α (de 135kDa), ricas en cisteínas y glicinas, interactúan con la insulina. Estas cadenas se unen por puentes disulfuro a dos cadenas β (95 kDa) que atraviesan la membrana plasmática y cerca de la región carboxilo terminal se encuentran los residuos de tirosinas.

El primer evento específico es la unión de la insulina a las cadenas α del receptor, esto provoca un cambio conformacional en las cadenas α y autofosforilación de las cadenas β . Después de la autofosforilación del receptor, se inicia la activación de las tirosinas cinasas de los sustratos del receptor de insulina (IRSs) que tienen en su región N-terminal un grupo que se asocia con fosfolípidos de membrana y/o proteínas intracelulares activándose así una serie de cascadas de señalizaciones para la exocitosis de transportadores de glucosa (GLUT4). **(34)**.

La etapa final para el control de la glucosa se efectúa mediante los transportadores difusionales de glucosa (GLUT) de los cuales se conocen 9, del 1-5 y del 8-11.

GLUT1 es un transportador constitutivo de la glucosa que se expresa en varios tejidos como el cerebro, eritrocitos y células endoteliales.

GLUT2 (con baja afinidad por la glucosa) es el sensor de la célula β del páncreas para la liberación de la insulina en presencia de altas concentraciones de glucosa; también se expresa en el riñón, en el epitelio del intestino delgado y en el hígado.

GLUT3, es de alta afinidad para la glucosa, se expresa en neuronas y placenta.

GLUT5 es un transportador de fructosa se expresa en intestino delgado, en células espermáticas, en riñón, en cerebro, en tejido muscular y adiposo.

GLUT8 transporta glucosa y es regulado hormonalmente a nivel testicular en el adulto.

GLUT4, con peso molecular aproximadamente de 45 kDa, es el principal responsable de la incorporación de la glucosa al interior de las células musculares y de los adipocitos. En ausencia de insulina, alrededor de 90% del GLUT4 se encuentra secuestrado intracelularmente en vesículas que son llevadas hacia la membrana plasmática. Las vesículas transportadoras contienen proteínas V-SNARE (conocidas como sinaptobrevinas), VAMP2 y VAMP3 que interactúan físicamente con las proteínas T-SNARE (conocidas como syntaxina 4 y SNAP23) que se encuentran localizadas en la cara interna de la membrana plasmática. También participan las proteínas del citoesqueleto como la actina y la tubulina que interactúan con los complejos proteicos para la movilización y anclaje de los GLUT en la membrana plasmática.

ALTERACIONES DE LA HOMEOSTASIS EN LA DIABETES MELLITUS

Las alteraciones en la homeostasis del paciente diabético se deben principalmente al constante estado de hiperglucemia, que conlleva a una serie de reacciones espontáneas no enzimáticas denominadas glicosilación proteica. De esta forma, aunque la glucosa sea la fuente más inmediata de energía por parte de las células, su concentración elevada arriba de 126 mg/dL, se convierte en el promotor de lesiones en los diferentes órganos. **(21)**.

La hiperglucemia se debe a una insuficiente secreción pancreática de insulina, causada en la mayoría de los casos por la destrucción selectiva de las células β de los islotes de Langerhans. **(22)**. También se presenta ante la resistencia que ofrecen los tejidos periféricos a la acción de la hormona, usualmente atribuida a alteraciones en ésta o de su receptor, siendo esta última la causa de mayor prevalencia.

La hiperglucemia, característica de los pacientes diabéticos, se mide en ayuno obteniéndose valores > 126 mg/dL y en examen de glucosa postprandial (2h después de haber ingerido alimentos) se obtienen valores > 200 mg/dL

Esta alteración en la homeostasis de la glucosa es la causante de la sintomatología de la diabetes mellitus: de ella forman parte la **glucosuria**, presencia de glucosa en la orina debido a que el filtrado renal contiene niveles exageradamente altos de glucosa, que superan la capacidad de las células tubulares proximales de absorberla en su totalidad. La glucosa presente en los compartimentos subsiguientes ejerce un alto efecto osmótico sobre los líquidos extratubulares, permitiendo el paso de grandes cantidades de líquido desde el

espacio intersticial al lumen intratubular, para luego ser excretados en volúmenes abundantes de orina (**poliuria**), lo que ocasiona un estado de **hipovolemia** y de aumento en la concentración y osmolaridad plasmática, condiciones que son percibidas por los osmoreceptores del hipotálamo, quien como mecanismo compensador induce al nervio supraóptico a producir hormona antidiurética. Como mecanismo secundario el hipotálamo induce la ingesta de agua por medio de la activación del núcleo de la sed. A este fenómeno de sed excesiva se le conoce como **polidipsia**. (39).

En la diabetes mellitus las células no pueden captar glucosa, entonces optan por metabolizar triglicéridos para generar cuerpos cetónicos, los cuales son sintetizados en las mitocondrias hepáticas y en cantidades extrafisiológicas acidifican el pH del organismo produciendo **cetoacidosis diabética**.

Los cambios hemáticos más frecuentes en la diabetes son: **glicosilación de la hemoglobina** en el extremo NH₂-terminal de los aminoácidos lisina y valina de la cadena α de la hemoglobina, anulando cargas positivas que estos aminoácidos aportan y disminuyendo su afinidad o sensibilidad a 2,3-difosfoglicerato, evitando una buena captación de oxígeno y, por ende, hipoxia en los tejidos. También disminuye la capacidad de proliferación de leucocitos y la capacidad fagocítica, por lo que el paciente diabético presenta defensas inmunológicas bajas.

En las **microangiopatías** se encuentra daño a nivel de capilares sanguíneos y se trata de un engrosamiento de la pared capilar producido por la glicosilación de la pared endotelial. Dentro de esta patología se encuentra el daño al endotelio vascular, glomeruloesclerosis y la retinopatía diabética. (20).

La **nefropatía diabética** consiste en un engrosamiento del glomérulo que permite filtrar más albúmina de lo normal en la orina. Esta etapa se llama “microalbuminuria” y a medida que progresa se destruye un creciente número de glomérulos por lo que las cantidades de albúmina excretada se incrementan. La proteína puede aparecer en la orina por cinco a diez años antes de que se presenten otros síntomas.

La hipertensión a menudo acompaña a la neuropatía diabética y con el tiempo la capacidad de funcionamiento del riñón comienza a disminuir lo cual puede llevar a una insuficiencia renal crónica que progresa hacia una enfermedad renal en estado Terminal.

Esto ocurre en un período de 2 a 6 años después de la aparición de la proteína alta en la orina (**proteinuria**).

En las **macroangiopatías** se afectan los vasos de gran calibre y tiene involucrados a factores etiológicos como la hiperlipidemia o dislipidemia, hiperlipoperoxidemia y el aumento de glicosilación de las proteínas. Estos factores se engloban un solo padecimiento llamado aterosclerosis que conlleva a trombosis e infarto en el paciente diabético.

Las **neuropatías** se componen de trastornos metabólicos como la desmielinización y el “encharcamiento” del tejido nervioso, causado por la entrada masiva de glucosa y agua al tejido nervioso, pues, el transporte de glucosa a este tejido no requiere de insulina.

Las **cataratas diabéticas** se deben principalmente a la acumulación de sorbitol que se sintetiza dentro del cristalino, el cual siendo impermeable a membranas debe convertirse en fructosa para poder salir. La gran concentración de glucosa acelera la acción enzimática produciendo grandes cantidades de sorbitol que no puede ser transformado a fructosa por la saturación del sistema.

Otra complicación es el **pie diabético**, en la cual intervienen la polineuropatía y microangiopatías que conducen a la pérdida de sensibilidad e isquemia, respectivamente. Aunado a esto, la inmunopatía que condiciona al diabético mal controlado a ser más propenso a las infecciones y que estas sean más virulentas y refractarias al tratamiento. **(28)**.

Objetivo General

Evaluar molecularmente la variante A45T del gen *NeuroD1/BETA2* en pacientes diabéticos tipo 2 de inicio temprano y de inicio tardío, para determinar en qué medida influye ésta sobre el desarrollo de diabetes y a qué edad se encuentra más asociada.

Objetivos particulares

- Determinar la presencia y/o frecuencia del polimorfismo A45T del gen *NeuroD1/BETA2* en 25 individuos con diabetes mellitus tipo 2 de inicio temprano y 25 con diabetes mellitus tipo 2 de inicio tardío.
- Efectuar la correlación entre el polimorfismo A45T y los resultados bioquímicos, así como con los datos clínicos de los pacientes.
- Determinar si la variante polimórfica A45T, confiere susceptibilidad al desarrollo de la diabetes.

Hipótesis

Debido a que la diabetes en México aparece en edades cada vez más tempranas, se espera hallar que la variante polimórfica A45T del gen NeuroD1/BETA2 confiera susceptibilidad al padecimiento de diabetes tipo 2 de inicio temprano.

Diseño Experimental

Muestras

Se tomaron 30 mL de sangre periférica de 25 personas diabéticas con más de 45 años de edad y de 25 personas diabéticas con menos de 30 años de edad. Para un grupo control se contactaron a 20 personas mayores de 45 años que no padecieran diabetes y que ningún miembro de su familia, al menos en tres generaciones, haya sido diabético.

Todas estas personas, firmaron una carta de conformidad para participar en este proyecto de investigación.

Para llevar a cabo los objetivos planteados, se realizaron pruebas bioquímicas (medición de glucosa, colesterol y triglicéridos), determinación de hormonas (insulina y glucagon) y péptido C mediante radioinmunoanálisis, pruebas moleculares como extracción de ADN, PCR, SSCP, y finalmente, la secuenciación de aquellas muestras que presentaron un patrón de corrimiento diferente.

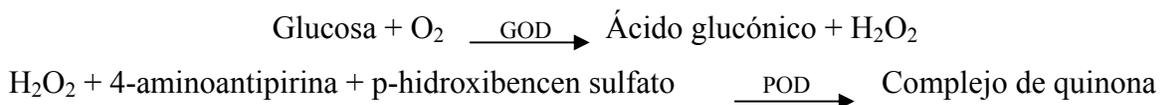
Pruebas bioquímicas

En la determinación de glucosa, colesterol y triglicéridos plasmáticos se utilizaron estuches comerciales enzimático-colorimétricos de la marca Stanbio Laboratory (LICON, Boerne TX).

a) Glucosa

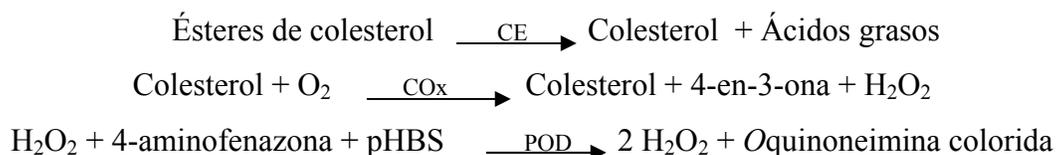
El método de glucosa oxidasa y peroxidasa (GOD-POD) se utilizó para medir los niveles de glucosa sanguínea.

