



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“Evaluación de los polimorfismos T130I del gen HNF4A, R133W del gen Pax4 y A45T del gen NeuroD1 en población Maya y Cora.”**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**ANA LILIA MARTÍNEZ BALTAZAR**

**TUTOR: Dra. MENJIVAR IRAHETA MARTA ALICIA**

**MÉXICO, D. F.**

**2009**





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:	Dr. Francisco Javier Plascencia de la Parra
Vocal:	Dra. Marta Alicia Menjívar Iraheta
Secretario:	Dr. Samuel Canizales Quinteros
Primer suplente:	Dr. León Patricio Martínez Castilla
Segundo suplente:	Dra. Maria Guadalupe Ortiz López

Sitio donde se realizó el tema:  
Hospital Juárez de México y  
Laboratorio de Investigación de Endocrinología  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.  
Laboratorio 202, Edificio F.

---

Asesor del tema

Dra. Marta Alicia Menjívar Iraheta

---

Asesor técnico

Dra. María de los Ángeles Granados Silvestre

---

Sustentante

Ana Lilia Martínez Baltazar



El desenlace escrito de mi formación universitaria se lo dedico a *Daniel y Lupe*, alias mis abuelitos, y a *Estela y Javier*, alias mamá y hermano.

“Somos todos esclavos de nuestro personaje, creado primeramente por la familia, segundo por la sociedad y tercero por la cultura. El camino de transformación es liberarse de la esclavitud. Detrás de mis mil máscaras soy auténtico.”

Alejandro Jodorowsky



## Agradecimientos

A Dios por darme vida, salud y una familia que me ha apoyado en todo momento, por darme la fuerza, y la fe para no rendirme en los momentos más difíciles.

A la UNAM, mi *alma mater*, que desde mis 14 años me ha dado conocimiento, risas, amistades, amor, desamor y mucha conciencia sobre nuestra sociedad. Porque desde entonces mi corazón azul es y mi piel dorada.

A la UNAM y el Hospital Juárez por darme los recursos económicos para la realización de esta tesis.

A mis abuelitos Daniel y Lupe por ser unos ángeles en mi vida, por cuidarme, consentirme y creer en mí. Por darme a una maravillosa mamá.

A Estela, mi mamá, por nunca dejarme sola, por las desveladas, por la preocupación, por los cuidados, por el ánimo, por el amor, por mi hermano.

A mi hermano, por cuidarme, por enseñarme que la escuela no es solamente la responsabilidad, y el aprender, si no el vivir, el equivocarme y salir adelante.

A mi papá, de corazón muchas gracias por estar al final de esta etapa. A tu manera me has enseñado cosas que nadie más me enseñará.

A mis primos César, Milton, Daniel y Tobi por ser mis otros hermanos, por cuidarme.

A mis tías Gloria y Eloisa por estar al pendiente de mi vida. A mis demás tíos y tías de mi no muy pequeña familia en el pueblo.

A la Dra. Menjívar, por ser mi tutora, guiarme, y señalar mis errores, gracias sobre todo por no perder la fe en mí, y decirme lo que piensa, mi agradecimiento por siempre.

A la Dra. Ángeles por sus consejos durante la realización y escritura de esta tesis. A la Dra. Lupita por siempre interesarse en mi trabajo y también por los consejos.



Martínez Baltazar Ana Lilia

A Isela, Nayadé, Roxana, Helena, Adriana y Agustín por los momentos compartidos en el laboratorio, cada uno me enseñó algo importante a nivel personal y profesional.

A mis amigas Vero, Lety, Frida, Rashua, Yara y Rosa por ser más que mis amigas, por la confianza, por el amor, por los regaños, por los consejos, por las risas, por todo.

Rashua, nena bela, sabes que te mega adorooooo, jajaja, xoxo GG.

Verito, espero lograr mucho de lo que has hecho con tu vida, me inspiras amiga. TAM!!!.

Lety, hemos vivido de todo juntas, eres la hermana que no tengo de sangre,

Rosa, gracias por todo, sin ti estos años en la universidad hubieran sido geniales en lugar de mega maravillosos.

Frida, aunque casi siempre que te veo me regañas, jajajaja, sin rencores. Te amo amiga, y sabes que cuentas conmigo para lo que sea.

Miguis, el tiempo compartido con usted jajaja, ameno!!

A mi amigos Omar, David, John, Rosa, Vane, Rosa E., por su amistad, los consejos y los momentos de diversión y de preocupación que implica el crecer.

A Lázaro por haber soportado el drama, jajaja, por los buenos y malos ratos, por enseñarme a su muy peculiar manera que la vida es sueño, y los sueños, sueños son. Gracias por estar orgulloso de mí, sabes que el sentimiento es mutuo.

Por último, a mi pequeña Brownie que tuvo que desvelarse conmigo cuando escribí esta tesis que me encantó hacer, y que me permitió aprender mucho más.

Espero algún día no muy lejano retribuirle a mi familia, a mi Facultad, a mi *alma mater*, y a mi país mucho más de lo que me han dado.

Por mi raza hablará el espíritu.

Con mucho amor Ana Lilia

(*in omnia paratus et aude sapere.*)



## Índice

I.	Resumen.....	7
II.	Introducción.....	9
III.	Antecedentes.....	13
	a. Páncreas	
	i. Morfofisiología	
	ii. Células $\beta$ e insulina	
	iii. Acciones fisiológicas de la insulina	
	b. Metabolismo de la Glucosa	
	c. Diabetes Mellitus	
	i. Genética de la Diabetes Mellitus tipo 2	
	ii. Diabetes tipo MODY	
	d. Factores de transcripción	
	i. Factor Nuclear de Hepatocito $4\alpha$	
	ii. Pax 4	
	iii. NeuroD1	
	e. Poblaciones indígenas	
	i. Cora	
	ii. Maya	
IV.	Justificación.....	40
V.	Hipótesis.....	41
VI.	Objetivos.....	42
VII.	Material y Métodos.....	43
VIII.	Resultados.....	52
IX.	Discusión de Resultados.....	71
X.	Conclusiones.....	80
	Apéndice.....	81
	Bibliografía.....	83



## I. Resumen

La diabetes mellitus es un trastorno crónico degenerativo del metabolismo de los carbohidratos, las grasas y las proteínas. Se caracteriza por la deficiencia completa o parcial de la respuesta de secreción de insulina, que se traduce en una alteración del metabolismo de los carbohidratos (glucosa) y en la consiguiente hiperglucemia.

Según la Organización Mundial de la Salud (1999) espera que para 2025 se duplique el número actual de personas con diabetes en el mundo, alcanzando los 366 millones de personas, el mayor incremento ocurrirá en las ciudades que presentarán un incremento en la longevidad y envejecimiento relativo de su población.

En México la población con DM fluctúa entre los 6.5 y los 10 millones. Es una de las principales causas de mortalidad actualmente en nuestro país (13%), convirtiéndola en un grave problema de salud pública.

Los factores genéticos juegan un importante papel en la patogénesis de la diabetes mellitus. La presencia de mutaciones en los factores de transcripción involucrados tanto en el desarrollo pancreático como en la diferenciación celular (células beta) puede conferir una predisposición fuerte al desarrollo de la diabetes mellitus. Entre éstos, se encuentran: el gen *HNF4 $\alpha$*  que codifica para un factor de transcripción que en las células  $\beta$  pancreáticas está involucrado en la regulación del metabolismo de la glucosa, en la expresión y secreción de la insulina. El gen *Pax4* que codifica para un factor de transcripción que es esencial para la generación de las células  $\beta$  y de las células  $\delta$ , se expresa selectivamente durante el desarrollo pancreático y de la espina dorsal. El gen *NeuroD1* que codifica para un factor de transcripción involucrado en el desarrollo celular de los islotes y en la transcripción del gen de la insulina. Mutaciones y polimorfismos en *HNF4 $\alpha$*  y *NeuroD1* así como en otros genes han sido asociadas con una forma de diabetes de aparición temprana (MODY por sus siglas en inglés Maturity Onset Diabetes of the Young).

Recientemente Menjívar y cols. en 2008, encontraron el polimorfismo T130I del gen HNF-4A en diabéticos mestizos mexicanos con una frecuencia del 16%. En un estudio posterior del mismo grupo, se encontró una frecuencia de la T130I de 7% y 11.4% en población Mazahua y Teenek respectivamente. Estas altas frecuencias en los grupos



idnígenas ha permitido pensar en la existencia de un fondo genético diabetogénico indígena mexicano, que contribuye a la aparición de diabetes en población mestiza mexicana.

En este contexto, el objetivo de esta tesis fue investigar la presencia de los polimorfismos T130I del gen *HNF-4 $\alpha$* , R133W del gen *Pax4*, y A45T del gen *NeuroD1* en población maya y cora; estos polimorfismos se eligieron en base a estudios realizados previos por nuestro grupo.

El polimorfismo T130I fue identificado en la población cora y maya en un 28% y 26% respectivamente.

El polimorfismo R133W únicamente se encontró en un 2% de la población cora.

El porcentaje de la población maya portadores de la variante A45T fue del 18%, mientras que el porcentaje en los coras fue del 14%.

De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que los polimorfismos T130I y A45T forman parte del fondo diabetogénico indígena. Que ha sido heredado al mestizo mexicano a través del tiempo. La frecuencia del polimorfismo R133W indica que no forma parte de la genética de estas dos poblaciones indígenas.



## II. Introducción

Funcionalmente, el páncreas puede ser dividido en dos partes: la exocrina que sintetiza enzimas digestivas y las libera en el duodeno, y la endocrina cuya unidad funcional más pequeña es el islote de Langerhans. Dentro del islote se encuentran cuatro tipos celulares: células alfa, beta, delta y PP, que producen las hormonas glucagon, insulina, somatostatina y polipéptido pancreático, respectivamente. Alteraciones del páncreas endocrino pueden afectar seriamente la regulación de los niveles de glucosa en sangre llevadas a cabo por estas hormonas, dando como resultado una enfermedad metabólica como la diabetes [1].

Si la insulina producida por el páncreas no es suficiente, o no puede ejercer su efecto en las células la homeostasis de la glucosa se ve alterada produciendo enfermedades metabólicas. La diabetes mellitus es un desorden metabólico, caracterizado por hiperglucemia, una consecuencia de la alteración del metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas. Esta enfermedad tiene un alto riesgo de presentar complicaciones secundarias como el desarrollo de enfermedades micro y macro vasculares, debido a la deficiencia completa o parcial de la respuesta de secreción o acción de la insulina [2,3].

Los factores genéticos juegan un papel importante en la patogénesis de la diabetes mellitus. La presencia de mutaciones en los factores de transcripción involucrados tanto en el desarrollo pancreático como en la diferenciación celular (células beta) puede conferir una predisposición fuerte al desarrollo de la diabetes mellitus, entre estos factores se encuentran HNF4A, Pax 4 y NeuroD1 [4].

El factor de transcripción codificado por el gen *HNF4 $\alpha$*  en las células  $\beta$  pancreáticas está involucrado en la regulación del metabolismo de la glucosa, así como en la expresión y secreción de la insulina. Diversas mutaciones, han sido encontradas en este gen, entre ellas la T130I (treonina-130-isoleucina), una mutación de sentido equivocado que afecta la región de unión al DNA. [5,6]



Martínez Baltazar Ana Lilia

Por su parte, el gen *Pax4* que codifica para un factor de transcripción esencial para la generación de las células  $\beta$  y de las células  $\delta$ , se expresa selectivamente durante el desarrollo pancreático y de la espina dorsal. Su expresión se inicia en las primeras etapas de la diferenciación celular, posteriormente se restringe a la célula  $\beta$  y persiste así hasta la edad adulta. Mutaciones en este gen han sido relacionadas en el desarrollo de diabetes, una de ellas, la variante R133W (arginina-133-triptofano) resulta de la transición de una C→T, ha sido asociada tanto a Diabetes tipo 1 como 2 en población africana. [4, 7, 8]

Mutaciones en el gen *NeuroD1*, que codifica para un factor de transcripción involucrado en el desarrollo celular de los islotes y en la transcripción del gen de la insulina, han sido asociadas con una forma de MODY encontrada en Islandia. Una variante descrita de este gen es la A45T que consiste en la transición de una G→A en la primera posición del codón 45 en el exón 2, resultando en el cambio de un aminoácido (alanina-45-treonina). [9,10].

De acuerdo a la OMS, se espera que para 2025 se duplique el número actual de personas con diabetes en el mundo, en 1999 se estimaba era de 120 a 140 millones, para el 2003 ya habían 194 millones de personas afectadas. El incremento ocurrirá primordialmente en ciudades de países con incremento en la longevidad de sus pobladores, envejecimiento relativo de su población y estilos de vida basados en sedentarismo, por la virtual desaparición de la actividad física no programada y una alimentación inadecuada, con gran accesibilidad a alimentos de alto contenido calórico, lo que ha dado en la actualidad lugar al incremento de adiposidad corporal con niveles de sobrepeso u obesidad. [14]

En México la población con DM es mayor a los 10 millones, en el 2000 en el país se presentó una prevalencia del 14.2%, siendo una de las principales causas de mortalidad actualmente (13%), convirtiéndola en un grave problema de salud pública, que repercute en gastos catastróficos tanto para los servicios de salud públicos, como para quienes la padecen y no tienen seguros o no están incluidos en un programa de seguridad social. [17]



Martínez Baltazar Ana Lilia

Según la Federación Internacional de la Diabetes, China es el país donde hay más diabéticos mayores de 20 años: alrededor de 39 millones, lo cual representa el 2.7% de la población adulta. La India ocupa el segundo lugar con 30 millones, el 6% de su población adulta [12]. Proporcionalmente, otros países presentan frecuencias mayores que China o la India, pero el aumento de diabéticos en países grandes en vías de industrializarse es particularmente inquietante simplemente por las cifras, de acuerdo a la opinión de los expertos de la federación. En algunos países del Caribe y el Medio Oriente el porcentaje de diabéticos fluctúa entre 12 y 20%. La mayor proporción se observó en Nauru, una isla en el sur del Pacífico [12].

La diabetes tipo 2 ha sido catalogada entonces, como una enfermedad multifactorial, en donde además de los cambios ambientales, se conoce que la genética de las poblaciones influye en la susceptibilidad y frecuencia de la aparición de esta enfermedad en el mundo. Se han realizado amplios estudios observacionales prospectivos, con la finalidad de encontrar genes candidatos que influyan en cada una de las poblaciones en particular, en la aparición de la diabetes tipo 2, y en asociación con factores de riesgo convencionales como obesidad y tolerancia anormal de glucosa. Será muy interesante conocer, si a través de los resultados en conjunto de estos estudios prospectivos, es posible definir si estos genes candidatos son predictores de diabetes tipo 2 y si pueden influenciar la respuesta a la prevención o tratamiento, así, de acuerdo a lo anterior, son necesarios estudios exclusivos de cada población para establecer variantes genéticas de susceptibilidad a diabetes mellitus tipo 2. [62]

En el contexto anterior, recientemente Menjívar y cols., en 2008, reportaron la presencia de la mutación T130I del gen HNF-4A en diabéticos mestizos mexicanos con una frecuencia del 16% y hasta la fecha es la frecuencia más alta reportada en el mundo. En un estudio posterior se encontró una frecuencia de la mutación T130I del gen HNF-4A de 7% y 11.4% en población Mazahua y Teenek respectivamente [15]. Estas frecuencias, son las más altas reportadas actualmente en individuos no diabéticos, lo que permite suponer la existencia de un fondo diabetogénico de los indígenas mexicanos, que contribuye a la



Martínez Baltazar Ana Lilia

aparición de diabetes en población mestiza mexicana, tomando en cuenta que a pesar de que la colonización ocurrió hace siglos, los mexicanos todavía conservamos la herencia genética de las poblaciones nativas locales que se mezclaron con los europeos. [7, 13, 15] Y que la población mexicana es fruto del mestizaje de caucásicos-españoles, indígenas y africanos.

Así, el objetivo de esta tesis fue investigar la presencia de la mutación T130I del gen HNF-4A y de los polimorfismos R133W del gen Pax4, y A45T del gen NeuroD1 en población maya del estado de Campeche y cora del estado de Nayarit.

### III. Antecedentes

#### Páncreas

##### a) Morfofisiología :

El páncreas es un órgano alargado, cónico, localizado transversalmente en la parte dorsal del abdomen, detrás del estómago. El lado derecho del órgano (llamado cabeza del páncreas) es la parte más ancha y se encuentra en la curvatura del duodeno (la primera porción del intestino delgado). La parte cónica izquierda (llamada cuerpo del páncreas) se extiende ligeramente hacia arriba y su final (llamado cola) termina cerca del bazo (Figura 1).

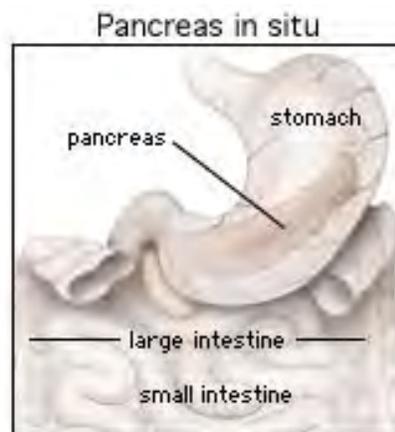


Figura 1. Posición del páncreas en el cuerpo.<sup>[23]</sup>

El páncreas está formado por dos tipos de tejidos:

- El tejido exocrino, el cual secreta enzimas digestivas que ayudan a la degradación de carbohidratos, grasas, proteínas y ácidos en el duodeno. Estas enzimas son transportadas por el conducto pancreático hacia el conducto biliar en forma inactiva. Cuando entran en el duodeno, se vuelven activas. El tejido exocrino también secreta un bicarbonato para neutralizar el ácido del estómago en el duodeno.<sup>[21]</sup>

Martínez Baltazar Ana Lilia

- El tejido endocrino está formado por los islotes de Langerhans que consisten de cuatro diferentes tipos de células: células alfa, beta, delta y PP, las cuales secretan glucagón, insulina, somatostatina y polipéptido pancreático, respectivamente. Los islotes de Langerhans representan aproximadamente del 1%-2% del páncreas. Figura 2. [1]

Estas hormonas son capaces de influir en la secreción de las demás. Así, la somatostatina suprime la secreción de las otras tres. La insulina suprime la secreción de glucagón; mientras el glucagón estimula la secreción de insulina y somatostatina, y cada una de ellas, es capaz de suprimir su secreción de manera autocrina. [22]

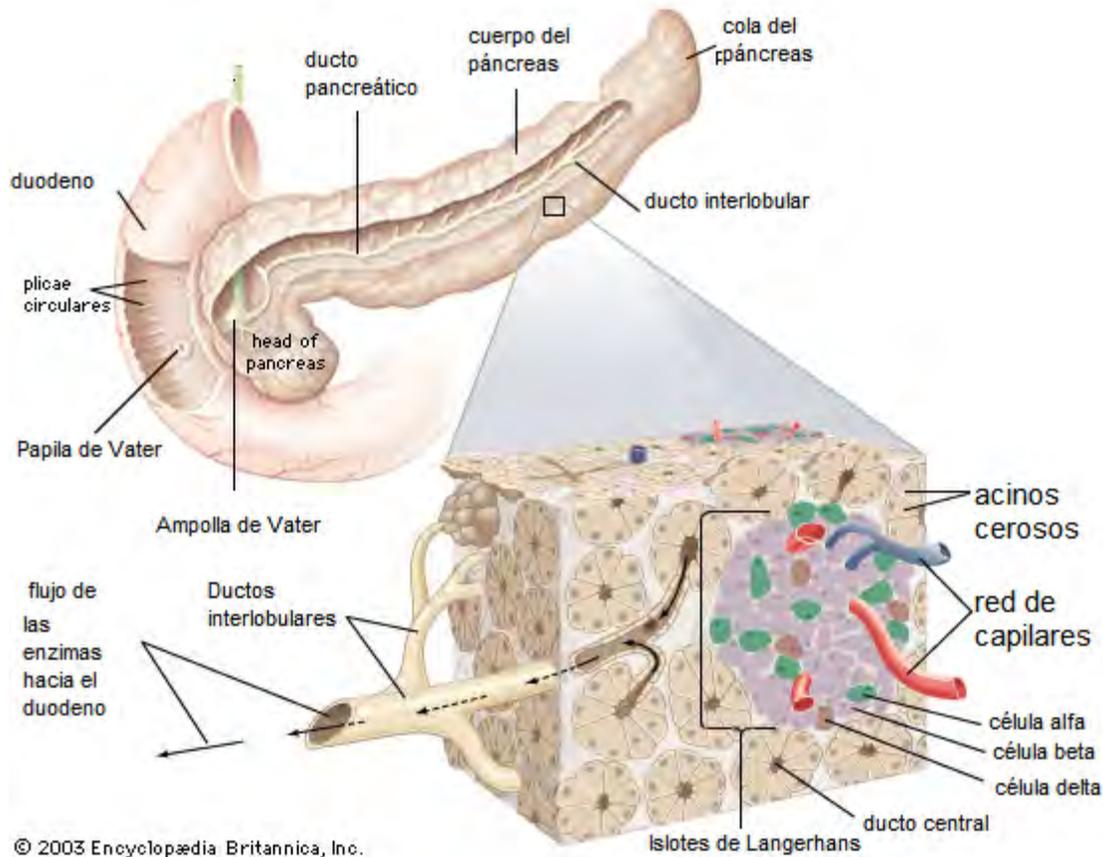


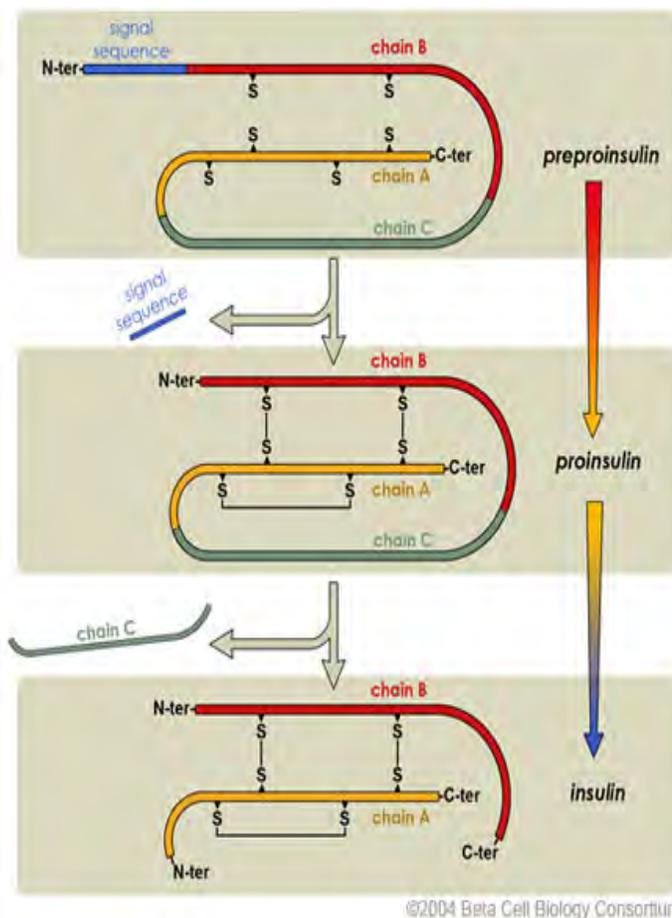
Figura 2. Anatomía e histología del Páncreas.<sup>[23]</sup>

## b) Células $\beta$ e Insulina

La masa neta de células  $\beta$  resulta de la diferencia entre la proliferación y muerte de éstas. La proliferación se lleva a cabo de dos maneras: (1) neogénesis (formación de la célula  $\beta$  a partir del precursor de células pancreáticas ductales) y (2) replicación de células  $\beta$  diferenciadas. Además de determinantes genéticos, la masa de células  $\beta$  es regulada por nutrientes, factores de transcripción, y hormonas [24].

La insulina es una hormona peptídica secretada por las células  $\beta$ , debido a que el gen de la insulina es expresado exclusivamente en células pancreáticas.

El gen de insulina (localizado en el cromosoma 11p15.5, con 3 exones y 2 intrones) codifica



para pre-proinsulina la cual tiene un péptido señal, la cadena B, el péptido C y la cadena A. El péptido señal permite que la pre-proinsulina sea dirigida al retículo endoplásmico para el procesamiento postraduccion. La cadena A y B están unidas por dos puentes disulfuro entre residuos comunes de cisteína. El péptido C es esencial para la formación de estos puentes, y es degradado en el aparato de Golgi dejando unidas las cadenas A y B, las cuales forman la molécula de insulina activa. (Figura 3) [24, 25, 27]

Figura 3. Síntesis de la insulina



### c) Acciones fisiológicas de la insulina.

La insulina tiene diversas funciones de gran importancia en el crecimiento y metabolismo. Además, es uno de los pocos factores de crecimiento que la célula requiere por excelencia para su supervivencia, proliferación y diferenciación.

La función principal de la insulina es mantener la homeostasis de la glucosa en suero; también forma parte importante del metabolismo de lípidos y proteínas. La liberación de la insulina en la circulación sanguínea, principalmente es en respuesta a niveles elevados de glucosa, es esencial para controlar el metabolismo de los carbohidratos en los tejidos periféricos [24, 25]. Sus células blanco son los hepatocitos, músculo esquelético y cardíaco, adipocitos y fibroblastos [26]. La insulina estimula la absorción, utilización, y almacenamiento de la glucosa en varios tejidos. La glucosa no puede difundirse pasivamente a la célula; la única manera para que una célula absorba la glucosa es a través de la difusión facilitada mediante los transportadores de las hexosas (GLUTs). Hay cuatro tipos de GLUT: GLUT1 que está en la mayoría de los tejidos; GLUT 2 en células  $\beta$ , en hígado, y en las células  $\beta$  es importante para la regulación de la secreción de la insulina; GLUT3 en cerebro; GLUT4 en músculo esquelético, corazón, y tejido adiposo. El cerebro e hígado no requieren de la insulina para absorber la glucosa porque estos órganos tienen un transportador independiente de insulina. La insulina promueve la síntesis de lípidos e inhibe la degradación de lípidos. La insulina inhibe la degradación de los triglicéridos en tejido adiposo mediante la inhibición de la lipasa intracelular que hidroliza triglicéridos. La insulina estimula la toma intracelular de aminoácidos y promueve la síntesis de proteínas. Además, incrementa la permeabilidad en muchas células de los iones de potasio, magnesio y fosfato [24].

## Metabolismo de la Glucosa

La función principal del metabolismo de los carbohidratos es el de servir como combustible y oxidarse para proveer de energía para otros procesos metabólicos. Los intermediarios metabólicos son usados para varias reacciones biosintéticas.

Cuando las necesidades energéticas inmediatas están cubiertas, el organismo almacena el potencial energético aportado por la oxidación de la glucosa.



En ayuno, cuando la concentración de glucosa en plasma desciende por debajo de unos 3 mmol/L debe suministrarse glucosa al torrente circulatorio, ya que de lo contrario el cerebro no tiene fuente de glucosa suficiente [27, 28].

Los mecanismos relacionados con el metabolismo de los carbohidratos están regulados por hormonas que tienen distintas funciones, a veces antagónicas, y cuya secreción depende de las condiciones biológicas de cada momento.