En el método GOD-POD, en un primer paso la **glucosa oxidasa** cataliza la oxidación de la D-glucosa a ácido D-glucónico con formación de peróxido de hidrógeno. Éste es utilizado por la **peroxidasa (POD)** para oxidar un sustrato (4-aminofenazona y fenol) a un producto coloreado (quinonaimina). La intensidad de color es proporcional a la concentración de glucosa presente inicialmente. (En ocasiones se utilizan otros sustratos en lugar de 4-aminofenazona + fenol, tales como o-dianisidina, guayacol y ABTS). El compuesto colorido se lee a 500 nm.



b) Colesterol Total

En este método enzimático de detección de colesterol, la primera reacción consiste en la hidrólisis de los ésteres de colesterol por acción de *esterasas* bacterianas, inespecíficas con respecto al ácido graso esterificado; a continuación se produce la oxidación del colesterol (el formado en la reacción anterior y el preexistente, o colesterol libre en plasma) por una *colesterol oxidasa*, produciéndose H₂O₂, el cual con la participación de *peroxidasa* da lugar a la formación de un compuesto coloreado que se lee a 500nm.



c) Triglicéridos

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

1. El glicerol y los ácidos grasos se forman en una primera etapa por la acción de la lipasa sobre los triglicéridos.
2. El glicerol se fosforila por el adenosin-5'-trifosfato (ATP) para producir glicerol-3 fosfato (G-3-P) y adenosin-5'-difosfato (ADP) en una reacción catalizada por la glicerol-cinasa (GK).



3. El G-3-P es oxidado por la glicerolfosfato oxidasa (GPO) produciendo dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrógeno.



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



Determinación de hormonas

a) Insulina

Se utilizó el estuche comercial de Diagnóstico Systems Laboratorios Inc (DLS).

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

Procedimiento

1. Se llevaron a temperatura ambiente todos los reactivos y tubos de ensayo, antes de usarse.
2. Se marcaron 4 tubos de ensayo de polipropileno como tubos T (cuentas totales) y NSB (unión no específica) por duplicado.
3. Se marcaron con A 14 tubos recubiertos con anticuerpos anti-insulina (unión máxima) y de B a G por duplicado. Se marcaron tubos recubiertos, por duplicado, para controles y muestras de pacientes. (Ver apéndice I, Sección Insulina).
4. Se pipetearon 200 μL del calibrador cero A en los tubos NSB y A, y 200 μL de los restantes calibradores, control y muestras de pacientes en los tubos preparados.
5. Se agregó 1.0mL de ^{125}I Insulina a cada tubo y se agitó en vórtex.
6. Se incubaron en un lapso de 18-24h a temperatura ambiente (15-28°C).
7. Se leyó durante 1 minuto en el contador gamma.

Cálculos

Primero se calculó la media de las cuentas de unión no específica, corregidas por minuto:

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

Donde: CPM = Cuentas por minuto

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

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

Utilizando papel gráfico logarítmico se representó el porcentaje de unión en el eje vertical frente a la concentración en el eje horizontal (logarítmico) para cada calibrador y se dibujó la línea que pasa por los puntos. Los resultados de las muestras se leyeron en la curva por interpolación. Los datos fueron graficados y calculados por el contador gamma (1282 COMPUGAMMA CS, LKB Wallac).

b) Glucagon

Para la determinación de esta hormona, se utilizó el estuche comercial de Diagnostic Products Corporation (DPC).

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

Procedimiento

1. Se llevaron a temperatura ambiente, antes de usar, todos los componentes excepto la solución de precipitación. (Ver Anexo I, Sección Glucagon).
2. Se diluyeron los 500 pg/mL del calibrador F, justo antes del ensayo, en tubos de vidrio.
3. Se marcaron 16 tubos de vidrio por duplicado: T (cuentas totales), NSB (unión no específica), A (unión máxima) y B-F.
4. Se marcaron tubos por duplicado para las muestras de plasma y los controles.

5. Se pipetearon 200 μL del calibrador cero A en los tubos NSB y A, y 200 μL de cada uno de los calibradores restantes B-F en tubos correspondientemente marcados.
6. Se pipetearon 200 μL de cada muestra de plasma del paciente y de cada control en los tubos preparados.
7. Se añadieron 100 μL de antisuero para glucagon a todos los tubos, excepto a los tubos NSB y T.
8. Se cubrió el rack y se incubó durante 24 h a 2-8 $^{\circ}\text{C}$.
9. Se añadieron 100 μL de ^{125}I Glucagon a todos los tubos y se mezclaron con vórtex.
10. Se cubrió el rack y se incubó durante 24 h a 2-8 $^{\circ}\text{C}$.
11. Se añadió 1.0 mL de la solución de precipitación, fría, a todos los tubos y se mezclaron con vórtex.
12. Se centrifugaron a 1500 xg durante 15 min.
13. Se decantó el sobrenadante, reteniendo el precipitado para el contaje.
14. Se contó cada tubo durante 1 min.

Cálculos

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

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

Donde: CPM = Cuentas por minuto

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

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

Utilizando papel gráfico logarítmico se representó el porcentaje de unión en el eje vertical frente a la concentración en el eje horizontal (logarítmico) para cada calibrador y se dibujó la línea que pasa por los puntos. Los resultados de las muestras se leyeron en la curva por interpolación. Los datos fueron graficados y calculados por el contador gamma (1282 COMPUGAMMA CS, LKB Wallac).

Determinación del péptido C

Se utilizó el kit Péptido C de la Insulina RIA de Diagnostic Systems Laboratories, Inc (DSL). Para la determinación cuantitativa de péptido C en suero o plasma. El procedimiento sigue el principio básico del radioinmunoensayo, que consiste en la competición entre un antígeno radioactivo y otro no radioactivo por una cantidad fija de lugares de unión a anticuerpos. La cantidad de péptido C marcado con 125 I unida al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de péptido C presente, sin marcar. La separación del antígeno libre y el unido a anticuerpos se realiza rápida y fácilmente mediante un sistema de dos anticuerpos.

Procedimiento

1. Se esperó a que todos los reactivos alcanzaran la temperatura ambiente y se mezclaran completamente mediante inversión suave. (Ver Apéndice I, Sección Péptido C).
2. Se etiquetaron y dispusieron los tubos por duplicado para cuentas totales, unión inespecífica, estándares, controles y muestras problema.
3. Se añadieron 150 μ L de estándar de 0 ng/mL (A) a los tubos para unión inespecífica.
4. Se añadieron 50 μ L de estándares, controles y muestras problema a los tubos correspondientes.
5. Se añadieron con la repetidora 100 μ L de antisuero frente a péptido C a todos los tubos, *excepto a los tubos para cuentas totales y para unión inespecífica.*
6. Se añadieron 100 μ L de de Péptido C marcado con 125 I a todos los tubos.
7. Se agitaron todos los tubos con el vórtex.
8. Se incubaron a 2-8 °C durante 16-24 h
9. Se añadieron con la repetidora, 1.0 ml del reactivo de precipitación a todos los tubos, *excepto a los tubos para cuentas totales.*
10. Se agitaron todos los tubos con el vórtex.
11. Se incubaron a temperatura ambiente durante 15-20 min
12. Se centrifugaron durante 20 min a 1500 xg.
13. Se decantaron todos los tubos, *excepto los tubos de cuentas totales*, mediante inversión simultánea con una gradilla de esponja sobre un dispositivo para residuos radiactivos.

Se sacudieron los tubos firmemente sobre un material absorbente y se dejaron escurrir los tubos invertidos sobre el papel absorbente durante 15-30 segundos. Secar los bordes para eliminar las gotas restantes antes de volver a colocarlos en posición vertical.

14. Se introdujeron todos los tubos en un contador gamma durante 1 min.

Cálculos

Primero se calculó la media de las cuentas de unión no específica, corregidas por minuto:

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

Donde: CPM = Cuentas por minuto

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

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

Utilizando papel gráfico logarítmico se representó el porcentaje de unión en el eje vertical frente a la concentración en el eje horizontal (logarítmico) para cada calibrador y se dibujó la línea que pasa por los puntos. Los resultados de las muestras se leyeron en la curva por interpolación. Los datos fueron graficados y calculados por el contador gamma (1282 COMPUGAMMA CS, LKB Wallac).

Pruebas moleculares

a) Extracción de ADN

Procedimiento

El ADN se extrajo a partir de leucocitos de sangre periférica mediante una técnica estándar modificada por Buffone (Buffone y Darlington, 1985). La preparación de los reactivos empleados se puede ver en el Apéndice I, sección Extracción de ADN.

1ª Parte

1. Se sacaron del congelador los tubos con 10 mL de sangre total y se permitió que alcanzaran la temperatura ambiente.
2. Se mezclaron suavemente por inversión y se colocaron en hielo.

3. Se llevó, a cada tubo, a un volumen de 35 mL con solución sacarosa-tritón X-100 2X fría.
4. Los tubos se llevaron a un volumen final de 50 mL con agua desionizada y estéril.
5. Se mezclaron suavemente por inversión y se incubaron 10 min en hielo.
6. Se centrifugaron a 2000 rpm durante 15 min a 4 °C.
7. Se decantó el sobrenadante, de cada tubo, en un recipiente con hipoclorito de sodio y se desechó.
8. Se lavó el botón que quedó con 5 mL de solución sacarosa-tritón X 100 1X fría.
9. Se centrifugaron los tubos con el botón lavado a 2000 rpm durante 15 min a 4 °C.
10. Se decantó el sobrenadante de cada tubo en un recipiente con hipoclorito de sodio y se desechó. (Si el botón no se utiliza inmediatamente, puede congelarse a -70 °C hasta su uso).
11. Se agregaron 3 mL de buffer de lisis nuclear al pellet y se resuspendieron con una pipeta pasteur sellada de la punta.
12. Se agregaron 216 µL de SDS al 10% y se mezcló suavemente con la pipeta.
13. Se agregaron 100 µL de Proteinasa K (5 mg/mL) y se mezcló suavemente con la pipeta.
14. Los tubos se incubaron en Baño María a 37 °C con agitación suave toda la noche (mínimo 8 – 10 h).

2ª Parte

15. Se transfirió toda la muestra de cada tubo a tubos cónicos estériles de 15 mL.
16. Se agregó 1 mL de NaCl saturado a cada tubo y se agitaron vigorosamente.
17. Se centrifugaron a 2000 rpm durante 15 min a 4 °C.
18. Se transfirió el sobrenadante de cada tubo a otros respectivos tubos cónico de 15 mL.
19. Se agregó un volumen, 2 veces igual al de la muestra en cada tubo, de EtOH al 100% frío.
20. Se mezcló cada tubo suavemente por inversión.
21. Se sacó el ADN precipitado en cada tubo con su respectiva pipeta pasteur sellada de la punta.
22. Se lavó el ADN precipitado con EtOH al 70%, dentro de un tubo eppendorf, moviendo suavemente la pipeta.

23. Se dejó secar completamente a temperatura ambiente el ADN que está adherido en la pipeta pasteur.
24. Una vez seco el ADN se resuspendió en aproximadamente 200 µL de buffer Tris/HCl-EDTA (TE) en un tubo eppendorf estéril y dejó el tubo, con la pipeta dentro, 20 min a 37°C para incorporar la mayor cantidad posible.
25. Se cuantificó el ADN haciendo una dilución 1:200 de los 200 µL de TE donde estaba contenido el ADN (5 µL muestra + 995 µL de agua desionizada). Se mezcló en el vórtex 1-2 s. Se leyó por duplicado a 260 y 280 nm. *Las preparaciones puras tienen valores de 1.7–2.0*

b) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

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

Los oligonucleótidos se diseñaron de acuerdo a la secuencia reportada por Futura y col. 1998. (11) para la amplificación del exón 2-1 del gen NeuroD1/BETA2:

Sentido (forward primer): **5'-ACTTTTCGCAAGCATTGTACAGG-3'**

Antisentido (reverse primer): **3'-CGCGTTCAGTCCGTGCATGC-5'**

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

- 1.- Desnaturalización del templado de ADN por medio de una elevación de la temperatura a 94 °C en un tiempo de 30 s, para producir la ruptura de los puentes de hidrógeno intercatenarios y, por lo tanto, la separación de ambas cadenas.
- 2.- Alineamiento de los oligonucleótidos, los cuales se hibridan específicamente con el templado de ADN a 60 °C en 30 s

La temperatura óptima de hibridación (T_m) depende de varios factores y es relativamente específica de cada oligonucleótido. La longitud de éstos y la secuencia son críticas en la designación de los parámetros de una amplificación; la fórmula para calcularla es:

$$T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$$

3.- Extensión, en la cual, la Taq polimerasa incorpora nucleótidos en el extremo 3' del oligo utilizando como molde la cadena de ADN desnaturalizada. La temperatura a la que se lleva a cabo es a 72°C, ya que es cuando la Taq polimerasa alcanza su velocidad máxima.

c) Análisis Polimórfico Conformacional de Cadena Simple (SSCP)

La sustitución de una sola base es suficiente para alterar la movilidad de una sola cadena de DNA que es sometida a electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes. Dicha movilidad es atribuida a cambios conformacionales, resultantes de sustituciones, inserciones o deleciones en una cadena del ADN. (8).