El péptido insulínico dependiente de glucosa, producido por las células de la mucosa del duodeno y yeyuno superior, estimula la secreción de insulina por el páncreas. Su concentración en plasma aumenta después de las comidas ricas en carbohidratos o grasas. La glucosa, aminoácidos (arginina y leucina), cetoácidos y ácidos grasos constituyen los estímulos primarios para la secreción de la insulina. Al metabolizarse, incrementan la concentración de ATP, inhiben los canales de potasio ATP sensibles y favorecen el influjo de calcio al citosol, al abrir sus canales electrosensibles. El calcio se une a una proteína - la calmodulina - la que interactúa con otras proteínas como la protein-quinasa C, que a su vez activa el citoesqueleto promoviendo la síntesis de miosina para formar los cilios contráctiles. Los agentes potenciadores como el glucagón, el glucagon like peptide-1 (GLP-1), secretina, pancreozimina, el péptido inhibidor gástrico (GIP) y la acetilcolina, estimulan la adenilciclase y así incrementan la concentración de AMP cíclico que a su vez activa proteincinasas AMP dependientes. [22, 28]

Cuando la concentración de glucosa en plasma es elevada, la insulina promueve la captación de glucosa por parte del hígado mediante la estimulación de la síntesis de glucocinasa, que es la enzima que fosforila la glucosa dentro del hepatocito, a diferencia del resto de las células en las que la hexocinasa efectúa dicha función. La diferencia entre estas dos enzimas es que la glucocinasa tiene menos afinidad por la glucosa, por lo que el proceso dependerá en gran medida de la cantidad de enzima disponible.

La insulina favorece la glucólisis y la síntesis de glucógeno, lo que produce una potenciación de la ruta metabólica de la glucosa hacia su oxidación o bien su almacenamiento. Así, cuando en el período postprandial las necesidades inmediatas de energía están cubiertas, se promueve la acumulación de glucógeno, que es una reserva útil durante los períodos de ayuno. [28]



La insulina inhibe la gluconeogénesis hepática cuando la concentración de glucosa en plasma es elevada después de la ingesta de alimentos; esto impide un mayor aumento de dicha concentración.

En el tejido adiposo favorece la conversión de la acetil-CoA derivada del piruvato en ácidos grasos, que pasarán a formar parte de los triglicéridos. Asimismo inhibe la lipólisis mediante una disminución de la actividad de la triacilglicerol-lipasa.

Cuando los niveles de insulina son bajos, el glucagón aumenta la producción hepática de glucosa y su liberación a la circulación mediante la inducción de la gluconeogénesis y la glucogenólisis.[28]

Las enterohormonas llamadas “incretinas” entre las que destaca el GLP-1 y el GIP secretados en las células L del ileon y K del yeyuno respectivamente, luego de la ingestión de alimentos, estimulan la secreción de insulina mediada por los niveles de la glicemia. Así las incretinas son importantes reguladores de la hiperglucemia postprandial.

La interregulación entre glucosa e insulina es capaz de mantener los niveles de glucemia en un estrecho margen fisiológico. La célula beta tiene la sensibilidad de percibir pequeños cambios de la glicemia, 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 glicemia, en minutos aumenta la sensibilidad y en semanas se adapta incrementando la masa celular.

La acción biológica de la insulina se realiza a través de su interacción con receptores específicos. Se componen de 2 unidades alfa, responsables del reconocimiento de la de insulina y de 2 unidades beta, de ubicación al interior de la membrana, con la función de transmitir el mensaje a los efectores intracelulares. Los receptores son degradados y resintetizados continuamente. (Figura 4) [24,29].

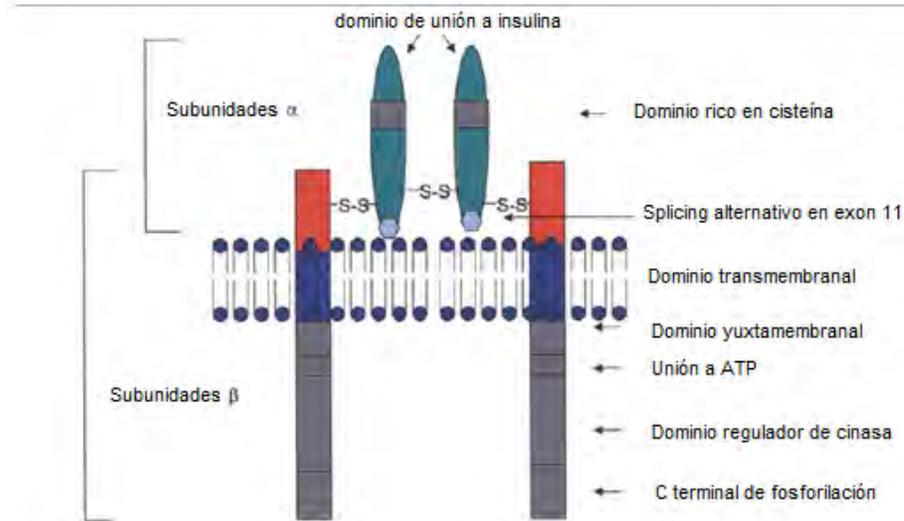


Figura 4. Receptor de insulina

Imagen modificada de Endocrinology: Basic and Clinical Principles [24].

La unión de la insulina al receptor genera la autofosforilación de las unidades beta en posiciones de residuos de tirosina, por lo menos en cinco posiciones [85], estos residuos en estructura primaria se encuentran en las posiciones: 1158, 1162, 1163, 1328, 1334, 965, 972 y 984 [85]. La autofosforilación activa una cadena factores de transcripción y proteincinasas que estimulan o inhiben la transcripción genética y la acción de enzimas involucradas en el metabolismo de sustratos, inducen translocación de proteínas, aumentan la síntesis de proteínas y el transporte de glucosa, de aminoácidos y de iones. [29]

## Diabetes Mellitus

La diabetes mellitus es una enfermedad crónico-degenerativa que se caracteriza por hiperglucemias en ayuno, y postprandiales, resultado de una deficiencia en la síntesis, secreción y/o acción de la insulina. Sin embargo, el desarrollo de esta enfermedad tiene la influencia de diferentes factores como: mala alimentación, obesidad, sedentarismo, estrés, y el factor genético.

La diabetes tipo 2 afecta aproximadamente al 5% de la población mundial con prevalencia variada entre grupos étnicos y regiones geográficas. Dos tipos de diabetes, el tipo 1 y el tipo 2, representan aproximadamente el 10 y 90%, respectivamente. [34]



Martínez Baltazar Ana Lilia

En México la diabetes tipo 2 representa uno de los más graves problemas de salud que enfrenta el país en los últimos años de acuerdo a la ENEC (Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas) y a la ENSA (Encuesta Nacional de Salud), la diabetes se ha incrementado en forma alarmante teniendo una prevalencia del 13%, de este porcentaje el 50% aproximadamente de los casos son diagnosticados a edades tempranas. [7]

La prevalencia de la diabetes ha aumentado en las últimas décadas a una velocidad alarmante a nivel mundial. Entre el año 2000 y el 2010, en la prevalencia de la diabetes tipo 2 se ha proyectado un incremento del 47% (unos 215 millones con este padecimiento) a nivel mundial. Y el número de individuos con diabetes para el año 2030 será de 366 millones.

El fenotipo de la enfermedad es heterogéneo y puede ser dividido en diferentes subtipos de acuerdo a su genética subyacente, y la causa patofisiológica. Formas de diabetes debidas a mutaciones en genes únicos son raras (2-5% de los casos de diabetes), tienen alta penetrancia, y tienen muy poca influencia de factores ambientales.

En contraste, las formas más comunes de diabetes, son enfermedades con grandes influencias genéticas, pero no con un patrón claro de herencia. Los fenotipos de la enfermedad son el resultado de la interacción de diversas variantes de genes, cada uno mostrando un efecto modesto, y el ambiente. [30, 31]

- **Clasificación de la Diabetes Mellitus**

Clasificación de acuerdo al Comité de Expertos de la ADA y de la OMS (1997), de acuerdo a la causa de la enfermedad [32]:

### **I Diabetes Mellitus tipo 1**

- Diabetes mediada por procesos inmunes, destrucción autoinmune de las células  $\beta$  pancreática.
- Diabetes idiopática, no es conocida su etiología.

### **II Diabetes Mellitus tipo 2**

- Resistencia a la acción de la insulina, una respuesta insuficiente de la secreción de la insulina.

### **III Otros tipos específicos de Diabetes**



A. Defectos genéticos de la función de la célula beta. [Antes conocidas como MODY (Maturity-Onset Diabetes of the Young)].

Son hereditarias, con un modelo de herencia autosómica dominante

- B. Defectos Genéticos en la acción de la insulina.
- C. Enfermedades del páncreas exocrino.
- D. Endocrinopatías.
- E. Drogas.
- F. Infecciones.
- G. Formas no comunes de diabetes mediada por fenómenos inmunes.
- H. Otros síndromes genéticos asociados a veces con diabetes.

#### **IV Diabetes Gestacional**

Aquella que comienza o se diagnostica por vez primera en el embarazo.

#### **V Alteración del metabolismo de la glucosa o Alteración de la Homeostasis de la Glucosa**

- Glucemia basal alterada (IFG: Impaired Fasting Glucosa)
- Tolerancia Alterada a la Glucosa (TAG o IGT: Impaired Glucosa Tolerante)

A pesar de que la diabetes tipo 1 y 2 comparten un fenotipo común, que es hiperglucemias en ayunas y en estado postprandial, su etiología es distinta.

La diabetes tipo 1 se caracteriza por una deficiencia de células  $\beta$  pancreáticas resultando en una deficiencia de insulina. La deficiencia en células  $\beta$  es la consecuencia de una destrucción autoinmune hacia éstas. La diabetes tipo 2, por su parte, es caracterizada por la deficiencia en la acción de la insulina, debido a la combinación de una resistencia a la insulina, falla en la síntesis y/o secreción de la esta hormona. [34]

Los mecanismos, etiología, epidemiología, y genética de la diabetes tipo 2 han sido objetivo de muchos estudios. El diagnóstico clave de este desorden es una medición mayor de 126 mg/dL de glucosa en sangre en ayunas en por lo menos dos ocasiones o medición al azar mayor de 200 mg/dL con síntomas de poliuria y polidipsia. El intervalo normal es de 70 a 100 mg/dL. Una clasificación más detallada de los pacientes con niveles de glucosa alterados se lleva a cabo con una prueba de tolerancia a la glucosa. En donde el paciente consume una bebida alta en glucosa (75 g de glucosa) en ayunas.



Además de los altos niveles de glucosa en sangre y de la respuesta a la prueba de tolerancia a la glucosa, los individuos pueden ser obesos, hipertensos, tener dislipidemias, resistencia a la insulina y/o hiperinsulinemia.

Durante el curso de la enfermedad, muchos pero no todos de los pacientes desarrollan otros padecimientos incluyendo retinopatía, nefropatía, neuropatías y enfermedades cardiovasculares. [35]

### a) Genética de la Diabetes mellitus tipo 2

La DM es un desorden heterogéneo que se desarrolla en respuesta a factores genéticos y ambientales. Las personas con DM tipo 2 pasan a través de una serie de fases antes de que presenten la diabetes. Al principio, los niveles de insulina se incrementan como consecuencia a la resistencia que se genera, pero la euglucemia se mantiene a pesar de la persistente hiperinsulinemia. Finalmente, la secreción de insulina declina en presencia de la resistencia a la insulina, que resulta en diabetes. La obesidad, mediante su efecto sobre la sensibilidad de insulina, también contribuye al desarrollo de la DM tipo 2. [33]

La diabetes tipo 2 es una enfermedad poligénica, lo que implica, que para que aparezca la enfermedad se necesita de la presencia simultánea de un grupo de genes que afecten los procesos involucrados en la síntesis, secreción y resistencia a la insulina. Sin embargo, los grupos de genes que confieren susceptibilidad varían entre poblaciones. Se debe tener presente que hay factores ambientales que contribuyen a que se desarrolle o no la enfermedad, es decir, puede ser que la susceptibilidad otorgada por genes (mutaciones o polimorfismos) esté presente en individuos sanos debido a la falta de otro grupo de genes o a la ausencia de factores ambientales. [34]

### b) Diabetes tipo MODY

La diabetes de aparición temprana, MODY por sus siglas en inglés (Maturity Onset Diabetes of the Young), es un subtipo de diabetes que es monogénica y provee un modelo para el estudio de la genética molecular de la diabetes tipo 2. La diabetes MODY es caracterizada por una aparición a edad temprana y una herencia del tipo autosómica dominante que es demostrada con la presencia de la diabetes en la familia en tres



generaciones sucesivas. La aparición ocurre entre edades de 9 y 13 años, aunque no siempre, ocurre antes de los 25 años [33, 34, 37].

La caracterización de pacientes MODY ha revelado diferencias fenotípicas entre ellos sugiriendo una heterogeneidad, la cual ha sido demostrada mediante análisis genéticos moleculares. Se han caracterizado 6 variantes de MODY que se muestran en la siguiente tabla [34].

Tabla No.1 <sup>[34,37]</sup> **Genes MODY**

Condición	Gen	Localización cromosomal	Función	Características
MODY 1	<i>HNF4<math>\alpha</math></i>	20q12-q13.1	Factor de transcripción	Alteración de la síntesis y secreción de la insulina.
MODY 2	<i>Glucocinasa</i>	7p15.3-15.1	Sensor de la glucosa, glucólisis	Alteración en la secreción de la insulina
MODY 3	<i>HNF1<math>\alpha</math></i>	12q24.3	Factor de transcripción	Alteración de la síntesis y secreción de la insulina.
MODY 4	<i>IPF</i>	13q12.1	Factor de transcripción	Alteración de la síntesis y secreción de la insulina. La mutación homocigota retrasa el desarrollo del páncreas.
MODY 5	<i>HNF1<math>\beta</math></i>	17cenq21.3	Factor de transcripción	Alteración de la síntesis y secreción de la insulina.
MODY 6	<i>NeuroD1</i>	2q32	Factor de transcripción	Alteración de la síntesis y secreción de la insulina.

## Factores de Transcripción

Se estima que el genoma humano contiene cerca de 30 000 genes. Estos son objeto de grupos complejos de regulación. En las células eucariontes se expresa casi el 15% de sus



genes, el resto permanece inactivo. El grupo de genes expresados pueden ir variando a lo largo de la vida celular [36].

Las células eucariontes regulan la expresión de la mayoría de sus genes mediante la velocidad a la cual son transcritos por el RNAm. La regulación de la expresión de genes se realiza mediante interacciones de genes promotores y proteínas que se unen al DNA llamadas factores de transcripción, los cuales pueden aumentar o disminuir la velocidad de transcripción [36].

Los factores de transcripción tienen una estructura modular compuesta de dominios discretos con funciones específicas. Tres tipos de dominio son los que se presentan generalmente [36]:

1. Dominio de unión a DNA
2. Dominio de dimerización
3. Dominio de transactivación

Los dominios de unión a DNA posee estructuras características llamados motivos que los identifican [36]:

- I. Hélice-giro-hélice (*Helix-turn-helix*): este motivo está compuesto de dos hélices alfa separados por un giro beta. Una de las hélices, llamada hélice de reconocimiento, se une al DNA haciendo contacto con la ranura mayor de la doble hélice. Un ejemplo de proteínas que tienen este motivo es la familia de factores de transcripción de tipo homeodominio codificada por los altamente conservados genes homeobox que juegan un papel importante en el desarrollo embrionario. (Figura 5<sup>[38]</sup>).
- II. Dedos de zinc: esta motivo de unión a DNA se presenta de dos maneras, una llamada C2H2 y C4. La forma C2H2 tiene un bucle de 12 aminoácidos anclados en la base por 2 cisteínas y 2 histidinas que tetraédricamente coordinan al ion de zinc. El motivo forma una estructura compacta compuesta de dos láminas beta y una hélice alfa que contiene aminoácidos básicos que interactúan con el DNA por medio del surco mayor de la doble hélice. El motivo C4 tiene una estructura similar pero tiene cuatro cisteínas coordinando con el zinc. Un ejemplo de cada uno es el factor de transcripción Sp1, y en los factores de transcripción del tipo esteroideo. (Figura 6<sup>[38]</sup>).

- III. Dominios básicos: este motivo de unión a DNA es usualmente encontrado en asociación con uno o dos dominios de dimerización llamados cremallera de leucina o hélice-bucle-hélice. La unión al DNA requiere de la presencia de dos dominios básicos los cuáles son llevados juntos por dimerización.

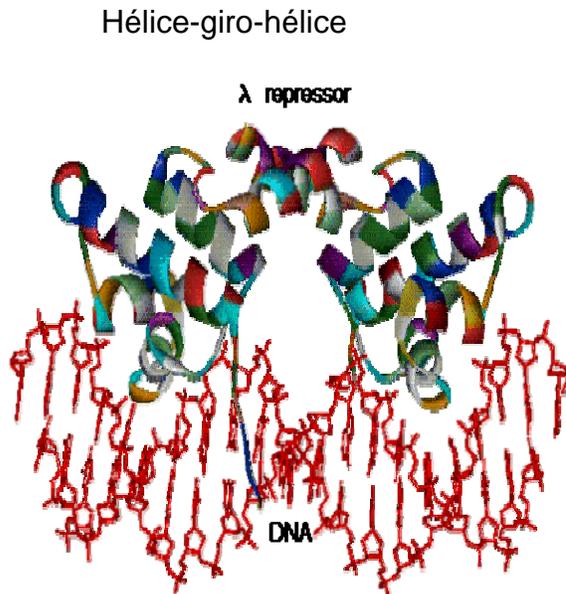


Figura 5. Motivo

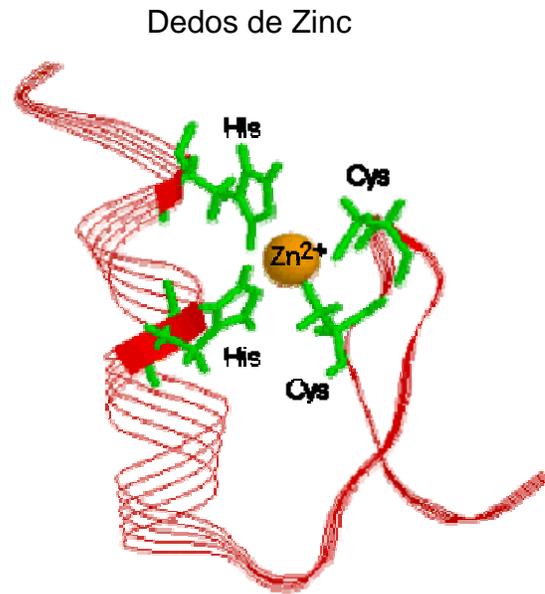


Figura 6. Motivo

Los dominios de dimerización se encuentran en dos formas.[36]

- I. La cremallera de leucina: este motivo está presente del lado C-terminal del dominio de unión a DNA. Tiene una hélice alfa en la cual cada 7 aminoácidos hay una leucina. La dimerización es lograda por la interacción entre las partes hidrofóbicas creadas debido a las leucinas.( Figura 7<sup>[38]</sup>).
- II. Hélice-bucle-hélice (*Helix-loop-helix*): este dominio contiene dos hélices alfa separadas por un bucle. La dimerización se lleva a cabo por la interacción entre aminoácidos hidrofóbicos presentes del lado del C-terminal de la hélice. La dimerización puede ocurrir no solo con dos moléculas del mismo factor de transcripción, sino también entre diferentes factores de transcripción con el mismo dominio de dimerización.(Figura 8<sup>[38]</sup>).

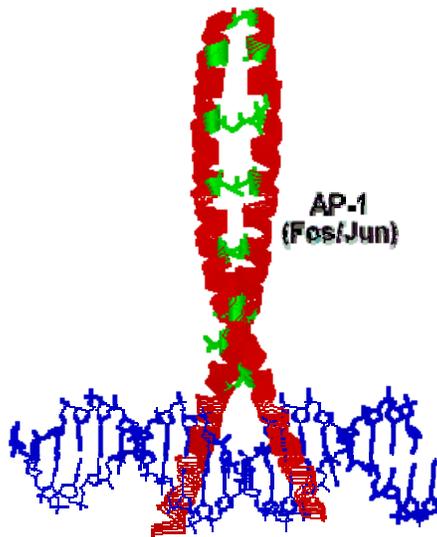


Figura 7. Motivo  
Cremallera de Leucina

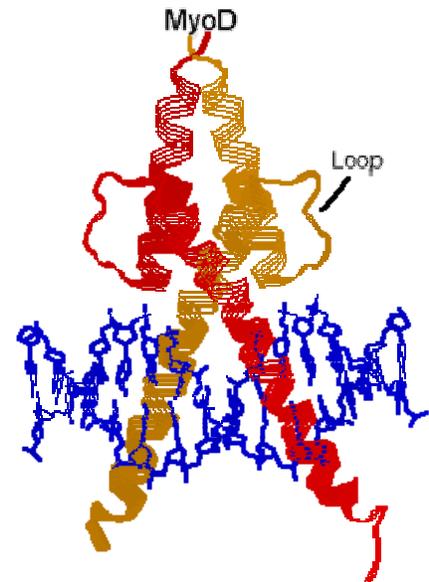


Figura 8. Motivo  
Hélice-bucle-hélice

Los factores de transcripción proveen las instrucciones genéticas que dirigen el desarrollo pancreático y permiten que las células  $\beta$  maduras funcionen adecuadamente. [39]

La célula  $\beta$  es la responsable de la transcripción del gen de la insulina, de su subsecuente procesamiento y de su secreción en respuesta a elevaciones en la concentración de glucosa en sangre. [40]

## Factor Nuclear de Hepatocito $4\alpha$

Los factores nucleares de hepatocito (HNFs) son factores de transcripción originalmente identificados en el hígado, sin embargo también es expresado en los islotes pancreáticos, riñones e intestino delgado, son esenciales para la expresión de varios genes durante el desarrollo embrionario y en la vida adulta. HNF- $4\alpha$  es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares esteroide/tiroideos. [6, 41]



HNF-4 $\alpha$  juega un papel importante en el desarrollo, diferenciación celular, y metabolismo del páncreas endocrino ya que forma parte de la regulación de transcripción de la insulina, y de su secreción de células  $\beta$  pancreáticas, está involucrado en la diferenciación hepática, y en la expresión de genes que regulan el transporte de glucosa (GLUT-2), glucólisis (aldolasa B), es esencial para el funcionamiento normal del intestino, hígado y riñón. [41, 44]

Mutaciones encontradas en el gen *HNF-4 $\alpha$*  en regiones codificadoras y no codificadoras, llevan al desarrollo de diabetes tipo MODY 1. Además, variantes polimórficas han sido asociadas a la diabetes tipo 2. [42]

Ratones deficientes en HNF-4 $\alpha$  muestran un fenotipo complejo incluyendo diferenciación hepática alterada, la cual es letal en etapas tempranas del desarrollo embrionario. Cuando la actividad de HNF-4 $\alpha$  es recuperada parcialmente en el embrión, el hígado falla en expresar una variedad de genes incluyendo los que codifican proteínas metabólicas, apolipoproteínas, y factores séricos. [41].

Al ser HNF-4 $\alpha$  un receptor nuclear, posee la misma estructura modular que todos los miembros de esa familia, consta de seis distintas regiones (referidas como regiones A-F), que corresponden a dominios funcionales. Contiene un dominio de unión a DNA con motivo tipo dedos de zinc y une al DNA como homodímero. También contiene dos dominios de transactivación: AF-1 en el extremo N-terminal, el dominio es una hélice alfa anfipática que abarca los primeros 23 aminoácidos; y AF-2, un dominio transactivador bastante complejo que abarca los aminoácidos 128-136, los cuales también incluyen la intercara de dimerización y los dominios de unión a ligando. [41,43]

El gen *HNF-4 $\alpha$*  se encuentra en el cromosoma 20q12-q13.1, consta de 13 exones, y ha sido asociado con DM tipo 2 en varias poblaciones. La transcripción del gen es iniciada por dos promotores diferentes, el proximal P1 y el distal P2, localizados 46kb aparte, que dirigen la expresión de *HNF-4 $\alpha$*  principalmente en hígado y células  $\beta$ , respectivamente [5].

Diversas variantes de la proteína HNF-4 $\alpha$  surgen de los RNAm transcritos por los dos promotores. Las variantes de HNF-4 $\alpha$ 7- $\alpha$ 9 aparecen primero en el endodermo visceral, seguidos subsecuentemente por las variantes de P1 HNF-4 $\alpha$ 1- $\alpha$ 3. En adultos, HNF-4 $\alpha$ 7- $\alpha$ 9 son más abundantes en páncreas y HNF-4 $\alpha$ 1- $\alpha$ 3 son más abundantes en hígado. Las

Martínez Baltazar Ana Lilia

diferencias en actividad entre las variantes han sido atribuidas a la estructura de su dominio funcional variante- específico y a interacciones con reguladores transcripcionales. [42]

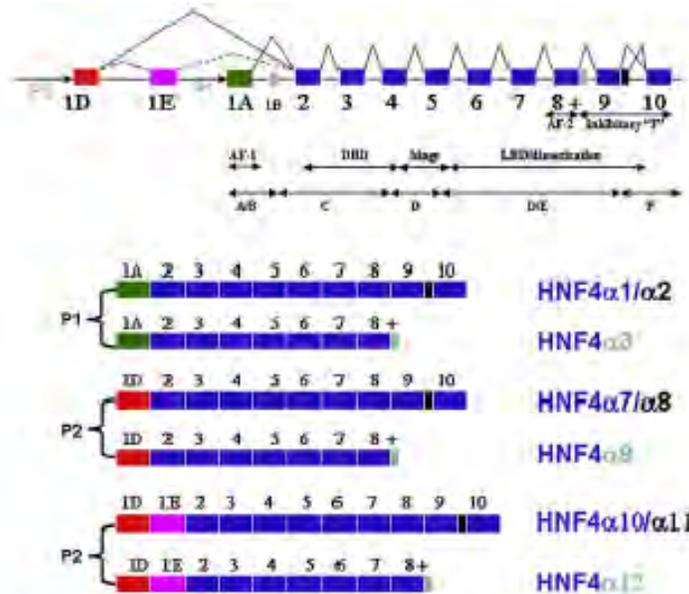


Figura 9<sup>[42]</sup>. Estructura del gen *HNF-4α* y las variantes del RNAm

En la figura 9 se observa la estructura del gen de *HNF-4α*, posee dos promotores, el proximal P1 y el distal P2. La transcripción por P1 empieza en el exón 1A y la transcripción por P2 empieza en el exón 1D y se salta el exón 1A. [42].

Silander y colaboradores investigaron la susceptibilidad de variantes en 20q13 a la diabetes genotipificando los polimorfismos de nucleótido simple (SNP), de 291 SNP's tipificados en una región de 7.5 Mb, diez SNPs asociados con estado de enfermedad fueron identificado en un área de 64-kb que cubre a los promotores P1 y P2, y a los exones 1-3 de *HNF-4α*. [45].

*HNF-4α* interactúa con elementos reguladores en los promotores y *enhancers* de los genes cuyos productos están involucrados en el metabolismo de colesterol, ácidos grasos, aminoácidos, y glucosa. Los sujetos portadores de mutaciones en *HNF-4α* tienen una reducción significativa en suero de apo(AII), apo(CIII), lipoproteína(a) y triglicéridos [46].

Una de las variantes reportadas para el gen *HNF-4α* es la llamada T130I, que fue descrita por Yamagata y colaboradores en 1996, es el cambio de una treonina por una isoleucina, esta variante está localizada en el dominio D, afectando en la caja A que es



importante en la homodimerización y está involucrada en la afinidad para la unión al DNA [5, 6].

Un residuo de treonina en la posición 130 es conservada en humanos, ratón, rata y *Xenopus*.

El polimorfismo T130I es una mutación sin sentido, localizada en el exón 4, resultado del cambio del triplete ACT por el triplete ATT, que codifican para el aminoácido treonina e isoleucina respectivamente, y puede ser encontrada en la población general (0-5%), por lo que esta variación por sí misma no causa diabetes tipo MODY [6], esta mutación afecta la actividad de transactivación en las células hepáticas, el mecanismo aún no es claro, una posible respuesta es la modificación post-traducciona que sólo ocurre en esas células [6].

Menjívar y cols., encontraron la mutación T130I del gen *HNF-4 $\alpha$*  en diabéticos mestizos con una frecuencia del 16%. En un estudio posterior se encontró una frecuencia de la mutación T130I del 7% y 11.4% en población Mazahua y Teenek respectivamente. Estas frecuencias, son las más altas reportadas actualmente en individuos no diabéticos: japoneses 0.8%, daneses 6% y mestizos mexicanos 5.3%, lo que permite suponer la existencia de susceptibilidad de los indígenas mexicanos, que contribuye a la aparición de diabetes en población mestiza mexicana [15].