El SSCP implica tres pasos:

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

Procedimiento

1. Se prepararon geles de poliacrilamida al 5.4% con y sin glicerol, y geles de poliacrilamida al 8.0% con y sin glicerol. (Ver Apéndice I, sección de Análisis polimórfico de cadena simple).
2. Se tomaron 2 µL de cada producto de PCR marcado con ³² P.
3. Se agregó a cada muestra 28 µL de buffer de carga para SSCP.
4. Se desnaturalizaron las muestras a 94° C durante cinco minutos.
5. Se dejaron reposar otros cinco minutos en hielo.
6. Los vidrios que contienen el gel de poliacrilamida, a una determinada concentración, se colocaron en la cámara de electroforesis.
7. Se llenó la cámara con buffer TBE 1X.
8. Se colocaron 3 µL de cada producto de PCR desnaturalizado en los pozos del gel.
9. Se aplicó una corriente de 200 V por 24 horas
10. Al término de la electroforesis, se separaron los vidrios y se transfirió el gel a un papel filtro Whatman de 3mm.
11. Se secó al gel en un desecador (Gel Dryer GD2A, Labnet) por 60 min a 75 °C.

12. Se colocó el gel adherido al papel, en un cartucho con pantallas intensificadoras y se expuso a una placa para rayos X durante 4-16 horas a temperatura ambiente.

13. Se reveló la placa.

d) Secuenciación

Esta prueba se realizó mediante el método automático de secuenciación. Para obtener la secuencia de bases nitrogenadas de un segmento de ADN se necesitan los siguientes compuestos:

- El ADN molde o segmento de ADN que se desea secuenciar, en gran cantidad y en estado de hélice sencilla.
- Un ADN polimerasa que replique el ADN.
- Un cebador o "primer" que suele ser un oligonucleótido corto de alrededor de 20 bases de longitud necesario para que la ADN polimerasa comience a añadir nucleótidos por el extremo 3' OH. Este cebador debe poseer una secuencia de bases complementaria a la del fragmento de ADN que se desea secuenciar.
- Los cuatro nucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), marcado con fluorocromos uno de los cuatro nucleótidos trifosfato en cada reacción.
- Por último, se necesitan nucleótidos didesoxi (ddATP, ddTTP, ddCTP y ddGTP). Los nucleótidos didesoxi son nucleótidos modificados que han perdido el grupo hidroxilo de la posición 3' de la desoxirribosa. Estos nucleótidos pueden incorporarse a la cadena de ADN naciente, pero no es posible que se una a ellos ningún otro nucleótido por el extremo 3'. Por tanto, una vez incorporado un nucleótido didesoxi se termina la síntesis de la cadena de ADN.

Método automático de secuenciación

La principal diferencia entre método enzimático de terminación de cadena y el método automático de secuenciación radica en el tipo de marcaje. En el método automático en vez de radiactividad se utiliza fluorescencia y lo habitual es realizar cuatro mezclas de reacción, cada una con nucleótido trifosfato (dTTP) marcado con un fluorocromo distinto. Este sistema permite automatizar el proceso de manera que es posible leer al mismo tiempo los ADNs de nueva síntesis producto de las cuatro mezclas de reacción.

La detección del tipo de fluorescencia correspondiente a cada reacción se lleva a cabo al mismo tiempo que la electroforesis, de manera que los fragmentos de ADN de menor tamaño que ya han sido detectados se dejan escapar del gel, permitiendo este sistema aumentar el número de nucleótidos que se pueden determinar en cada electroforesis y, por consiguiente, en cada secuenciación.

¡Ciencia! ¡Verdadera hija del tiempo tú eres!
que alteras todas las cosas con tus escrutadores ojos.
(Soneto a la ciencia) Edgar Allan Poe

Resultados

Se tomaron medidas antropométricas para determinar el índice cintura / cadera (ICC) e índice de masa corporal (IMC) para garantizar que se cumplieran los criterios de exclusión pues pacientes diabéticos con obesidad no son tema de estudio en este trabajo de tesis. A continuación se muestran las tablas de los respectivos grupos que se evaluaron:

TABLA I. Medidas antropométricas de pacientes diabéticos tipo 2 de inicio temprano.

Característica	$\bar{X} \pm DE$	Valores de referencia	Nº de sujetos
Edad (años)	27.88 ± 6.78	---	25
IMC (kg/m ²)	27.72 ± 5.38	18.5-25kg/m ²	25
ICC	0.97 ± 0.03	Hombres: 0.95	25
	0.9 ± 0.04	Mujeres: 0.85	

IMC, Índice de masa corporal; ICC, Índice de cintura cadera. Los datos indican promedio ± DE.

TABLA II. Medidas antropométricas de pacientes diabéticos tipo 2 de inicio tardío.

Característica	$\bar{X} \pm DE$	Valores de referencia	Nº de sujetos
Edad (años)	59.65 ± 9.62	---	25
IMC (kg/m ²)	27.58 ± 3.65	18.5-25kg/m ²	25
ICC	0.97 ± 0.04	Hombres: 0.95	25
	0.89 ± 0.04	Mujeres: 0.85	

IMC, Índice de masa corporal; ICC, Índice de cintura cadera. Los datos indican promedio ± DE.

TABLA III. Medidas antropométricas de no diabéticos o grupo control.

Característica	$\bar{X} \pm DE$	Valores de referencia	Nº. de sujetos
Edad (años)	59.9 ± 10.05	---	20
IMC (kg/m ²)	24.53 ± 2.46	18.5-25kg/m ²	20
ICC	0.87 ± 0.05	Hombres: 0.95	20
	0.82 ± 0.06	Mujeres: 0.85	

IMC, Índice de masa corporal; ICC, Índice de cintura cadera. Los datos indican promedio ± DE.

Resultados de determinaciones bioquímicas

Se realizaron pruebas bioquímicas para determinar la concentración de glucosa, colesterol y triglicéridos en plasma. A continuación se muestran los gráficos de barras para cada prueba, en donde se comparan ambos grupos de diabéticos respecto a un grupo control. Para un mejor análisis de los datos se realizaron pruebas de *Análisis de varianza* utilizando el programa GraphPad Prism 4, para comparar los valores de cada grupo y observar si son significativamente distintos entre sí. Se utilizó un intervalo de confianza de 95% y una $p < 0.05$ como significativa.

a) Glucosa

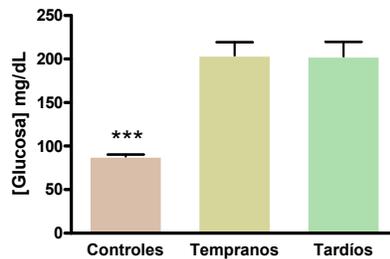


Fig. 4. Valores de glucosa plasmática en condiciones de ayuno de diabéticos y grupo control.
Valores de referencia: 70-100 mg/dL

Con los datos de las concentraciones de glucosa plasmática se calculó una $p < 0.0001$, por lo tanto, hay una diferencia significativa en ambos grupos de diabéticos respecto al grupo control.

b) Colesterol

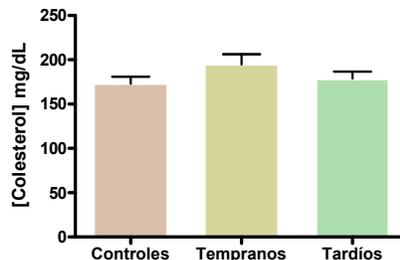


Fig. 5. Valores de colesterol plasmático en condiciones de ayuno de diabéticos y grupo control.
Valores de referencia: < 200 mg/dL

Para esta prueba se calculó una $p = 0.2831$, es decir que la concentración plasmática de colesterol entre los grupos no es diferente.

c) Triglicéridos

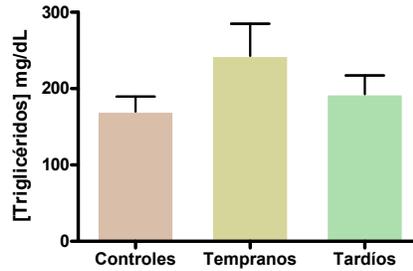


Fig. 6. Valores de triglicéridos plasmáticos en condiciones de ayuno de diabéticos y grupo control. Valores de referencia: 50-200 mg/dL

Con los datos para la prueba de triglicéridos se calculó una $p = 0.7598$ por lo que no hay diferencia significativa entre los tres grupos analizados.

Resultados de la determinación de hormonas

Para conocer y comparar el estado hormonal de pacientes diabéticos de inicio temprano y de inicio tardío, se realizaron determinaciones de insulina y glucagon las cuales se compararon respecto al grupo control. Así mismo para tener una referencia de la síntesis endógena de insulina de cada individuo, se determinó la concentración plasmática del péptido C.

a) Insulina

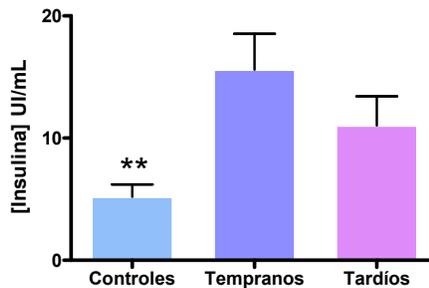


Fig. 7. Valores de insulina plasmática en condiciones de ayuno de diabéticos y grupo control. Valores de referencia: 5-25 UI/mL

En este gráfico se observó una diferencia significativa entre los grupos analizados y se calculó una $p = 0.0112$

b) Péptido C

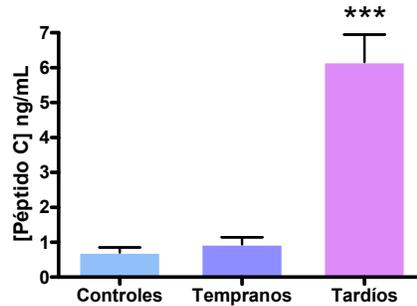


Fig. 8. Valores de péptido C plasmático en condiciones de ayuno de diabéticos y grupo control.
Valores de referencia: 1.1-3.2 pg/mL

La concentración plasmática de péptido C mostró diferencia significativa entre los grupos analizados, donde el grupo de diabéticos tardíos es diferente de los otros grupos. Se calculó una $p < 0.0001$

c) Glucagon

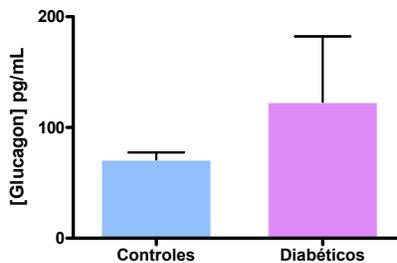


Fig. 9. Valores de glucagon plasmático en condiciones de ayuno de diabéticos y grupo control.
Valores de referencia: 59-177 pg/mL

Para esta prueba se calculó una $p < 0.3412$ lo cual indica que no hay diferencia significativa entre grupo control y diabéticos de inicio temprano.