Durante la embriogénesis, la formación del páncreas y su subsecuente diferenciación en varios tipos de células endocrinas y exocrinas es controlada por la activación y extinción de un gran número de genes. La expresión de estos genes es regulada por una cascada de factores de transcripción altamente organizada. Algunos de estos factores de transcripción, como Foxa2, PDX1 y Ptf1a están involucrados en la formación de los brotes pancreáticos que dan lugar a todos los tipos de células pancreáticas derivadas del epitelio. Posteriormente, un factor de transcripción que posee un dominio básico hélice-asa-hélice (bHLH), Neurogenina3 inicia el programa de diferenciación endocrina en células seleccionadas. Después de su expresión, Neuro D1 sustituye a Neurogenina2 como un factor de transcripción del tipo bHLH. La completa diferenciación de las células endocrinas requiere de factores adicionales. Uno de esos factores es el factor de transcripción de homeodominio pareado, Pax4. [47]



## **PAX4**

Pax4 es únicamente expresado trascendentalmente durante el proceso de la diferenciación pancreática de las células  $\beta$  y  $\delta$ . La expresión de *PAX4* en células madres embrionarias acelera su diferenciación en células  $\beta$  pancreáticas. Una mutación de sentido equivocado en *PAX4* (R129W) la cual causa una proliferación reducida en células  $\beta$  fue reportada en población japonesa con deficiencia de insulina y aparición temprana de diabetes. Además, otra mutación en *PAX4* (R133W) de sentido equivocado, ha sido recientemente descrita en población del este de África. [47]. La variante R133W (arginina-133-triptofano) resulta de la transición de una C→T, y está localizada en el exón 3. [4, 7, 8]. Los genes de caja pareada (paired box) codifican para factores de transcripción que se caracterizan por la presencia de un dominio pareado (paired domain), un motivo con secuencia altamente conservada de 128 aminoácidos que posee una actividad de unión a DNA. Pax 4 también posee un homeodominio, además su expresión está restringida al sistema nervioso central y al páncreas en desarrollo. Una característica de los genes *PAX* es que están localizados en cromosomas diferentes, en el caso de *PAX4* se encuentra en el cromosoma 7q32. [48, 49]

Smith y colaboradores identificaron un sitio consenso de unión al DNA para Pax4 y mostraron que la proteína puede unirse a varias secuencias de la insulina I de rata, somatostatina, y a promotores de glucagón. El mismo grupo encontró que Pax4 puede actuar como un represor transcripcional, y la mayor parte de esa actividad represora la realiza a través de la porción homeodominio y el extremo carboxilo de la molécula [71].

La mutación R133W está localizada entre el *paired domain* y el homeodominio. (Figura 10). De acuerdo a estudios por Mauvais-Jarvis y colaboradores esta variante ocasiona alteraciones funcionales *in vitro*. Además, ensayos con luciferasa muestran que la variante R133W ocasiona una reducción de la mitad de las funciones de PAX4 como represor transcripcional. Sorprendentemente, esta variante no afecta la afinidad medida de la unión de DNA *in vitro*. Como esta variante no se encuentra dentro del dominio represor de PAX4, la represión transcripcional disminuida observada puede resultar, no de la disminución de la afinidad a unión de DNA, sino probablemente por la alteración en la especificidad de unión,

por la alteración con la interacción con otras proteínas o de una disminución en la estabilidad funcional *in vivo*. [50].

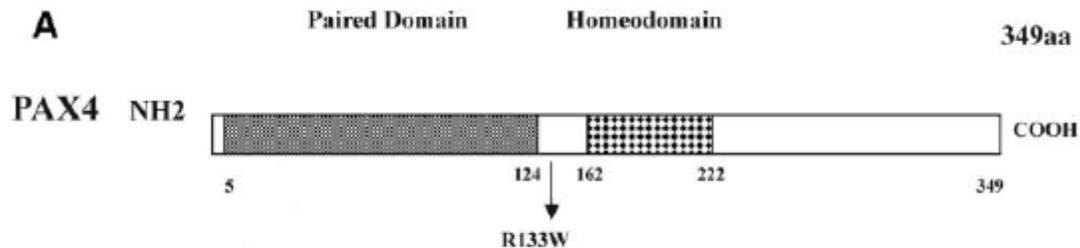


Figura 10.<sup>[50]</sup> Estructura de la molécula PAX 4 y localización de la variante R133W.

Mientras el final de la gestación se aproxima y todas las células endocrinas comienzan a organizarse en islotes de Langerhans la expresión de *PAX4* comienza a decrecer, finalmente en el páncreas adulto la expresión del gen ya no es detectable.[48].

## **NeuroD1**

Las proteínas *basic helix-loop-helix (bHLH)* son factores de transcripción involucradas en la determinación del tipo celular y diferenciación durante el desarrollo celular. Las proteínas bHLH pueden ser clasificadas en tres clases basándose en sus patrones de expresión, actividades y estructuras predichas de acuerdo en su secuencia peptídica. Los miembros de la clase A, proteína ubicua bHLH, incluye genes que son expresados en muchos tejidos. Los miembros de la clase B, heterodimerizan con miembros de la clase A y se unen a cajas E con alta afinidad. Los miembros de la clase C, reguladores negativos, dimerizan exclusivamente con ellos mismos y no pueden hacerlo con proteínas de la clase A ni B. [51]

Como ya se menciono, seis genes han sido asociados con el desarrollo de diabetes tipo MODY. Uno de esos genes codifica para NeuroD1, un factor de transcripción miembro de la familia *basic helix-loop-helix* bHLH, y de la clase B, es un regulador importante de transcripción del gen de la insulina en la célula  $\beta$  pancreática, mediante la formación de un

heterodímero con la proteína E47, y su unión a la caja E (CANNTG), que se encuentra en la región promotora del gen de insulina. [52,53]

*NeuroD1* es expresado en páncreas, intestino y cerebro. Y se localiza en el cromosoma 2q31-35. [51]

Diversas mutaciones en *NeuroD1* tienen como resultado defectos en la secreción de insulina. Una variante descrita de este gen es la A45T que consiste en la transición de una G→A en la primera posición del codón 45 en el exón 2, resultando en la sustitución de un aminoácido (alanina-45-treonina) en el lado amino terminal de la proteína. (Figura 11) [9,10, 54]

Esta variante no fue asociada al desarrollo de DM tipo 2 en población caucásica, sin embargo varios reportes sugieren que puede contribuir al desarrollo de DM tipo 2 en población del sur de India y a la alteración en la secreción de insulina en población japonesa. Cabe mencionar, que dos estudios uno en población japonesa y otro en caucásica, asocia esta variante con la DM tipo 1. [52]

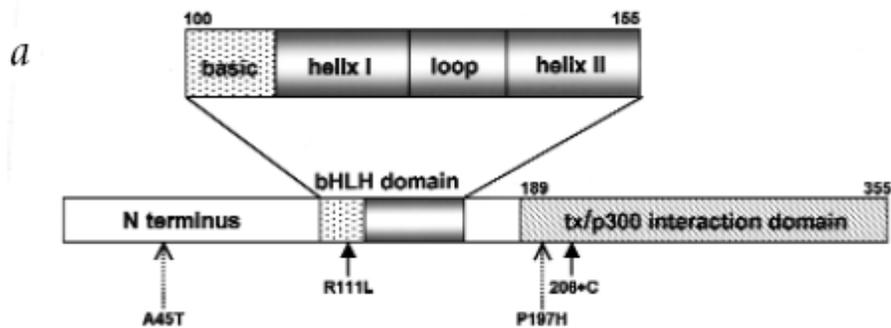


Figura 11<sup>[54]</sup>. Estructura de *NeuroD1* y mutaciones encontradas.

Naya y colaboradores reportaron que ratones deficientes en *NeuroD1* desarrollaron diabetes y murieron por una severa reducción en el número de células productoras de insulina. Este resultado muestra que el gen de *NeuroD1* es requerido para la homeostasis de glucosa y que juega un papel esencial en la morfogénesis y diferenciación de las células  $\beta$  pancreáticas. Existe la posibilidad de que la variante A45T esté implicada en la pérdida de células  $\beta$ , lo que permite el desarrollo de DM tipo 1 como consecuencia de una extensiva destrucción de estas células. [55]



## Poblaciones indígenas

Ser indígena, significa ser una persona cuyas costumbres, creencias y visión particular de la colectividad conjuntan el pasado prehispánico y el presente; su coincidencia, punto de identidad y referencia lo constituye su lengua, factor que sirve como base para cuantificar a la población indígena.

Actualmente se reconocen alrededor de 62 pueblos indígenas, los cuales se agrupan en torno a unidades territoriales delimitadas y jerarquizados conforme al orden y organización que, de manera interna deciden y comparten sus moradores para lograr objetivos comunes, entre los que destacan los de preservar y reproducir a la propia comunidad (INI, 2000). Ser indígena, se caracteriza además por las condiciones de pobreza y desigualdad en la que desarrollan sus vidas, ya que generalmente están asentados en regiones de difícil acceso. La base de su economía es la agricultura, que se realiza con prácticas tradicionales, sujetas a los temporales; practican la artesanía como una actividad emergente en el proceso de sobrevivencia. [56]



Martínez Baltazar Ana Lilia

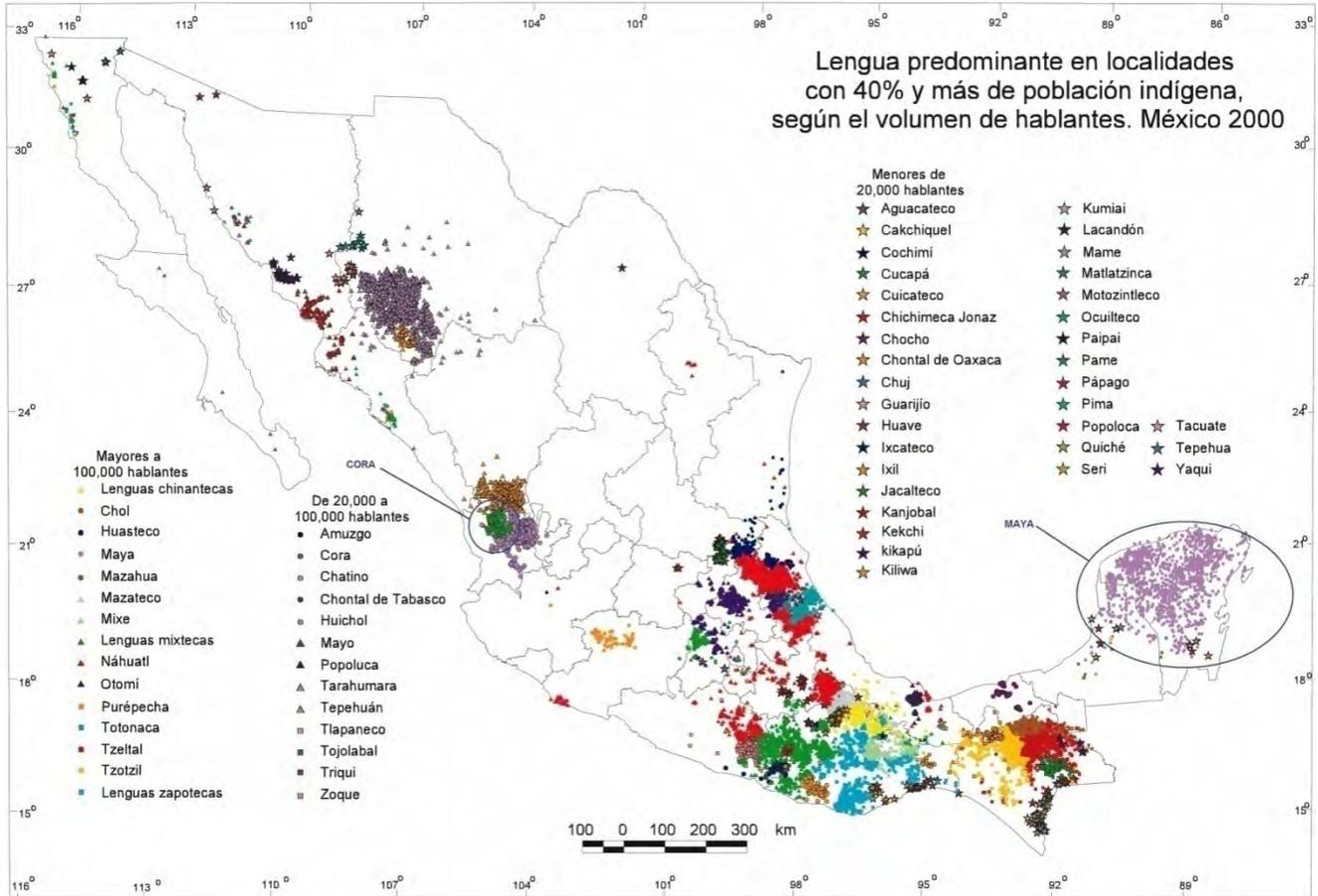


Figura 12<sup>[57]</sup>. Localización población indígena MAYA y CORA.

## Cora

Los cora (*NÁAYARI*, SINGULAR; *NÁAYARITE*, PLURAL) habitan la región montañosa de la Sierra Madre Occidental correspondiente al noreste del actual estado de Nayarit. Los cora mantuvieron una región autónoma del poder virreinal y de la influencia católica hasta 1722.

A finales del siglo XIX un grupo de antropólogos realizaron investigaciones pioneras en la región serrana nayarita. A partir de las publicaciones de estos antropólogos, los cora fueron reconocidos como una de las culturas trascendentes de la humanidad. En publicaciones científicas se analizaron, en términos comparativos con los indígenas del norte de México y el suroeste de Estados Unidos, sus características fenotípicas (fisiológicas) y sus tradiciones terapéuticas.