Resultados moleculares

Amplificación de las muestras (PCR)

Una vez extraído el ADN de cada muestra, se procedió a hacer una amplificación del exón 2-1 del gen *NeuroDI/BETA2*, pues es en ese fragmento donde se ubica el polimorfismo A45T. La talla del mismo es de 483 pb y los oligonucleótidos empleados fueron:

5'-ACTTTTCGCAAGCATTGTACAGG-3' y 3'-CGCGTTCAGTCCGTGCATGC-5'

A continuación, en la Fig. 10 y Fig. 11 se muestran dos fotografías representativas de los geles de agarosa al 1%, ambos se corrieron a 80 V durante treinta minutos y para comprobar la talla del exón se utilizó un marcador de 100 pb. El PCR se realizó con un dNTP marcado con ³²P para que posteriormente en la prueba del SSCP se revele en una placa radiográfica.

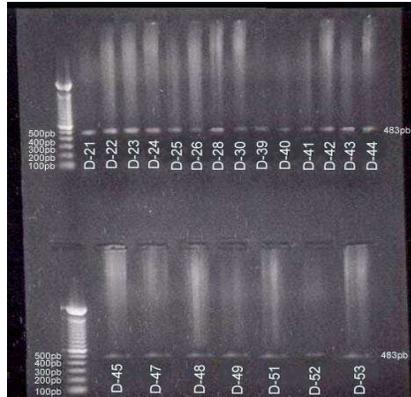


Fig. 10. La fotografía muestra las bandas de amplificación para el exón 2-1 del gen NeuroD1/BETA2, las muestras pertenecen al grupo de los diabéticos tipo 2 de inicio temprano.

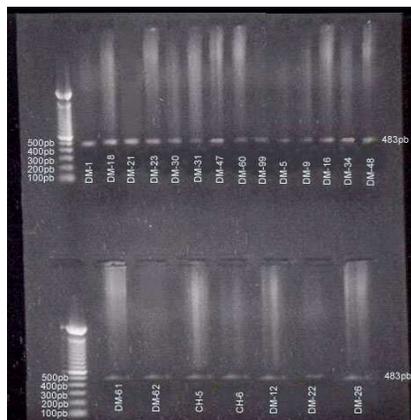


Fig. 11. Se observan las bandas de amplificación que corresponden al exón 2-1 del gen NeuroD1/BETA2, las muestras pertenecen al grupo de los diabéticos tipo 2 de inicio tardío.

Análisis polimórfico conformacional de cadena simple (SSCP)

Una vez amplificadas las muestras y comprobada la talla del exón, se procesaron para realizar el SSCP, es decir, se les adicionaron a cada una 28 µL de buffer de carga y se desnaturalizó el ADN al elevar la temperatura de las muestras a 95°C durante cinco

minutos y enfriar rápidamente a 4°C. Las siguientes figuras representativas muestran los patrones de corrimiento del ADN sencillo en cuatro condiciones diferentes.

I) Diabéticos tipo 2 de inicio temprano:

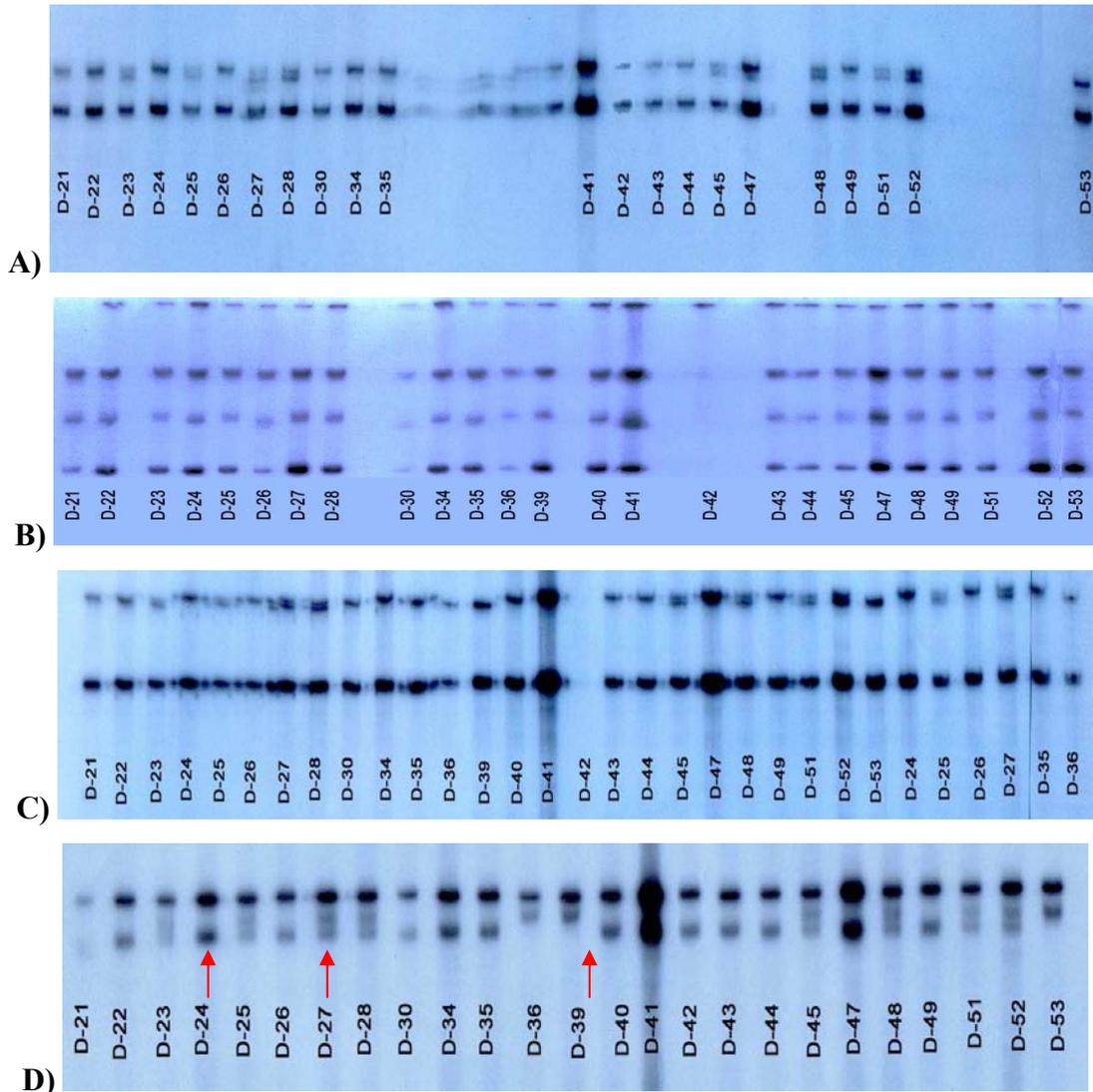


Fig. 12. Efecto de diferentes condiciones del gel de poliacrilamida en el corrimiento de ADN sencillo. **A)** Gel de poliacrilamida al 5.4% sin glicerol / 200 v / 24 h. **B)** Gel de poliacrilamida al 5.4% con glicerol / 200 v / 24 h. **C)** Gel de poliacrilamida al 8.0% sin glicerol / 200V / 24h. **D)** Gel de poliacrilamida al 8.0% con glicerol / 200 v / 24 h.

El corrimiento de las muestras en el gel de poliacrilamida al 8.0% y en presencia de glicerol (Fig. 12 D) es donde se puede apreciar mejor el corrimiento del ADN de las muestras de diabéticos tipo 2 de inicio temprano. Se distinguen tres diferentes patrones de

migración: Uno muy similar al de la muestra D-24, otro al patrón de migración de D-27 y el último al de D-39.

II) Diabéticos tipo 2 de inicio tardío:

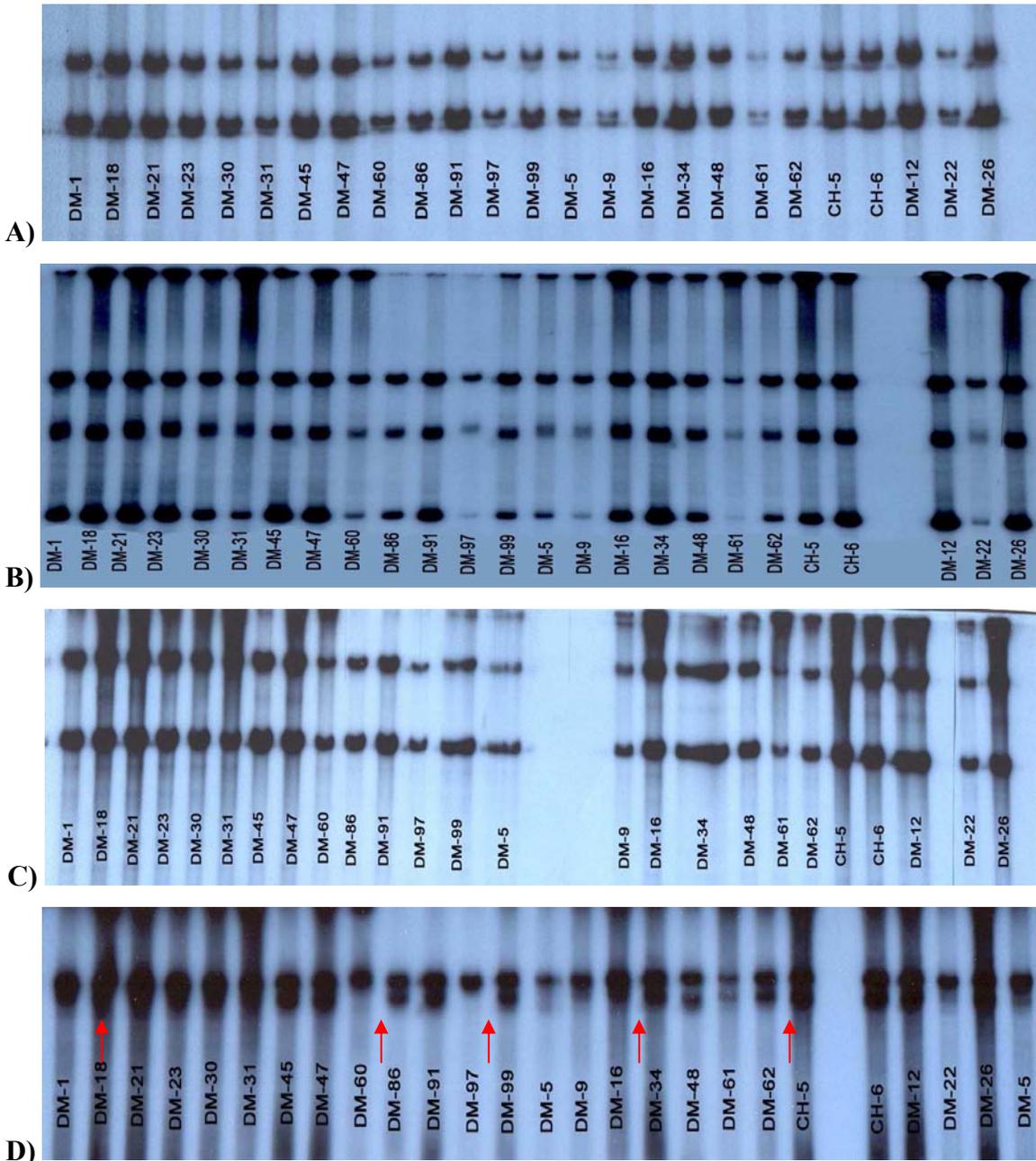


Fig. 13. Efecto de diferentes condiciones del gel de poliacrilamida en el corrimiento de ADN sencillo.
 A) Gel de poliacrilamida al 5.4% sin glicerol / 200 v / 24 h. B) Gel de poliacrilamida al 5.4% con glicerol / 200 v / 24 h.
 C) Gel de poliacrilamida al 8.0% sin glicerol / 200V / 24h. D) Gel de poliacrilamida al 8.0% con glicerol / 200 v / 24 h.

En la Fig. 13. D es donde se aprecia mejor el corrimiento del ADN a diferencia de las otras condiciones en las que se realizó el SSCP. Hay básicamente tres diferentes patrones de migración: el representado por la muestra con clave DM-16, el patrón de migración de la muestra DM-97 y el de DM-62. Se escogieron otras dos muestras la DM-18 y la DM-60 porque no se observaba un corrimiento similar a alguno de los ya reportados.

III) Controles:

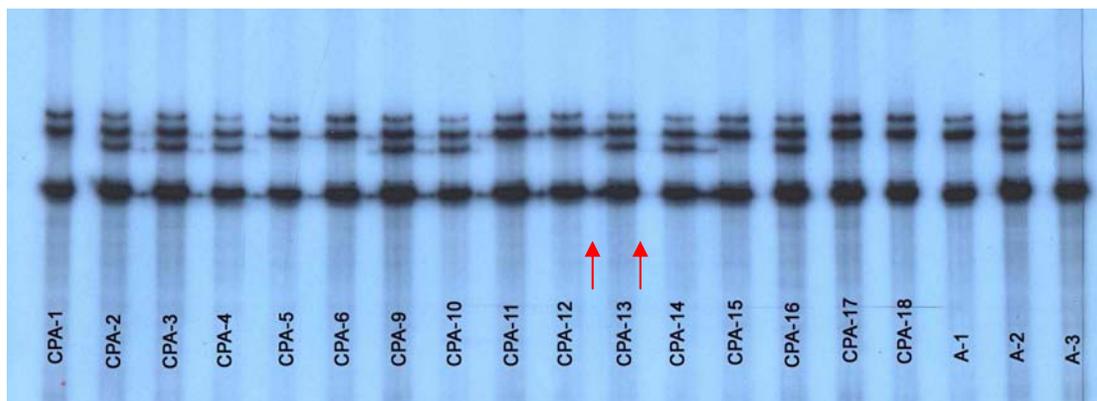


Fig. 14. Gel de poliacrilamida al 5.4% sin glicerol / 200V / 24h, muestras de individuos no diabéticos.

En la Fig. 14 se tienen básicamente dos diferentes patrones de corrimiento el que corresponde a la muestra CPA-12 y el de la muestra CPA-13.

Secuenciación

De acuerdo con los diferentes patrones de migración obtenidos en el análisis polimórfico conformacional de cadena simple, se escogieron como muestras representativas: D-24, D-27 y D-39 para el grupo de los diabéticos tipo 2 de inicio temprano; DM-16, DM-18, DM-60, DM-62 y DM- 97 para el grupo de los diabéticos tipo 2 de inicio tardío; CPA-12 y CPA-13 para el grupo control (no diabéticos).

Se realizó PCR, ahora sin ^{32}P , para amplificar el exón 2-1 del gen NeuroD1/BETA2, de las muestras representativas y posteriormente se purificó el producto de PCR para secuenciarlo. Se utilizó un estuche de Invitrogen para purificación de ADN y finalmente se secuenciaron de manera automática mediante un secuenciador ABI 3100 Capillary Sequencing Kit v1.1.

Las Fig. 15 y 16 muestran las fotografías que corresponden a los ADN purificados de las muestras seleccionadas:

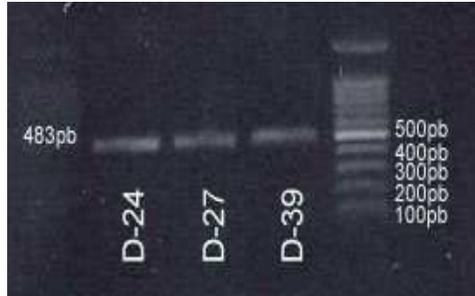


Fig. 15. Gel de agarosa al 1% / 80V / 30 min. Se observa que en las muestras de diabéticos tipo 2 de inicio temprano, si se encuentra el producto de PCR buscado, se purificaron los respectivos ADN.

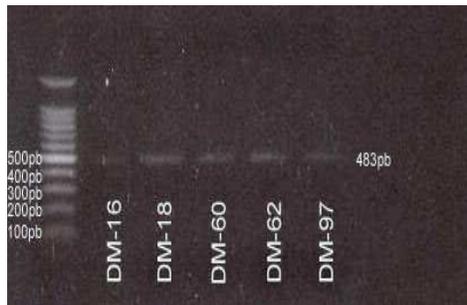


Fig. 16. Gel de agarosa al 1% / 80V / 30 min. Se observa que en las muestras de diabéticos tipo 2 de inicio tardío, si se encuentra el producto de PCR buscado, se purificaron los respectivos ADN.

En el apéndice II se presentan los electroferogramas correspondientes a la secuenciación del exón 2-1 del gen *NeuroDI/BETA2* de los diferentes grupos evaluados y en las tablas IV y V se resumen las frecuencias genotípica y alélicas de la variante Ala 45 Thr del gen *NeuroDI/BETA2*, las cuales se obtuvieron a partir de comparar los electroferogramas con la secuencia silvestre del exón 2-1 reportada por el Banco de Genes con clave de acceso AF045152. Para el cálculo de OR (Odds Ratio) y la probabilidad se utilizó el programa *Tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium and Tests for association* (<http://ihg.gsf.de/>) considerando un intervalo de confianza (C.I.) de 95% y $p < 0.05$ como significativa.

TABLA IV. Frecuencia genotípica de la variante NeuroD1/BETA2 – Ala 45 Thr

Genotipo	Diabéticos tipo 2		No diabéticos
	inicio temprano	inicio tardío	(Controles)
GG	14(56%)	15(60%)	10(50%)
AG	(0%)	9(36%)	10(50%)
AA	11(44%)	1(4%)	(0%)
OR(95%CI) para la variante (AA)	16.655(0.880-315.269)	1.703(0.063-45.659)	---

OR > 1 se considera como riesgo; $p = 0.0113$ para diabéticos tipo 2 de inicio temprano y $p = 0.4603$ para diabéticos tipo 2 de inicio tardío, siendo significativa una $p < 0.05$

En la Tabla IV se observó que el genotipo homocigoto AA confiere riesgo al desarrollo de diabetes tipo 2 de inicio temprano debido a que se calculó un OR = 16.655 y una $p = 0.0113$. Por el contrario, aunque el grupo de diabéticos tipo 2 de inicio tardío presentó un OR = 1.703, estadísticamente no significó riesgo ($p = 4603$).

TABLA V. Frecuencia alélica de la variante NeuroD1/BETA2-Ala 45 Thr

	Diabéticos tipo 2 inicio temprano	Diabéticos tipo 2 inicio tardío	No diabéticos (Controles)
	G	28(56%)	39(78%)
A	22(44%)	11(22%)	10(25%)
OR(95%CI) para el alelo A	2.357(0.951-5.843)	0.571(0.202-1.618)	---

OR > 1 se considera como riesgo; $p = 0.0613$ para diabéticos tipo 2 de inicio temprano y $p = 0.2888$ para diabéticos tipo 2 de inicio tardío, siendo significativa una $p < 0.05$

Al establecer cuál es el alelo que confiere el riesgo tanto en diabéticos tipo 2 de inicio temprano como de inicio tardío, no se encontró una diferencia significativa entre G y A. (Tabla V).

Tabla VI. Comparación de las características clínicas entre los diferentes genotipos de *Ala45Thr*

Característica	Ala45Thr-genotipos vs Genotipo silvestre			P
	A/A (<i>Thr/Thr</i>)	A/G (<i>Thr/Ala</i>)	G/G (<i>Ala/Ala</i>)	
N	12	19	39	---
M/F	4/8	5/14	12/27	---
IMC (kgm ⁻²)	M: 25.3±4.5	M: 23.5±1.9	M: 26.9±3.2	M: 0.3030
	F: 28.3±7.2	F: 25.1±3.9	F: 26.9±3.9	F: 0.3048
ICC	M: 1.03	M: 0.84±0.06	M: 0.92±0.05	M: 0.0919
	F: 0.93±0.0007	F: 0.85±0.06	F: 0.87±0.06	F: 0.2675
Glucosa (mg/dL)	*212.0 ± 91	141.5 ± 83	171.6 ± 77	*0.0443
Colesterol (mg/dL)	187.0 ± 64	183.8 ± 39	180.7 ± 42	0.9239
Triglicéridos (mg/dL)	213.9 ± 200	197.6 ± 103	205.9 ± 142	0.8711
Insulina (UI/mL)	15.0 ± 14.2	9.4 ± 11.6	10.8 ± 9.8	0.7163
Péptido C (ng/mL)	*1.9 ± 2.9	3.4 ± 3.9	3 ± 3.6	*0.0259
Glucagon (pg/mL)	75.3 ± 46.5	79.3 ± 31	109.9 ± 188	0.4712

N = número de personas con determinado genotipo; M = masculino; F = femenino; IMC = índice de masa corporal; ICC = índice de cintura-cadera; $P < 0.05$ se considera como significativo.

De acuerdo con la Tabla IV, el genotipo homocigoto AA es el que confiere riesgo y para conocer el impacto de este genotipo sobre el estado bioquímico y hormonal de los individuos que lo presentaron, se realizó un ANOVA (95%, $p < 0.05$). Sólo dos parámetros fueron diferentes en el genotipo AA respecto a los genotipos AG y GG: La concentración de glucosa (0.0443) y la concentración de péptido C (0.0259) plasmáticos.

La glucosa fue más elevada en pacientes con genotipo AA(*Thr/Thr*), así mismo, el péptido C se encontró disminuido. (Tabla VI).

Más se heredan las enfermedades que los caudales.
Adagio médico europeo S. XVI

Discusión

La diabetes mellitus constituye actualmente un problema importante de salud a nivel mundial. En 1995 México ocupaba el décimo lugar en incidencia de diabetes con 4 millones de enfermos y se estima que para el 2025, ocupará el séptimo con 12 millones. **(38)**. Datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2005-2006 (ENSANUT) indican que más de 9% de los adultos en México son diabéticos, y que el ritmo de crecimiento anual es de 3%. **(7)**. Asimismo, el gasto del sector salud en atención a la diabetes es muy elevado dado que existe un numeroso grupo de personas que inician la enfermedad antes de los 40 años y se exponen por más tiempo a los efectos adversos de la hiperglucemia aumentando con ello la posibilidad de tener complicaciones crónicas. **(6)**. Con la finalidad de reducir los altos costos en diabetes, investigadores de diferentes países han analizado genes involucrados en el desarrollo de esta enfermedad. La mayoría de los genes que han mostrado asociación codifican para factores de transcripción implicados en el desarrollo y función de la célula β pancreática, tales como los genes MODY: HNF-4 α , HNF-1 α , IPF-1, HNF-1 β , NeuroD1/BETA2, y genes del desarrollo pancreático entre los que destacan Pax 4, Ngn3 y Nkx2.2. **(10)**. En este contexto, el trabajo de tesis se centró en evaluar el polimorfismo A45T del gen NeuroD1/BETA2, el cual ha sido asociado a diabetes en poblaciones caucásicas y asiáticas. Los resultados obtenidos en esta investigación revelaron una asociación positiva entre el genotipo homocigoto de la mutación A45T de NeuroD1/BETA2 con la diabetes de inicio temprano y dicho genotipo se encontró en una frecuencia del 44% asociada a un OR = 16.65 que implica fuerte riesgo a desarrollar diabetes en mexicanos, este y otros aspectos se discutirán con detalle a continuación.