En la actualidad, varios etnólogos, tanto mexicanos como norteamericanos y japoneses, continúan la labor de investigación de la cultura Cora, aunque todavía se está lejos de



Martínez Baltazar Ana Lilia

comprender su noción particular de persona – que difiere sustancialmente de la división cuerpo-alma judeo-cristiana-, y de analizar las particularidades de su chamanismo y de su medicina y herbolaria tradicionales. [19]

Este grupo indígena no sobreviviría sin el dinero obtenido por el trabajo estacional en la bocasierra y la costa del estado de Nayarit, como jornaleros de café, frijol y tabaco, y los ingresos logrados como trabajadores migrantes en Estado Unidos. En algunas zonas apartadas se ha introducido, de manera subrepticia, el cultivo de marihuana y amapola, a partir de lo cual algunos Cora se han convertido en agricultores comerciales sujetos a la explotación de las redes del narcotráfico.

La caza, la pesca y la recolección son actividades económicas complementarias. El venado es la pieza venatoria más importante, por encima de jabalíes, liebres e iguanas. En los ríos y arroyos se lleva a cabo la pesca de peces, camarones, langostas (*cauques*) y tortugas; prevalece la técnica de “envenenamiento” del agua (con sustancias vegetales) y el uso de redes. La recolección varía de acuerdo a la zona ecológica; se obtienen nopales, verdolagas, “flor de turco”, guamúchiles, nanchis, arrayanes, anonas, gualacamotes y palmitos.

Los cora hablan su propia lengua aborígen, correspondiente a la familia yuto-azteca, la cual, junto con el idioma huichol, conforma la subfamilia corachol.

Aunque prevalecen las uniones monogámicas, los nayaritas mantienen el matrimonio poligínico vigente, el cual corresponde a una amplia tradición nativa.[19]

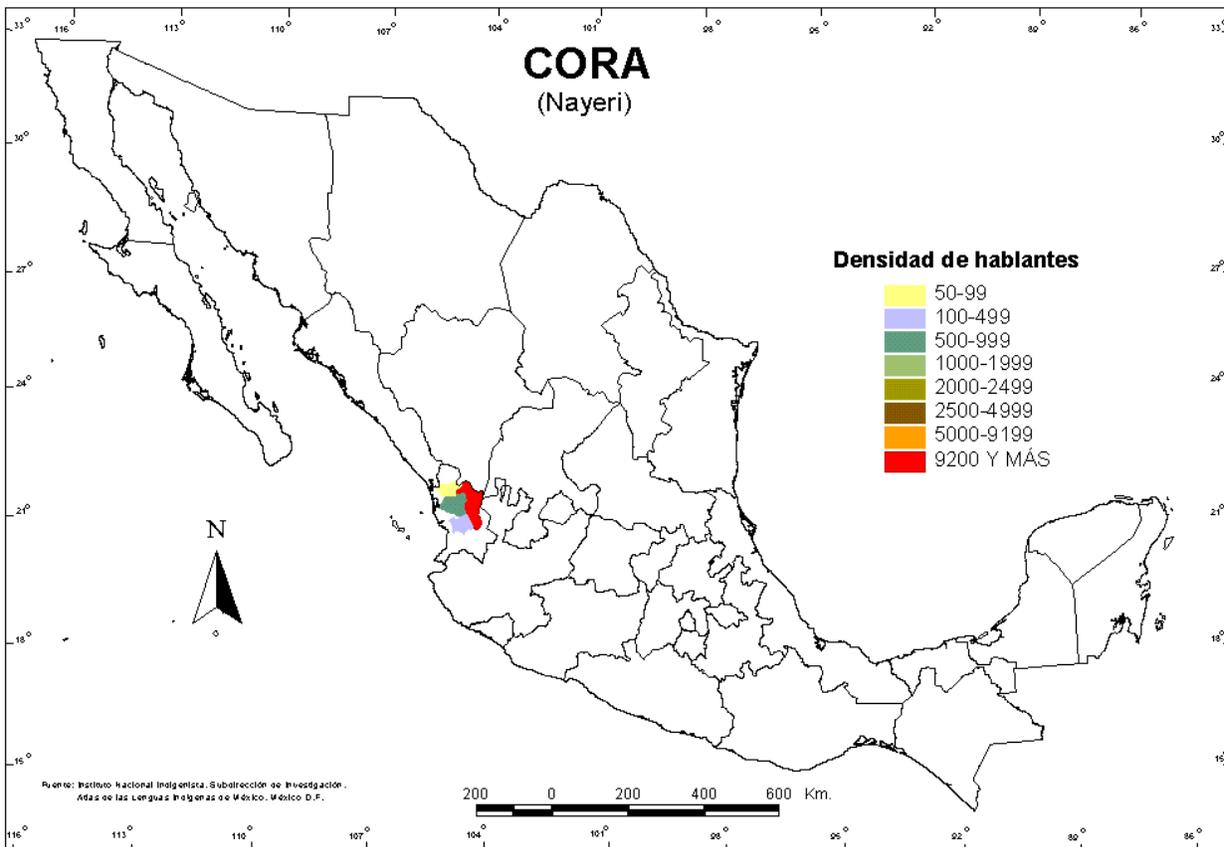


Figura 13<sup>[58]</sup>. Ubicación geográfica y densidad de hablantes población Cora.

## Maya

Otra población indígena de gran importancia es la maya, ya que los rasgos que imprime el mundo maya en el rostro plural del México indio son, sin alguna, de primera magnitud. Los herederos de la que es considerada por muchos la civilización más deslumbrante de la América precolombina tienen su asiento primario en siete estados del territorio mexicano actual: Tabasco, Chiapas, Veracruz, San Luis Potosí y las tres entidades que conforman la península yucateca: Campeche, Quintana Roo y Yucatán, donde habitan los llamados propiamente mayas, que dieron nombre a todos los integrantes de la familia lingüística denominada mayance, mayanse o mayense. [20]



Los mayas no constituían un estado unificado, sino que se organizaban en varias ciudades-estado independientes. La zona maya estaba dividida en muchas ciudades-Estado las cuales eran señoríos. Los mayas habitaron una extensa zona, que reúne climas diversos, formada por los actuales estados de Tabasco, Chiapas, Campeche, Yucatán Y Quintana Roo, así como los países centroamericanos de Belice, Guatemala, El Salvador y Honduras. Construyeron ciudades y centros ceremoniales en varios lugares entre los que destacan: Palenque, Yaxchilán, Edzná, Labná, Sayil, Kabah, Cobá, Dzibilchaltún, Toniná, Mayapán, Chichén Itzá, Tulum, Uxmal, Tikal y Bonampak.

Si bien los mayas siguen habitando un territorio que domesticaron hace milenios, ahora los comparten con otros, en particular con los mestizos, surgidos no sólo del maridaje maya con lo hispano, sino también de los mestizajes resultantes de otras oleadas migratorias, casi todas ellas del siglo XIX, entre las cuales merecen destacarse las de grupos libaneses, asiáticos (chinos y coreanos), e incluso con otros grupos indígenas, como los yaquis.

El estado de Campeche, cuya población indígena hasta hace unas décadas era consideradamente exclusivamente mayahablante, para 1994 albergaba – de acuerdo con estimaciones en ese tiempo del Instituto Nacional Indigenista (INI) – una población indígena de 128 412 sobre un total de 347 493 pobladores. Entre éstos, ocupaban el primer lugar los hablantes de maya (81.04%), seguidos por los choles (de procedencia chiapaneca, vía el colindante estado de Tabasco), que apenas representaban el 6%. El 13% restante se repartía entre quienes hablaban alguno de los otros 18 dialectos que registraron las encuestas.

La identidad de los indígenas mayas se mantiene con vigor por la concurrencia de al menos tres factores asociados: el uso cotidiano de la lengua maya, la permanencia de rituales y costumbres religiosas y la organización social de carácter autónomo de las comunidades.

Civilización tradicionalmente vinculada al cultivo del maíz, la maya, es bien sabido, logró importantes avances en el conocimiento de los suelos, las condiciones climáticas y los peculiares requerimientos del cultivo de ese cereal con la finalidad de obtener mejor rendimientos. Variando según las potencialidades del terreno y los intereses del terreno y los interés del gran capital, se abocan a cultivar productos como henequén, cítricos, flores, chile



Martínez Baltazar Ana Lilia

o leguminosas; casi todos siembran aquellos que tienden a permitir la cada vez inaccesible auto subsistencia alimenticia: maíz, frijol y calabaza, la clásica triada mesoamericana. Pero los trabajos agrícolas no son los únicos, muchos indígenas ocupan buena parte de su tiempo en labores como la extracción de sal, la fabricación de productos hechos con fibras naturales, la cestería, la cerámica, la manufactura de prendas de algodón, el urdido de hamacas, la orfebrería, las labores en cuerno bovino, sustituyendo a las de carey.

Particularmente rico es el conocimiento que guardan los especialistas médicos locales (curanderos, herbolarios, quiroprácticos y parteras) acerca de plantas a las que se atribuyen virtudes terapéuticas: hierbabuena para los espasmos; árnica para el asma y la bronquitis; belladona para la hinchazón por golpes; orégano para el dolor de oído; albahaca para la carnosidad, el aire, el ojo y el susto; pepino kat para la tos y problemas o dolor al orinar. Los curanderos tienen claro, empero, que a veces concurren otros elementos, ciertas técnicas y rituales, para obtener los beneficios o acrecentarlos.

Con respecto al tema de salud, entre los adultos mayores son frecuentes las consultas por problemas reumáticos y diabetes, padecimientos cuyo control continuo a menudo se dificulta en el caso de las comunidades más apartadas, donde los mayores afectados por tales patologías se ven obligados a trasladarse periódicamente a centros poblacionales mayores, con los gastos y molestias consecuentes. En el año 1995 la tasa de mortalidad en el estado de Campeche por diabetes mellitus era del 25.7%. [19]

Gran parte del territorio del estado de Campeche, ubicado en la región maya, es habitado, actualmente por población indígena, la cual ha modificado algunos de los caracteres externos que los identifican como son el vestido, la vivienda, algunas creencias; no obstante estos cambios la esencia interna se preserva en las prácticas rituales y religiosas, cívicas, organización y sistemas de cargo que permite que por cuestiones de género, mujeres y hombres, tengan papeles diferenciados en las propias comunidades y en el exterior, pero a su vez, tengan diferente condición y posición. [56]

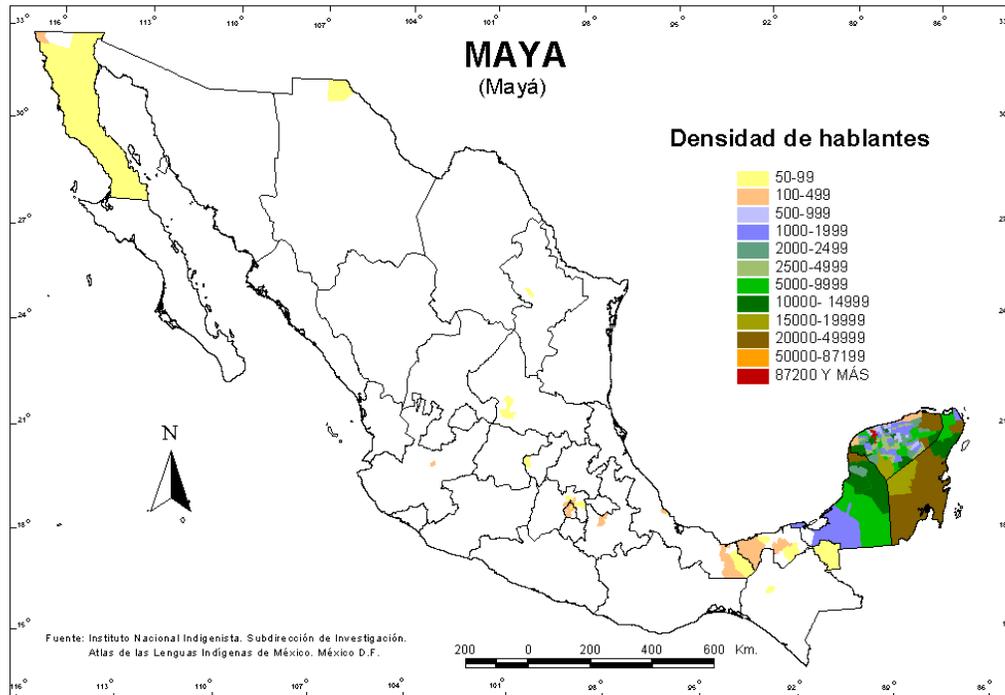


Figura 14<sup>[59]</sup>. Densidad de hablantes de la lengua maya.

Principales causas de muerte en municipios indígenas, México 2005					
Causa	Mujeres		Hombres		
	No.	%	No.	%	
1 Diabetes	1,864	10.9	Cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado	2,447	11.3
2 Enfermedades isquémicas del corazón	1,319	7.7	Enfermedades isquémicas del corazón	1,697	7.8
3 Enfermedad cerebro-vascular	1,036	6.0	Diabetes mellitus	1,471	6.8
4 Cirrosis y otras enfermedades del hígado	735	4.3	Enfermedad cerebro-vascular	1,024	4.7
5 Infecciones respiratorias agudas	698	4.1	Infecciones respiratorias agudas	755	3.5
6 Desnutrición calórico-proteica	685	4.0	Homicidios	709	3.3
7 Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	633	3.7	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	597	2.7
8 Enfermedades infecciosas intestinales	483	2.8	Desnutrición proteico-calórica	571	2.6
9 Nefritis y nefrosis	450	2.6	Consumo excesivo de alcohol	569	2.6
10 Cardiopatía hipertensiva	450	2.6	Enfermedades infecciosas intestinales	491	2.3
Causas mal definidas	1,183	6.9	Causas mal definidas	1,156	5.3
Resto	7,619	44.4	Resto	10,246	47.1
<b>Total</b>	<b>17,155</b>		<b>Total</b>	<b>21,733</b>	

Fuente: DGIS, Secretaría de Salud (datos propios no publicados)

Figura 15<sup>[83]</sup>. Principales causas de muerte en comunidades indígenas.