Al evaluar el estado metabólico de diabéticos de inicio temprano y de inicio tardío, se observó que la glucemia es un factor difícil de controlar ya que ambos grupos presentaron concentraciones plasmáticas de glucosa elevadas a pesar de que el 100% de los pacientes estaban bajo tratamiento basado en hipoglucemiantes orales y un 20% empleaban terapia combinada con insulina. Por otro lado, en las determinaciones de colesterol y triglicéridos no se encontró diferencia significativa entre los valores de diabéticos y controles (*colesterol* $p=0.2831$, Fig. 5 y *triglicéridos* $p= 0.7598$, Fig. 6); sin embargo, se

observó en ambos casos, una tendencia a mantener concentraciones plasmáticas de colesterol y triglicéridos en el límite superior de los valores de referencia, probablemente ésto se deba a una dieta inadecuada que induce la acumulación de estos lípidos y que se refleja en el 60% de sobrepeso y el 40% de obesidad reportados actualmente en la población mexicana (7).

En términos de los resultados, las pruebas bioquímicas reflejan que, si bien no hay desequilibrio metabólico significativo en colesterol y triglicéridos, niveles altos de éstos pueden contribuir al desarrollo de futuras complicaciones clínicas características de la diabetes, en sinergismo con la glucemia mal controlada, ya que al parecer, el manejo terapéutico resulta ineficiente si no es acompañado de una buena dieta y ejercicio físico, actividades a las cuales el paciente muestra poco apego. (1, 15).

En la evaluación hormonal se determinó la concentración plasmática de insulina a los tres grupos y se encontró una diferencia significativa entre diabéticos de inicio temprano y controles ($p = 0.0112$, Fig. 7). Diabéticos de inicio tardío y controles presentaron una tendencia que no debería pasar desapercibida, se observó que los valores de insulina están sesgados hacia el límite inferior; por el contrario, los valores para diabéticos de inicio temprano se sesgan hacia el límite superior. Esta diferencia puede deberse a que no se trate de insulina endógena y pudiera ser que en la concentración de insulina se estuviera midiendo a la hormona administrada como tratamiento. Para poder discernir si se trata de una o de otra, se utilizó la medición del péptido C en sangre periférica, esta prueba refleja la producción endógena cuantitativa de insulina. Así, se encontró que hay diferencia significativa entre diabéticos tardíos contra diabéticos tempranos y grupo control ($p < 0.0001$, Fig. 8) y que el aparente “aumento” de insulina en el grupo de diabéticos de inicio temprano pudiera ser resultado del tratamiento, ya que, esta hormona se halla en concentraciones equimolares con el péptido C como producto de la ruptura de la proinsulina; en este caso la proporción del péptido C es menor que la proporción de la insulina. De manera interesante se encontró que en los tres grupos hay una tendencia hacia una baja producción de insulina lo cual compromete directamente al funcionamiento de la célula β pancreática.

En estudios moleculares realizados al gen NeuroD1/BETA2 cuyo producto de expresión, el factor de transcripción neurogénico 1, está involucrado tanto en el desarrollo

de células β del islote pancreático como la transcripción del gen de insulina, se ha encontrado un polimorfismo muy frecuente ubicado en el codón 45, exón 2-1, el cual consiste en la transición de una guanina por una adenina ($G \rightarrow A$) que resulta en una alteración del código genético al sustituir el aminoácido alanina por treonina (Ala45Thr). (11). Investigaciones en modelos animales, encontraron que ratones deficientes de NeuroD1, desarrollaban diabetes severa, morfología anormal del islote y un número reducido de células β pancreáticas, ocasionándoles muerte perinatal por hiperglucemia (12, 36). Esto sugiere que el producto de dicho gen es un factor determinante para el buen funcionamiento del páncreas y por ende de la homeostasis de la glucemia. Así mismo, estudios en diferentes poblaciones caucásicas y asiáticas han encontrado resultados que difieren en cuanto a la asociación del polimorfismo A45T y el riesgo a desarrollar diabetes, lo cual parece indicar que esta enfermedad tiene bases genéticas distintas para cada población. La siguiente tabla, muestra la distribución de frecuencias genotípicas de la variante A45T en diferentes países y se compara con lo reportado en esta tesis.

Tabla VII. Distribución de frecuencias genotípicas de la variante A45T

País	Diabéticos	Controles	<i>Thr/Thr</i>		<i>Thr/Ala</i>		<i>Ala/Ala</i>		Referencias
			Diabetes (%)	Control (%)	Diabetes (%)	Control (%)	Diabetes (%)	Control (%)	
Japón	158	174	0	0	9.5	9.8	90.5	90.2	(13)
Francia	198	114	20.6	15.9	43.3	46	36.1	38.1	(5)
Dinamarca	403	261	14.9	18.4	44.4	41.4	40.7	40.2	(27, 43)
China	324	124	0	0	14.2	10.5	85.5	89.5	(45)
Japón	296	177	1.3	0	16.9	12.4	81.8	87.6	(3)
Polonia	223	171	13.9	14.6	48	39.8	38.1	45.6	(31)
India	82	316	0	0.6	13.4	23.1	86.6	76.3	(17)
China	369	87	1.3	0	16.7	8.0	82.0	92.0	(29)
México	50	20	24	0	18	50	58	50	Tesis

La frecuencia del genotipo homocigoto (Thr/Thr) reportada por los otros países es muy diferente a la encontrada en este trabajo de tesis (Tabla VII), en ningún caso destaca de manera drástica el valor de la frecuencia genotípica en diabéticos A45T-homocigotos con respecto al valor de los controles (24% vs 0% en México). Cabe mencionar que estas frecuencias genotípicas fueron halladas en un grupo más reducido de diabéticos y controles, lo cual pudiera sugerir que el genotipo homocigoto tiene mayor impacto sobre la población mexicana a diferencia de la caucásica y la asiática.

Estudios recientes han propuesto que el efecto de la variante Ala45Thr en diabetes tipo 2, confiere susceptibilidad y tiene efectos potenciales en la tolerancia a la glucosa y la transcripción del gen de la insulina. (3, 29). Sólo se ha reportado un estudio sobre la actividad biológica de A45T y no encontraron una asociación directa con la patogénesis de diabetes tipo 2. (27). Sin embargo, estos resultados no restan peso a los hallados en pacientes diabéticos, ya que las evaluaciones de actividad biológica *in vitro* varían de acuerdo a las condiciones experimentales planteadas.

Dándole prioridad a las evidencias reportadas acerca de esta variante en el gen NeuroD1/BETA2 y su papel fundamental en la diabetes, se evaluó molecularmente y se encontró que en diabéticos de inicio temprano la mutación A45T se presentó en una frecuencia del 44% con genotipo homocigoto (Thr/Thr) y 0% del genotipo heterocigoto (Thr/Ala). Por el contrario, en diabéticos de inicio tardío la mutación A45T tuvo una frecuencia de 4% como genotipo homocigoto y 36% como heterocigoto; de manera singular, los controles no presentaron casos de genotipo Thr/Thr y sólo encontró la variante A45T en un 50% para el genotipo Thr/Ala (Tabla IV). Lo que sugiere en primera instancia que hay una relación directa entre la presencia del genotipo homocigoto y la diabetes, y en segunda, que dicha relación está más ligada al desarrollo de diabetes en edad temprana. Esto se corrobora con datos que asocian fuertemente a la mutación A45T del gen NeuroD1/BETA2 y al riesgo que confiere al desarrollo de diabetes ($p = 0.0113$ significativa, OR = 16.65).

Tales datos podrían explicar el desarrollo de diabetes a edad temprana, pues el diabético con mutación homocigota carece del alelo silvestre que tal vez contrarreste el daño, como en el caso de la forma heterocigota que poseen los diabéticos de inicio tardío. En los controles, donde se observó una frecuencia del 50% para la variante A45T, se

podiera asumir a ésta como un polimorfismo ampliamente distribuido en la población mexicana, en forma heterocigota.

Al analizar en concreto los casos que presentaron el genotipo Thr/Thr, se observó una diferencia significativa en las concentraciones plasmáticas de péptido C ($p = 0.025$, *Tabla VI*) entre éstos y aquellos que tuvieron el genotipo Thr/Ala, tal observación pudiera sugerir la existencia de una falla en la secreción pancreática de insulina, característica asociada al desarrollo de diabetes en edades tempranas. Otro rasgo significativo que se observó fue que la glucosa plasmática en diabéticos con genotipo Thr/Thr era mayor que en diabéticos con genotipo Thr/Ala ($p = 0.0443$, *Tabla VI*), si se considera que todos los pacientes contaban con tratamiento hipoglucemiante, cabe cuestionarse el por qué los diabéticos de inicio temprano no respondieron al fármaco como lo hicieron los diabéticos de inicio tardío. Esto pudiera deberse a que el tratamiento empleado no es el más adecuado, pues se sabe que algunos hipoglucemiantes actúan promoviendo la síntesis y secreción de la insulina. Así, al estimular el páncreas de los diabéticos de inicio temprano con este tipo de fármacos se ocasiona el agotamiento de la reserva pancreática y pierde el efecto deseado. Además, las glicemias elevadas conllevan a complicaciones asociadas a la diabetes que ocurren alrededor de los 10 años del padecimiento, tales complicaciones afectarían más a diabéticos de inicio temprano debido a que se exponen durante más tiempo a niveles de glucosa elevados. **(33)**.

Claro está que hace falta más investigación para aseverar que la mutación A45T con genotipo homocigoto confiere susceptibilidad al desarrollo de diabetes en población mexicana. Se necesita en primer lugar, ampliar el número de pacientes a evaluar y obtener una frecuencia elevada para dicho genotipo; en segundo, realizar estudios de actividad biológica para recrear la mutación, pues hasta la fecha no hay evidencias suficientes que permitan constatar su verdadero efecto sobre la diabetes.

Con los hallazgos encontrados en esta investigación, se puede decir por lo pronto, dado que este es el primer estudio realizado en población latina y en concreto mexicana, que la mutación A45T del gen NeuroD1/BETA2 con genotipo homocigoto puede conferir susceptibilidad al desarrollo de diabetes tipo 2 de inicio temprano, y se espera que este estudio promueva futuras investigaciones enfocadas a conocer las bases genéticas de la diabetes mexicana y sus posibles soluciones en materia de terapia preventiva, construcción

de microarreglos y diseño de nuevos fármacos específicos para cada origen genético de diabetes; estrategias que en conjunto brindarán mejores alternativas de vida al gran número de mexicanos que padecen diabetes.

Conclusiones

- La población mexicana presenta la variante A45T del gen NeuroD1/BETA2 de genotipo homocigoto, con la frecuencia más alta reportada en el mundo.
- La variante Ala45Thr de genotipo homocigoto tiene mayor influencia sobre la susceptibilidad en pacientes diabéticos tipo 2 de inicio temprano, que en pacientes diabéticos tipo 2 de inicio tardío.
- El polimorfismo A45T del gen NeuroD1/BETA2 de genotipo homocigoto puede ser un marcador de la población mexicana para la diabetes mellitus tipo 2 de aparición temprana.

Apéndice I

Insulina

Reactivos:

- Insulina ^{125}I
- Calibradores para insulina marcados de A-G con: 0, 5, 15, 50, 100, 200 y 350 $\mu\text{UI/mL}$

Materiales:

Contador gamma

Vórtex

Pipetas volumétricas de 6 y 3 mL

Micropipeta de 50 y 150 μL

Puntas desechables para micropipetas

Pipeta repetidora de 100 μL y 1mL

Tubos de ensayo de polipropileno de 12 x 75mm

Gradilla para tubos de 12 x 75mm

Gradilla de esponja para decantación

Preparación de reactivos:

^{125}I insulina: Agregar a cada vial 100mL de agua destilada y mezclar por inversión suavemente. Almacenar refrigerando a 2-8°C durante 30 días después de su preparación o hasta la fecha de caducidad señalada.