## IV. Justificación

La DM tipo 2 es uno de los mayores problemas de salud en México y su prevalencia cada día es mayor en la población mestiza mexicana, lo que permite suponer la existencia de un fondo diabetogénico que hace al mexicano mestizo más susceptible a desarrollar esta enfermedad. Tomando en cuenta que los mexicanos somos fruto del mestizaje entre indígenas mexicanos (75%) con europeos (20%) y africanos (5%), es de vital importancia estudiar la genética de la población indígena, para conocer el fondo diabetogénico correspondiente a la herencia indígena del mexicano que contribuye a la aparición de la Diabetes mellitus tipo 2 en la población mestiza mexicana.



## V. Hipótesis

Los polimorfismo T130I del gen HNF4A, R133W del gen Pax4, y A45T del gen NeuroD1 se presentan en una frecuencia alta en población maya y cora.



## VI. Objetivos

### Objetivo principal:

Determinar la presencia de los polimorfismos T130I en el gen *HNF4A*, R133W del gen *PAX4* y, A45T del gen *NEUROD1* en población Maya y Cora.

### Objetivos particulares:

- a) Estudiar la frecuencia de los polimorfismos T130I del gen *HNF4A*, R133W del gen *PAX4* y A45T del gen *NEUROD1* en población Maya y Cora.
- b) Caracterizar bioquímica y antropométricamente a la población Maya y Cora.
- c) Correlacionar los hallazgos moleculares con los resultados bioquímicos y antropométricos de las dos poblaciones estudiadas.



## VII. Material y Métodos

### Muestras

Para la obtención de las muestras, se viajó a las comunidades indígenas Maya en el estado de Campeche y a la Cora en el estado de Nayarit. La selección de los sujetos fue tipo censo, para poder formar parte del proyecto de investigación tuvieron que firmar una carta de conformidad. (Apéndice I). Se logró el contacto con los representantes de cada comunidad indígena vía la Secretaría de Salud, el IMSS y la CDI. Los criterios para tomar muestra a cada sujeto fue la edad (mayor a 18 años) y que estuvieran en ayunas.

Se tomaron 20mL de sangre periférica a cada sujeto en estudio, que cumpliera con los requisitos de selección y quisiera participar en el proyecto de investigación. La sangre fue separada en dos tubos; uno para obtener el suero y determinar glucosa, colesterol, triglicéridos e insulina y el otro tubo para la extracción de DNA y así realizar las pruebas moleculares (PCR, RFLP y secuenciación).

### Datos Antropométricos

El cálculo de índice de masa corporal (IMC) se realizó mediante la fórmula de Bray, que divide el peso en kilogramos entre la talla en metros elevada al cuadrado, por lo que las unidades son  $\text{Kg}/\text{m}^2$ . Un IMC entre 25-29.9 indica sobrepeso (pre-obesidad), mientras que un valor de IMC mayor a 30 indica obesidad. [61]

Los datos de IMC indican un sobrepeso en ambas poblaciones indígenas. El índice de cintura cadera (ICC) se determinó dividiendo la circunferencia de la cintura en centímetros entre la circunferencia de la cadera en centímetros.

Con los datos de IMC se estableció si la población en estudio tenía un peso normal, sobrepeso u obesidad, usando los siguientes criterios:



Tabla No.3 Criterios de diagnóstico de Obesidad (OMS)

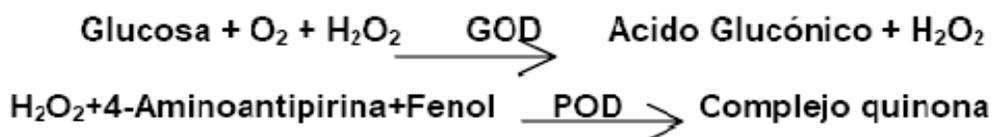
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	Condición
< 18.5	Bajo peso
18.5-24.9	Normal
25-29.9	Sobrepeso
≥30	Obesidad

### Pruebas bioquímicas

La determinación cuantitativa de glucosa, colesterol y triglicéridos en suero, se llevaron a cabo mediante kits enzimático-colorimétricos de la marca Stanbio Laboratory (LICON, Boerne TX).

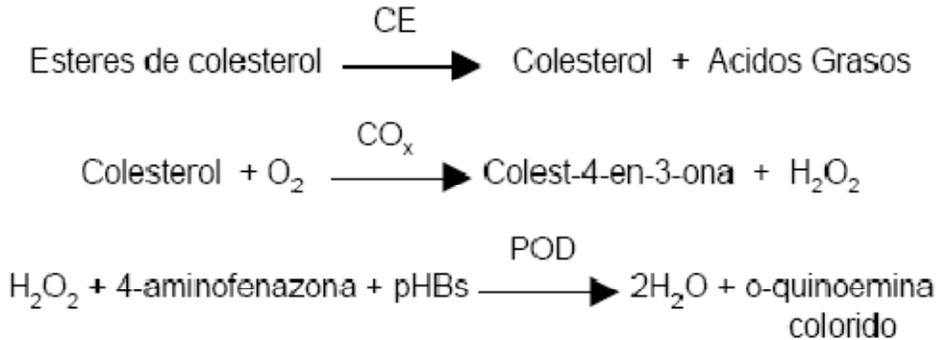
#### a) Glucosa

Mediante el método de glucosa oxidasa y peroxidasa (GOD-POD). La glucosa se oxida en presencia de la glucosa oxidasa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, este último reacciona en presencia de la peroxidasa con fenol y 4-aminoantipirina para formar un complejo colorido rojo violeta de quinona (quinonaimina). La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de glucosa, y se lee a 500nm.



#### b) Colesterol Total

La colesterol esterasa (CE) hidroliza los ésteres para originar colesterol libre y ácidos grasos. El colesterol libre así producido, más el colesterol preformado se oxidan en presencia de colesterol oxidasa (Cox) para dar colest-4-en-3-ona y peróxido de hidrógeno. Un cromógeno quinonaimina, con absorción máxima de 500 nm, se produce cuando el fenol se acopla oxidativamente con 4-aminofenazona, en presencia de peroxidasa (POD) con peróxido de hidrógeno. La intensidad del color rojo final es proporcional a la concentración total de colesterol.



c) Triglicéridos

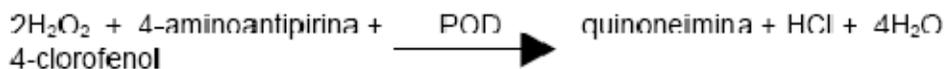
1. El glicerol y los ácidos grasos se forman en una primera etapa por la acción de la lipasa sobre los triglicéridos.
2. El glicerol se fosforila por el adenosin-5'-trifosfato (ATP) para producir glicerol-3 fosfato (G-3-P) y adenosin-5'-difosfato (ADP) en una reacción catalizada por la glicerol-cinasa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



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



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



d) Determinación de ácido úrico

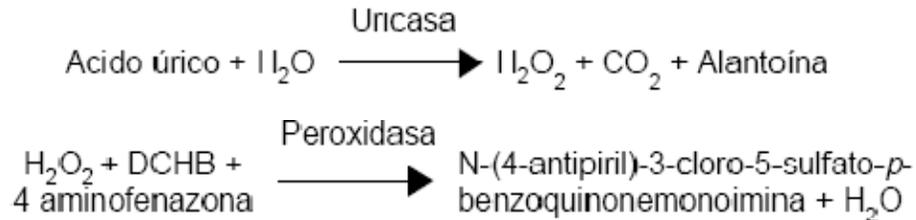
Se utilizó el kit comercial Stanbio LiquiColor de Ácido Úrico-PAP, para la determinación cuantitativa enzimática colorimétrica de ácido úrico en suero o plasma.

La uricasa actúa sobre el ácido úrico para formar peróxido de hidrógeno y alantoína. El peróxido de hidrógeno es leído cuantitativamente por la reacción con el ácido 3,5-dicloro-2-



Martínez Baltazar Ana Lilia

hidroxibenzosulfónico (DCHB) en presencia de peroxidasa y 4-aminofenazona, para formar un complejo quinoneimina de color rojo violeta.



#### e) Determinación de creatinina

Se empleó el kit comercial de Spinreact de Creatinina-J, para la determinación cuantitativa colorimétrica de creatinina en suero o plasma. Este ensayo está basado en la reacción de la creatinina con el picrato alcalino descrito por Jaffé. La creatinina reacciona con el picrato alcalino formando un complejo rojizo. El intervalo escogido para las lecturas permite eliminar gran parte de interferencias conocidas del método. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra evaluada.



### Determinaciones Hormonales

a) Insulina: La determinación de la insulina se realizó a través de un kit comercial de Diagnostic Systems Laboratorios Inc (DSL).

La insulina se midió mediante un radioinmunoanálisis de fase sólida, donde la insulina marcada con  $^{125}\text{I}$  compete durante un tiempo fijo con la insulina presente en la muestra, por sitios de unión al anticuerpo específico para la insulina. El anticuerpo utilizado está inmovilizado en la pared de un tubo de polipropileno debido a ello la simple decantación de sobrenadante es suficiente para terminar la competencia y así aislar la fracción de anticuerpo unido de la insulina marcada con el isótopo. La lectura del tubo en un contenedor gamma proporciona un número (cpm, cuentas por minuto) que se convierte por medio de una curva de calibración en una medida de la insulina (mUI/mL) presente en la muestra.



## Extracción de DNA

El DNA se extrajo mediante una técnica estándar modificada por Buffone (Buffone y Darlington 1985) a partir de leucocitos de sangre periférica.

Se colocaron 10mL de sangre total en tubos cónicos de 50mL con EDTA, se les añadió 25mL de solución Sacarosa/Tritón 2X fría, se llevó a un volumen de 50mL con agua destilada y esterilizada, se incubaron por 10 minutos en hielo y centrifugaron a 2000rpm durante 15 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se añadieron 4mL de solución Sacarosa/Tritón 1X, se centrifugaron una vez más a 2000rpm durante 15 minutos a 4°C, y se decantaron cuidadosamente.

Al pellet obtenido se le añadieron 3mL de amortiguador de lisis nuclear y se resuspendió con una pipeta pasteur sellada de la punta. Se añadieron 216µL de dodecil sulfato de sodio al 10%, se mezcló cuidadosamente y se agregaron 100 µL de proteinasa K al 0.5%, se disolvió el pellet y se incubó la solución toda la noche a 37°C. Posteriormente se transfirió la muestra a un tubo cónico estéril de 15mL, se le añadió 1mL de cloruro de sodio saturado, se agitó vigorosamente y centrifugó a 2000rpm durante 15 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante a otro tubo cónico de 15mL y se descartó el pellet.

El DNA se precipitó adicionando dos volúmenes de etanol al 95% frío, finalmente el DNA se recuperó mediante una pipeta pasteur sellada de la punta, el cloruro de sodio se eliminó mediante un lavado suave con etanol al 75%. El etanol se removió por evaporación y se resuspendió el DNA en 200 µL de buffer TE (Tris-HCl-EDTA). El DNA se cuantificó espectrofotométricamente (260/280nm) haciendo una dilución 1:200 (5 µL muestra + 995 µL de agua desionizada) para conocer el grado de pureza (pureza óptima 1.8-2.0 densidades ópticas) y concentración.

## PCR del exón 4 del gen *HNF-4α*, exón 3 del gen *Pax4* y del exón 2.1 del gen *NeuroD1*

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica utilizada para la amplificación de un segmento de DNA específico, utilizando DNA polimerasa, un templado de DNA genómico y oligonucleótidos específicos que flanquean el exón deseado a amplificar. La reacción consiste en una serie de ciclos. a) Desnaturalización del templado de DNA por medio de la elevación de la temperatura, para lograr la ruptura de los puentes de hidrógeno, y separar la



Martínez Baltazar Ana Lilia

doble cadena de DNA. b) Alineamiento, donde los oligonucleótidos se hibridan específicamente con el templado de DNA. c) Polimerización, mediante una DNA polimerasa los oligonucleótidos son extendidos.

Ciclos	T130I	R133W	A45T
	94°C, 5 minutos	94°C, 5 minutos	94°C, 5 minutos
Desnaturalización	94°C, 30 segundos	94°C, 30 segundos	94°C, 30 segundos
Alineamiento	68°C, 30 segundos	58°C, 30 segundos	60°C, 30 segundos
Polimerización	72°C, 30 segundos	72°C, 30 segundos	72°C, 30 segundos
	72°C, 10 minutos	72°C, 10 minutos	72°C, 10 minutos

Se amplificó el exón 4 del gen *HNF4A*, el exón 3 de *PAX4* y el exón 2 de *NEUROD1*.

Se ocupó DNA genómico, Master Mix (Taq polimerasa, Buffer con Mg y desoxi-nucleotri-fosfatos (dNTPs)).

Los primers empleados para la amplificación de los genes fueron:

- Para *HNF4A*: se obtiene un producto de 271pb  
 Oligo A: 5'-CCACCCCTACTCCATCCCTGT-3'  
 Oligo B: 5'-CCCTCCCGTCAGCTGCTCCA-3'
- Para *PAX4*: se obtiene un producto de 165pb  
 Oligo A: 5'-CCTGAGTCTGAGCACCATCTC-3'  
 Oligo B: 5'-GATTTGGCTGTGATTAGCCC-3'
- Para *NEUROD1*: se obtiene un producto de 483pb  
 Oligo A: 5'-ACTTTTCGCAAGCATTGTACAGG-3'  
 Oligo B: 5'-CGCGTTCAGTCCGTGCATGC-3'

La mezcla de reacción debe contener master mix 85mM, oligo A y B 20mM de cada uno, Taq polimerasa 2 unidades, y súper agua c.b.p. 25µL.

Agregar 24.5 µL de la mezcla de reacción a cada tubo eppendorf de 500 µL y 1 µL de DNA genómico.

Al terminar, se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 2% para verificar que se obtuvo la amplificación del producto esperado.



### Polimorfismos en los fragmentos de restricción (RFLP)

Se utilizaron tres endonucleasas de restricción la enzima Sfu I (*Sphaerotilus species*. Roche, Penzberg, Germany) para la mutación T130I en el exón 4 de *HNF4A*. La enzima Hsp92II (*Haemophilus influenzae* 92. Promega, Madison, WI, U.S.A) para la mutación R133W en el exón 3 de *PAX4*. Y la enzima Mwo I (*Methanobacterium wolfeii* DSM 2970. BioLabs, New England, U.S.A.), para la mutación A45T en el exón 2 de *NEUROD1*.