Calibrador 0 A de insulina: Reconstituir con 6.0mL de agua destilada, utilizando pipetas volumétricas y agitar suavemente. Realizar alícuotas y almacenar a -20°C durante 30 días después de reconstituido.

Calibradores de B-G de insulina: Reconstituir con 3.0mL de agua destilada, utilizando pipetas volumétricas, agitar suavemente. Realizar alícuotas y almacenar a -20°C durante 30 días después de reconstituido.

Glucagon

Reactivos:

- Antisuero para glucagon
- ¹²⁵I Glucagon
- Calibrador cero para glucagon
- Calibrador F para glucagon
- Solución de precipitación
- Controles de glucagon

Materiales:

Contador gamma

Vórtex

Centrífuga refrigerada

Pipeta volumétrica de 1.0 mL

Pipeta graduada de 5 y 10mL

Micropipeta de 50, 100, 200, 500 y 1000 µL

Puntas desechables para micropipetas

Pipeta repetidora de 100µL y 1mL

Tubos de vidrio de 12 x 75mm

Gradilla para tubos de 12 x 75mm

Gradilla de esponja para decantación

Preparación de reactivos:

Antisuero para glucagon: Reconstituir añadiendo 10mL de agua destilada. Mezclar por inversión suave, tomar alícuotas y refrigerar a 2-8°C durante 30 días después de su reconstitución. Color azul.

¹²⁵I Glucagon: Reconstituir justo antes del ensayo con 10mL de agua destilada. Mezclar por inversión suave. Estable a 2-8°C durante 30 días después de su reconstitución.

Calibrador cero para glucagon: Reconstituir por lo menos 30 min antes de usarse, añadiendo 10mL de agua destilada. Mezclar suavemente por inversión. Estable a 2-8°C durante 30 días después de su reconstitución.

Calibrador F para glucagon: Reconstituir cada vial con 2.0mL de agua destilada, por lo menos 30min antes del ensayo. Usar pipeta volumétrica y mezclar por inversión suave. Desechar después de usarse.

Solución de precipitación: Se suministra en forma líquida. Guardar a 2-8°C durante 30 días después de la apertura del sello de aluminio. Color rojo.

Controles de glucagon (1 y 2): Reconstituir cada vial con 1.0mL de agua destilada, por lo menos 30min antes del ensayo. Utilizar pipeta volumétrica y mezclar suavemente por inversión. Desechar después de usar.

Péptido C

Reactivos:

- Estándares de Péptido C
- Péptido C marcado con I¹²⁵I (rojo)
- Antisuero frente a Péptido C (azul)
- Reactivo para la precipitación (azul)
- Controles de Péptido C

Materiales:

Contador gamma

Vórtex

Centrífuga refrigerada

Pipeta Volumétrica de 10.0 mL

Micropipeta de 50 y 150 μ L

Puntas desechables para micropipetas

Pipeta repetidora de 100 μ L y 1mL

Tubos de plástico o vidrio de 12 x 75mm

Gradilla para tubos de 12 x 75mm

Gradilla de esponja para decantación

Preparación de Reactivos:

Estándares de Péptido C (Liofilizados): Un vial etiquetado con la letra A que contiene 0 ng/mL y cinco viales etiquetados con las letras B-F que contienen concentraciones de aproximadamente 0.1, 0.5, 1.5, 5.0 y 20.0ng/mL de péptido C en un amortiguador de pH constituido por proteínas. Reconstituir el estándar A de 0ng/mL añadiendo 5.0mL de agua desionizada y los estándares B-F añadiendo 1.0mL de agua desionizada. Mezclar suavemente por inversión hasta su homogenización. Desechar después de usar.

Controles de Péptido C (Liofilizados): Dos viales, correspondientes a los niveles I y II, que contienen concentraciones bajas y altas de péptido C. Reconstituir cada vial añadiendo 1.0mL de agua desionizada. Mezclar suavemente por inversión hasta su homogenización. Desechar después de usar.

Péptido C marcado con I^{125} (Liofilizado): Un vial que contiene menos de 5 μ Ci de péptido C marcado con I^{125} en n amortiguador de pH. Reconstituir añadiendo 11mL de agua desionizada. Mezclar suavemente por inversión hasta su homogenización. Desechar después de usar.

Antisuero frente a Péptido C (Liofilizado): Un vial que contiene suero de cobaya frente a péptido C en un amortiguador de pH constituido por proteínas. Reconstituir con 10mL de agua desionizada. Desechar después de usar.

Reactivo para la precipitación: Un frasco de 105mL que contiene gammaglobulina de cabra frente a cobaya en una solución amortiguadora con polietilenglicol como agente precipitante, lista para usarse. Conservar a 2-8°C hasta su caducidad.

Extracción de ADN

Reactivos:

- Sacarosa Tritón 2X
- Sacarosa Tritón 1X
- Buffer de Lisis Nuclear
- SDS 10%
- Proteinasa K 5mg/ml
- NaCl saturado
- ETOH 100%
- ETOH 70%
- Buffer TE
- Hipoclorito de Sodio

Materiales:

Hielera

Centrífuga refrigerada

Gradilla para tubos Falcon de 50mL

Gradilla para tubos Falcon de 15mL

Gradilla para tubos eppendorf

Vasos de precipitado de 250mL

Vaso de precipitado de 500mL para decantar

Pipetas volumétricas de 5mL

Propipeta

Micropipetas de 100 y 1000 μ L

Puntas desechables para micropipetas

Pipetas Pasteur selladas de la punta

Tubos Falcon de 15mL

Tubos eppendorf de 1mL estériles

Tubos eppendorf de 500 μ L estériles

Baño María con agitación y Baño de Temperatura

Preparación de Reactivos:

Sacarosa Tritón 2X: Sacarosa 219g (0.64M)

Tris-Base 2.42g (0.02M)

MgCl₂ 2.03g (0.01M)

Tritón 100X 10mL (2%)

Vaciar todos los reactivos a un vaso de precipitados de 1000mL y agregar aproximadamente 800mL de agua desionizada.

Mezclar en el agitador magnético hasta que se homogenice.

Ajustar el pH a 7.6

Aforar a 1L

Filtrar con membrana

Almacenar a 4°C

Sacarosa Tritón 1X: Tomar un volumen de Sacarosa 2X y agregar un volumen igual de agua desionizada. Mezclar hasta homogenizar. Almacenar a 4°C.

Buffer Lisis Nuclear: Tris-Base 1.21g (10mM)

NaCl₂ 23.4g (400mM)

Na₂EDTA 0.75g (2mM)

Vaciar todos los reactivos a un vaso de precipitados de 500mL y agregar aproximadamente, 300mL de agua desionizada.

Mezclar en el agitador magnético hasta que se homogenice

Aforar a 500mL

Esterilizar en autoclave

Almacenar a Temperatura ambiente

Proteinasa K 5mg/mL: Pesar 50mg de la proteinasa (0.050g)

Llevar a 10mL

Mezclar completamente

Hacer alícuotas de 500 μ L

Almacenar a -20°C

NaCl saturado: Disolver 35g de NaCl en 100mL de agua desionizada

Solubilizar lo más posible hasta que quede una capa de sal en el fondo.

Almacenar a temperatura ambiente.

ETOH 70%: Tomar 70mL del alcohol absoluto (100%) y agregar 30mL de agua desionizada. Mezclar hasta homogenizar. Almacenar a 4°C .

Buffer TE: Tomar 1mL de Tris/HCL 10mM a pH 8.0

Agregar 200 μ L de EDTA 0.5M a pH 8.0

Aforar a 100mL

Almacenar a temperatura ambiente

Tris/HCl 10mM a pH8.0: Pesar 30.275g de Tris/HCl

Disolver con 150mL de agua desionizada

Ajustar el pH a 8.0

Aforar a 250mL

Almacenar a temperatura ambiente

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Reactivos:

- Super agua
- DMSO (dimetilsulfóxido) estéril
- Buffer 10X (*Promega*)
- Solución de MgCl₂ 25mM (*Promega*)
- Solución de dNTP (20mM, pH 8.0), la cual contiene los cuatro dNTPs.
- Buffer de carga ADN
- Bromuro de etidio
- Hielo

Enzimas:

DNA polimerasa termoestable (Taq ADN polimerasa) de marca *Promega*

Equipo de electroforesis:

Fuente de poder

Cámara electroforética

Gel de agarosa al 1%

Buffer 1X

Ácidos nucleicos y oligonucleótidos:

- ADN genómico humano disuelto en solución de TE a 10µg /mL, pH 7.6
- Primers 5'-3' y 3'-5' en concentración de 20µM cada uno y pH 7.6
- Marcador de pares de bases (100pb)

Material y Equipo especial:

Termociclador

Tubos eppendorf para PCR (pared delgada) estériles

Micropipetas de 2, 20 y 100µL

Puntas desechables y estériles para micropipetas

Baño de hielo

Preparación de reactivos:

Buffer 10X para la Taq polimerasa (Promega):

60µL de MgCl₂ 25mM + 40 µL de Buffer 10X

Guardar a -20°C

Solución de dNTPs (20mM, pH 8.0):

Para 10mM se colocan 25 µL de dATP, dTTP, dCTP y dGTP

Aforara a 400 µL con 300 µL de super agua

Guardar a -20°C

Super agua: Se filtra por una membrana de 0.45 µm y se esteriliza en autoclave.

Análisis polimórfico conformacional de cadena siple (SSCP)

Reactivos:

- DNA amplificado por PCR P³²
- dNTPs para SSCP
- Buffer de carga para SSCP
- TBE 1X
- TBE 10X
- Hielo
- Acrilamida al 30%
- TEMED (N,N,N', N'-tetrametiletilendiamina)
- Persulfato de amonio 10% w/v
- Cloruro de calcio
- Glicerol
- Agua destilada y estéril

Geles:

Gel neutro de poliacrilamida al 5.4% sin glicerol

Gel neutro de poliacrilamida al 5.4% con glicerol

Gel neutro de poliacrilamida al 8.0% sin glicerol

Gel neutro de poliacrilamida al 8.0% con glicerol

Materiales y Equipo especial:

Tubos eppendorf de 500 μ L estériles

Micropipetas de 10 μ L y 50 μ L

Puntas desechables estériles para micropipetas

Baño de hielo

Termociclador

Cámara de Electroforesis Vertical

Fuente de poder

Peines y espátula

Papel Filtro

Desecador de geles

Cartucho para placas de rayos X

Recipiente de desechos líquidos radiactivos

Recipiente de desechos sólidos radiactivos

Preparación de reactivos:

dNTPs para SSCP:

Para una concentración de 10mM se colocan en un tubo eppendorf de 0.5mL 25 μ L de dATP, dTTP y dGTP, respectivamente.

12.5 μ L de dCTP y 12.5 μ L de dCTP que contiene 32 P como marcador radiactivo.

Aforar a 400 μ L con 312.5 μ L de super agua.

Guardar a -20°C

Buffer de carga para SSCP:

Azul de bromofenol 25mg

Cianol-Xileno 25mg

Llevar a 10mL, filtrar con membrana de 0.45 μ m y tomar alícuotas de 500 μ L

Gel neutro de poliacrilamida al 5.4% sin glicerol:

Agua destilada 42.91mL

TBE 5X 14.0mL

Acrilamida:Bisacrilamida 30% 12.6mL

Para un volumen de 70mL, degasificar con agitación al vacío durante 5',
adicionar persulfato de amonio al 10% y 15 μ L de TEMED.

Gel neutro de poliacrilamida al 5.4% con glicerol:

Agua destilada 35.91mL

Glicerol 7.0mL

TBE 5X 14.0mL

Acrilamida:Bisacrilamida 30% 12.6mL

Para un volumen de 70mL, degasificar con agitación al vacío durante 5',
adicionar persulfato de amonio al 10% y 15 μ L de TEMED.

Gel neutro de poliacrilamida al 8.0% sin glicerol:

Agua destilada 36.85mL

TBE 5X 14.0mL

Acrilamida:Bisacrilamida 30% 18.6mL

Para un volumen de 70mL, degasificar con agitación al vacío durante 5',
adicionar persulfato de amonio al 10% y 15 μ L de TEMED.

Gel neutro de poliacrilamida al 8.0% con glicerol:

Agua destilada 29.85mL

Glicerol 7.0mL

TBE 5X 14.0mL

Acrilamida:Bisacrilamida 30% 18.6mL

Para un volumen de 70mL, degasificar con agitación al vacío durante 5',
adicionar persulfato de amonio al 10% y 15 μ L de TEMED.

Bibliografía

1. **Arturo J.** 2007. Obesidad, diabetes y pobreza: costo e implicaciones. *Ciencia (Comunicaciones libres)* pp 70-74
2. **Arun S., Melissa M., Edoardo M., Jacqueline L., Yi Qiu, Susan S., Roland S.** 1999. The neuroD1/BETA2 Sequences Essential for Insulin Gene Transcription Colocalize with Those Necessary for Neurogenesis and p300/CREB Binding Protein Binding. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLGY.* pp 704-713
3. **Azuma K., Yoshiharu T., Osamu N., Kana M., and Tohru E.** 2002. β -Cell Dysfunction in late-Onset Diabetic Subjects Carrying Homozygous Mutation in Transcription Factors NeuroD1 and Pax4. *Metabolism*, pp 1161-1165
4. **David J. H. and Bertrand D.** 2000. Pancreatic Development and Adult Diabetes. *Pediatric Research*, Review article, pp 269-274
5. **Dupont S. Vionnet N. Chevre JC, Gallina S, Diana C, Seino Y, Yamada Y, Froguel P.** 1999. No evidence of linkage or diabetes-associated mutation in the transcription factors BETA2/NEUROD1 and PAX 4 in type II diabetes in France. *Diabetologia*, pp 480-484
6. **ENSA 2000. 2.La salud de los adultos. Capítulo 6, Diabetes Mellitus**
7. **ENSANUT 2006. Salud Adultos.** Bvs.insp.mx/archivos/adultos_ensanut_2006.pdf
8. **E. Alejandro, S. José, G. María L. y F. Ricardo.** 2005. Uso de la técnica SSCP para detectar mutaciones puntuales del ADN mitocondrial humano. *Rev. Peru. Biol. Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM.* pp 349-358
9. **Fernando F., Ángela C., Elena C.** *Endocrinología.* Méndez Editores. México 2001. pp 391- 486
10. **Frayling TM, Evans JC, Bulman MP, Pearson E, Allen L, Owen K, Bingham C, Hannemann M, Shepherd M, Ellard S, Hattersley AT.** 2001. Beta-cell genes and diabetes: Molecular and clinical characterization of mutations in transcription factors. *DIABETES*, pp 94-100
11. **Hiroto F., Yukio H., Naoko I., Manami H., Lori S., Michelle M. Le Beau, Elizabeth M. Davis, Makiko O., Yasuhiko I., Michael S. German, and Graeme I. Bell.** 1998. β -Cell Transcription Factors and Diabetes. Mutations in the coding Region of the

BETA2/NeuroD1 (*NEUROD1*) and Nkx2.2 (*NKX2B*) Genes Are Not Associated With Maturity-Onset Diabetes of the Young in Japanese. *DIABETES*, pp 1356-1358

12. **Huang HP, Chu K, Nemoz-Gaillard E, Elberg D, Tsai MJ.** 2002. Neogenesis of beta-cells in adult BETA2/neuroD-deficient mice. *Mol Endocrinol*; pp 541-51
13. **Isao I., Seiho N., Hitoshi N., Shiori K., Tatsuhiko K., Yasushi Y., Tomoyuki A., Tsunefumi S., Yoshikazu U., Toshimitsu O., Shoichiro S., Suminori K., Michio Y., Hiroaki O., and Yoshiyuki N.** 1999. Association of Polymorphism in the NeuroD1/BETA2 Gene with Type 1 Diabetes in the Japanese. *DIABETES*, pp 416-419
14. **Itkin-Ansari P., Marcora E., Geron I., Tyrberg B., Demeterco C., Hao E., Padilla C., Ratineau C., Leiter A., Lee J. E., and Levine F.** 2005. NeuroD1 in the endocrine Pancreas: Localization and Dual Function as an Activator and Repressor. *DEVELOPMENTAL DYNAMICS*, pp 946-953
15. **Iván Justo R. y Neraldo Orlandi G.** 2005. Diabetes y obesidad. Estudio en un área de salud. *Rev Cubana Med Gen Intgr.* pp 1-6
16. **Iwasaki N.** 2001. Diabetes Mellitus. *Rinsho Byori*, pp 161-4
17. **Jackson AE, Cassell P, Notrh B, Vijayaraghavan S, Gelding S, Ramachandran A, Snehalatha C, Hitman G.** 2004. Polymorphic variations in the neurogenic differentiation-1, neurogenin-3, and hepatocyte nuclear factor-1 alpha genes contribute to glucose intolerance in a south Indian population. *Diabetes*; pp 2122-2125
18. **J. Ferrer, C. Cardalda y J.M. Servtja.** 2004. MODY: Una “transcriptopatía” de las células pancreáticas. *Biología molecular y aplicaciones terapéuticas futuras. Endocrinol Nutr*; pp 42-47
19. **J.J. Meier, J. D. Veldhuis, and P.C. Butler.** 2005. Pulsatile insulin secretion dictates systemic insulin delivery by regulating hepatic insulin extraction in humans. *Diabetes*; pp 1649-1656
20. **Jane E.B. Reusch.** 2003. Diabetes microvascular complications, and cardiovascular complications: what is about glucose?. *The journal of clinical investigation*; pp 986-988
21. **José D. Méndez.** 2002. Productos finales de glicosilación avanzada y complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Gac Méd Méx.* pp 49-55
22. **Kahn, SE.** 2003. The relative contributions of insulina resistance and Beta-cell dysfunction to the pathophysiology of type 2 diabetes. *Diabetología*; pp 3-19

23. **Kavvoura FK, Ioannidis JP.** 2005. Ala45Thr polymorphism of the NeuroD1 gene and diabetes susceptibility : a meta-analysis. *Hum Genet*; pp 116(3).
24. **Khoi Ch., Eric N., and Ming-Jer T.** 2007. BETA2 and Pancreatic Islet Development. *The Endocrine Society*; pp 23-46
25. **Kristinsson SY, Thorolfsson ET, Talseth B, Steingrimsson E, Thorsson AV, Helgason T, Hreidarsson AB, Arngrimsson R.** 2001. Mody in Iceland is associated with mutations in HNF-1 α and a novel mutation in NeuroD1. *Diabetologia*. pp 2098-103.
26. **Lars Hansen.** 2003. Candidates genes and late-onset type 2 diabetes mellitus. Susceptibility genes or common polymorphisms? *Dan Med Bull*; pp 320-46
27. **Lars H., Jan N. J., Sandra U., Helle V. P., Flemming P., Hans E., Ole P. K., Torben H., Palle S., Jorn N., Oluf P., the Danish Study Group of Diabetes in Childhood, and the Danish IDDM Epidemiology and Genetics Group.** 2000. NeuroD/BETA2 Gene Variability and Diabetes No Associations to Late-Onset Type 2 Diabetes but an A45 Allele May Represent a Susceptibility Marker for Type 1 Diabetes Among Danes. *DIABETES*; pp 876-878
28. **Leslie O. H., Alexis N. M., Luis Alberto del C. C.** 2005. Principales alteraciones de homeostasis en la diabetes mellitus. *Revista de la Facultad de Ciencias de Salud. DUAZARY*, pp 159-165
29. **Limei L., Weiping J., Taishan Z., Ming L., Huijuan L. and Kunsan X.** 2006. Ala45Thr variation in NeuroD1 gene is associated with early-onset type 2 diabetes with or without diabetic pedigree in Chinese. *Molecular and Cellular Biochemistry*; pp 199-204
30. **Liu L, Futura H, Minami A, Zheng T, Jia W, Nanjo K, Xiang K.** 2007. A novel mutation, Ser159Pro in the NeuroD1/BETA2 gene contributes to the development of diabetes in a Chinese potential MODY family. *Molecular and Cellular Biochemistr*; pp
31. **Malecki MT, Klupa T, Siezadzki J.** 2003. The Ala45Thr polymorphism of BETA2/NeuroD1 gene and susceptibility to type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *Acta Diabetol*; pp 109-111
32. **Maciej T. Malecki.** 2005. Genetics of type 2 diabetes mellitus. *ELSEVIER. Diabetes Research and Clinical Practice*, pp 10-21
33. **Michael Brownlee.** 2003. A radical explanation for glucose-induced β cell dysfunction. *The journal of clinical investigation*; pp 1788-1790

34. **Miguel C., Eduardo V., Jesús K.** 2001. Señales intracelulares que intervienen en el control de la glucosa. Artículo de Revisión. Gaceta Médica Méx; pp 135- 146
35. **Mitchell SM, Frayling TM.** 2002. The role of transcription factors in maturity-onset diabetes of the young. Mol Genet Metab; pp 35-43
36. **Naya FJ, Huang HP, Qiu Y, Mutoh H, DeMayo FJ, Leiter AB, Tsai MJ.** 1997. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. Genes Dev; pp 2323-2334
37. **Nora G. y Eduardo M.** 2003. Revisión de las características clínicas, metabólicas y genéticas de la diabetes mellitus. Bioquímica (Química Clínica, artículo de revisión); pp 14-23
38. **Pablo K. M., Marisela V. C., Margarita Z. H., Pino J. V.** 2001. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud.
39. **Rafael Carmena.** Ochoa y la Medicina, Capítulo 6: Complejidad de la diabetes mellitus tipo 2; pp 79 - 88
40. **R. Belfort, L. Mandarino, S. Kashyap, K. Wirfel, T. Pratipanawatr, R. Berria, R.A. Defronzo and K. Cusi.** 2005. Dose-Response effect of elevated plasma free fatty acid on insulin signaling. Diabetes; pp 1640-1648
41. **Timothy M. F., Julie C. E., Michael P. B., Ewan P., Lisa A., Katharine O., Coralie B., Michael H., Maggie S., Sian E., and Andrew T. H.** 2001. β -Cell Genes and Diabetes Molecular and Clinical Characterization of Mutations in Transcription Factors. DIABETES; pp 94-100
42. **Tusié T.** 2000. La genética de la diabetes mellitus tipo 2: genes implicados en la diabetes de aparición temprana. Rev. Inv. Clin.; pp 296-305
43. **Vesna B., Janos T., Vasein S., Tamara C., Viljemka B-P., Marijana P., Anita M., Tatijana Z.** 2006. NeuroD1 Gene and interleukin-18 Gene Polymorphisms in Type 1 Diabetes in Dalmatian Population of Southern Croatia. *Basic Science*; pp 571-8
44. **Winckler W, Weedon MN, Graham RR, Mc Carroll SA, Purcell S, Almgren P, Tuomi T, Gaudet D, Bostrom KB, Walker M, Hitman G, Hattersley AT, Mc Carthy MI, Ardie KG, Hirschhorn JN, Daly MJ, Frayling TM, Groop L, Altshuler D.** 2007. Evaluation of common variants in the six known maturity-onset diabetes of the young (MODY) genes for association with type 2 diabetes. DIABETES; pp 685-93

- 45. Ye I, Xu Y, Zhu Y, Fan Y, Deng H, Zhang J.** 2002. Association of polymorphism in neurogenic differentiation factor 1 gene with type 2 diabetes. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*; pp 484-487.