- La endonucleasa Sfu I efectúa un corte en el producto de PCR si encuentra la mutación T130I, dando dos bandas, una de 190pb y otra de 81pb. Las muestras con una sola banda de 271pb no portan la mutación.



- La endonucleasa Hsp92II efectúa un corte en el producto de PCR si encuentra el polimorfismo R133W, dando dos bandas, una de 109pb y una de 56pb.



- La endonucleasa Mwo I efectúa un corte en el producto de PCR cuando no encuentra la variante A45T, corta los wild type, una banda de 214pb y una de 245pb, y una banda de 24pb cuando son homocigotos. Para los heterocigotos se aprecia además la banda de 483pb. Las muestras con solo la banda de 483pb presentan la variante A45T y son homocigotos para la variante.





## Secuenciación

La secuenciación fue realizada mediante el método automático de secuenciación, para obtener la secuencia de bases nitrogenadas del DNA. De acuerdo a los resultados de los RFLP, se eligieron muestras de DNA que presentaron cortes que indicaban la presencia de la variante, tanto en su forma homocigoto como heterocigoto. Las muestras elegidas se purificaron con un sistema de purificación rápida para PCR (Marligen Bioscience Inc).

La secuenciación se llevo cabo en el secuenciador 3130XI de Applied Biosystems, bajo los siguientes parámetros:

Reactivo	Volumen
Premix	1 $\mu$ l
Buffer BDS	3.5 $\mu$ l
Primer 5'	4 $\mu$ l
Agua desionizada	9 $\mu$ l
Producto de PCR purificado	2.5 $\mu$ l
Volumen total	20 $\mu$ l

El termociclador se configuro de la siguiente manera:

Desnaturalización	96° C	10 seg	} 25 ciclos
Alineación	50° C	5 seg	
Extensión	60° C	4 min	
Hold	4° C		

Una vez que se llevó a cabo la reacción de secuenciación, se procedió a purificar los productos de la reacción cíclica de secuencia, con el Kit Centri-Sep (Princeton separation Systems). Al producto purificado se le extrajo el agua, a través de un SPEED VAC y posteriormente fue resuspendido con 15  $\mu$ l de formamida, se desnaturalizaron a 95° C por tres minutos y colocaron en hielo antes de ser introducidos al secuenciador. El análisis del electroferograma resultante de llevo a cabo a través del programa Sequencing Analysis v 5.2.



## **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS Inc., versión 13 para Windows. En el estudio se consideró una significancia mínima de  $p < 0.05$  con un intervalo de confianza del 95% para cada una de las mediciones consideradas en esta investigación. Se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov a los datos con el propósito de evaluar la normalidad.



## VIII. Resultados

Para este estudio se tuvo la participación de 124 indígenas Coras del estado de Nayarit, y 110 indígenas Mayas del estado de Campeche; dando una población total de 234. Sin embargo, al realizar las pruebas bioquímicas se diagnosticaron sujetos diabéticos (todos mostraron glucosa >150mg/dL), estos sujetos no fueron considerados en la determinación de promedios en los datos bioquímicos y hormonales realizados del grupo de No Diabéticos.

Tabla No.2 Medidas Antropométricas de Coras y Mayas

Parámetro	CORAS	MAYAS
	Sujetos No Diabéticos	Sujetos No Diabéticos
N	119	96
Género F/M	83/36	60/36
Edad	45.6±18.3	44.0±14.9
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	M: 26.4±4.7	M: 30.2±4.9
(<25 Kg/m <sup>2</sup> )	H: 25.3±5.4	H: 29.0±4.4
ICC	M: 0.87±0.05	M: 0.85±0.06
(M:<0.8; H:<0.9)	H: 0.92±0.06	H: 0.93±0.05

Los datos mostrados son el resultado del promedio  $\pm$  la DS.

La frecuencia de personas diabéticas en coras y mayas fue de 4.2% y de 14.6% respectivamente. En el caso de los Coras el 100% de los pacientes diabéticos fueron mujeres, mientras que en mayas el porcentaje de mujeres diabéticas fue de 93%, y el de hombres 7%.

Se sabe que la diabetes es de las enfermedades que afectan más a mujeres que a los hombres [60], sin embargo en nuestro estudio, la n de mujeres es mucho mayor a la n de hombres, lo que pudiera explicar el comportamiento presentado.

Ambas etnias presentan sobrepeso, un 96% en Coras, y el 100% de Mayas.

La obesidad intra-abdominal se determinó por el Índice de Cintura Cadera, cuyo valor del rango normal de acuerdo a la clasificación de la OMS para los hombres es de 0.78 - 0.93, y para las mujeres de 0.71 – 0.84.



Martínez Baltazar Ana Lilia

El promedio de ICC para las mujeres de ambas etnias, fue de  $0.866 \pm 0.06$ ; y para los hombres fue de  $0.93 \pm 0.06$ . De las mujeres evaluadas, el 60% tuvieron obesidad intra-abdominal. El 38% de los hombres evaluados presentaron esta característica.

El rango de edad en ambas etnias fue abierta, el de la población Cora estudiada fue de 18-93 años. Mientras que para la población Maya estudiada fue de 18-79 años.

## Determinaciones bioquímicas y hormonales

Se realizó el perfil bioquímico y hormonal de cada sujeto de estudio, se determinaron las concentraciones en suero de glucosa, colesterol total, triglicéridos, HDL, LDL, creatinina, ácido úrico e insulina, los resultados se muestran en la tabla No.4

Tabla No.4 Perfil bioquímico y hormonal de las etnias Cora y Maya

Parámetro (Referencia)	CORAS	MAYAS	p
	Sujetos No Diabéticos	Sujetos No Diabéticos	
Glucosa (70-100mg/dL)	94±11.9	103±17.7	0.023
Colesterol (<200mg/dL)	174±35.3	198±37.9	0.033
Triglicéridos (50-200mg/dL)	168±105.4	189±96.3	0.033
HDL (>40mg/dL)	36±9.6	48±10.7	0.005
LDL (<100mg/dL)	106±27.8	111±27.9	ns
Creatinina			
M 0.4 - 1.3mg/dL	M: 0.79±0.16	M: 0.86±0.11	0.0001
H: 0.5 - 1.2mg/dL	H: 0.97±0.13	H: 1.45±2.15	
Ácido Úrico (3.6-8.3mg/dL)	5.38±1.37	5.32±1.38	0.002
Insulina (5-25µUI/mL)	12.7±10.6	12.1±10.7	ns

Los datos en la tabla son los promedios  $\pm$  la desviación estándar.

### a) Glucosa

Algunos valores de glucosa en suero de los sujetos no diabéticos estuvieron fuera del rango de referencia normal. Un 9.6% de mujeres coras y un 15% de mujeres Mayas presentaron valores entre 100-120mg/dL, esto probablemente por no estar en ayuno.



b) Colesterol

Los valores del colesterol de ambas etnias fueron  $<200\text{mg/dL}$ , que son los valores de referencia.

c) Triglicéridos

En lo referente a los triglicéridos, ambas etnias están dentro del rango de referencia normal (50-200 mg/dL).

d) HDL y LDL

El valor de HDL para la etnia Cora está por debajo del valor recomendado; y ambas etnias están por encima del valor límite recomendado.

e) Creatinina

El valor de creatinina que está fuera del rango de referencia es el de los hombres Mayas.

f) Ácido Úrico

Todos los valores determinados de ácido úrico se encuentran dentro del rango de referencia

g) Insulina

Todas las determinaciones de la insulina se encontraron dentro del rango de referencia, abarcando valores de 10 a  $13\mu\text{UI/mL}$ . Una Unidad Internacional de Insulina es equivalente a  $43.4\mu\text{g}$  de insulina humana del estándar de referencia de la Organización Mundial de la Salud.

El análisis estadístico al mostrar diferencias significativas entre ambas etnias nos indica que estas poblaciones no son idénticas, esto debido al lugar en que habitan, su alimentación y hábitos.

## Evaluación Molecular

### a) Evaluación de la mutación T130I del gen *HNF4A*

#### Verificación de la amplificación y tamaño de los productos de PCR

Se realizaron 234 amplificaciones por PCR del exón 4 (tamaño 271pb) del gen *HNF4A*. La figura 15 muestra un gel de verificación de amplificación del PCR de ambas etnias.

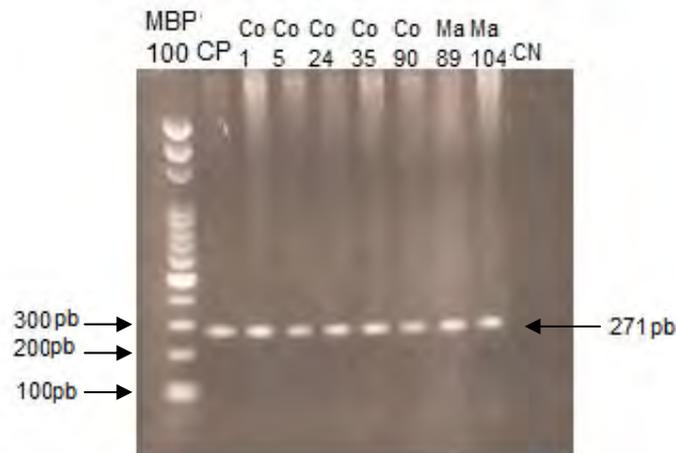


Figura 15. PCR preparativo para Coras y Mayas, gen *HNF4A*, exón 4. Gel de agarosa al 2% en TBE 1x, teñido bromuro de etidio. Voltaje = 80V durante 45 minutos. MBP = marcador de 100 pares de bases; CP = control positivo; Co = Coras; Ma = Mayas; CN = control negativo.

#### Tamaño de los productos del RFLP

Una vez corroborado el tamaño, se realiza la incubación del producto de PCR con la enzima durante toda la noche. La figura 16 muestra el gel de electroferesis para comprobar la digestión o no del amplicón.

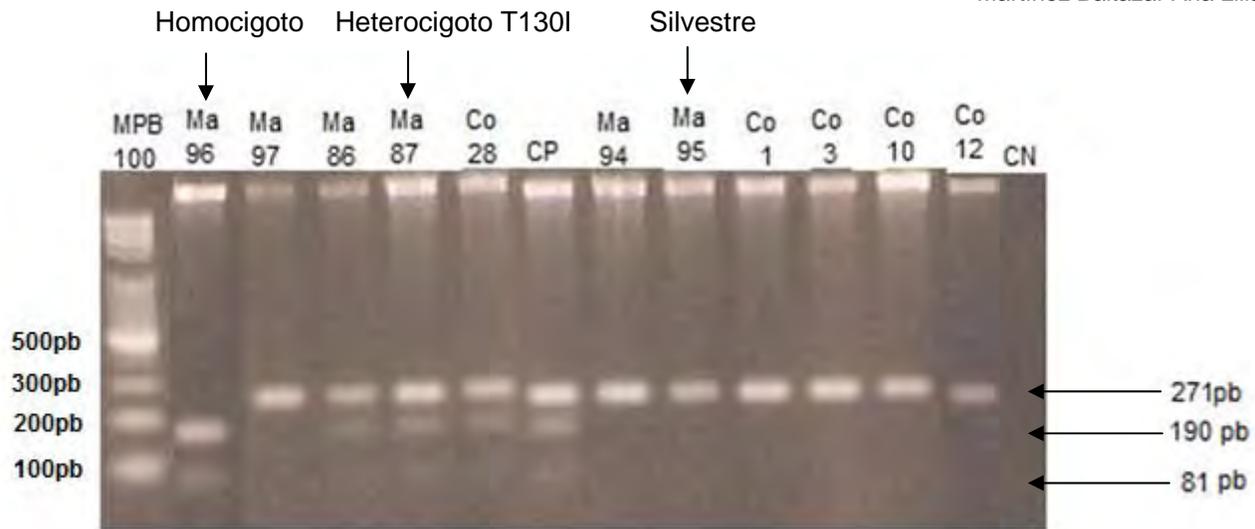


Figura 16. RFLP para Coras y Mayas, gen *HNF4A*, exón 4. Gel de agarosa al 3% en TBE 1x, teñido con bromuro de etidio. Voltaje = 80V durante 45 minutos. MBP = marcador de 100 pares de bases; CP = control positivo; Co = Coras; Ma = Mayas; CN = control negativo.

Analizando los geles de las electroforesis de los RFLP's, se pudo saber los sujetos que portan el polimorfismo T130I, debido al corte presentado se apreció si se encontraba en estado heterocigoto u homocigoto, se decidió realizar la secuenciación para reafirmar los resultados debido a un posible agotamiento de la enzima. Las muestras con 3 bandas en 271, 190 y 81pb indicaban la presencia de la mutación en estado heterocigoto (Fig.16, M86, M87 y Co28), en los casos donde sólo se observan dos bandas en 190 y 81pb corresponden a la mutación en estado homocigoto (Fig.16 Ma96). El encontrar este tipo de corte que determina el estado homocigoto fue de gran relevancia porque no se había observado este tipo de corte en otros estudios realizados por nuestro grupo. En el caso del genotipo silvestre únicamente se aprecia la banda en 271pb (Fig.16 Ma94, Ma95, Co1, Co3, Co10 y Co12).

### Secuenciación

El estado heterocigoto y homocigoto de la mutación T130I se comprobó realizando una secuenciación automática. Para lo que fue necesario volver a amplificar las muestras por PCR y su purificación. La figura 17 muestra el electroferograma de la secuenciación

Martínez Baltazar Ana Lilia

automática del gen silvestre. ACT, T130T, que codifica para la treonina. También se observa el electroferograma de la secuenciación automática de un portador de la T130I en estado heterocigoto. Se observan dos picos, AYT, T130I, el cambio provoca que codifique para una isoleucina. Por último se muestra el electroferograma de la secuenciación automática de un portador de la mutación en estado homocigoto, solamente se observa un pico, correspondiente al alelo mutado.

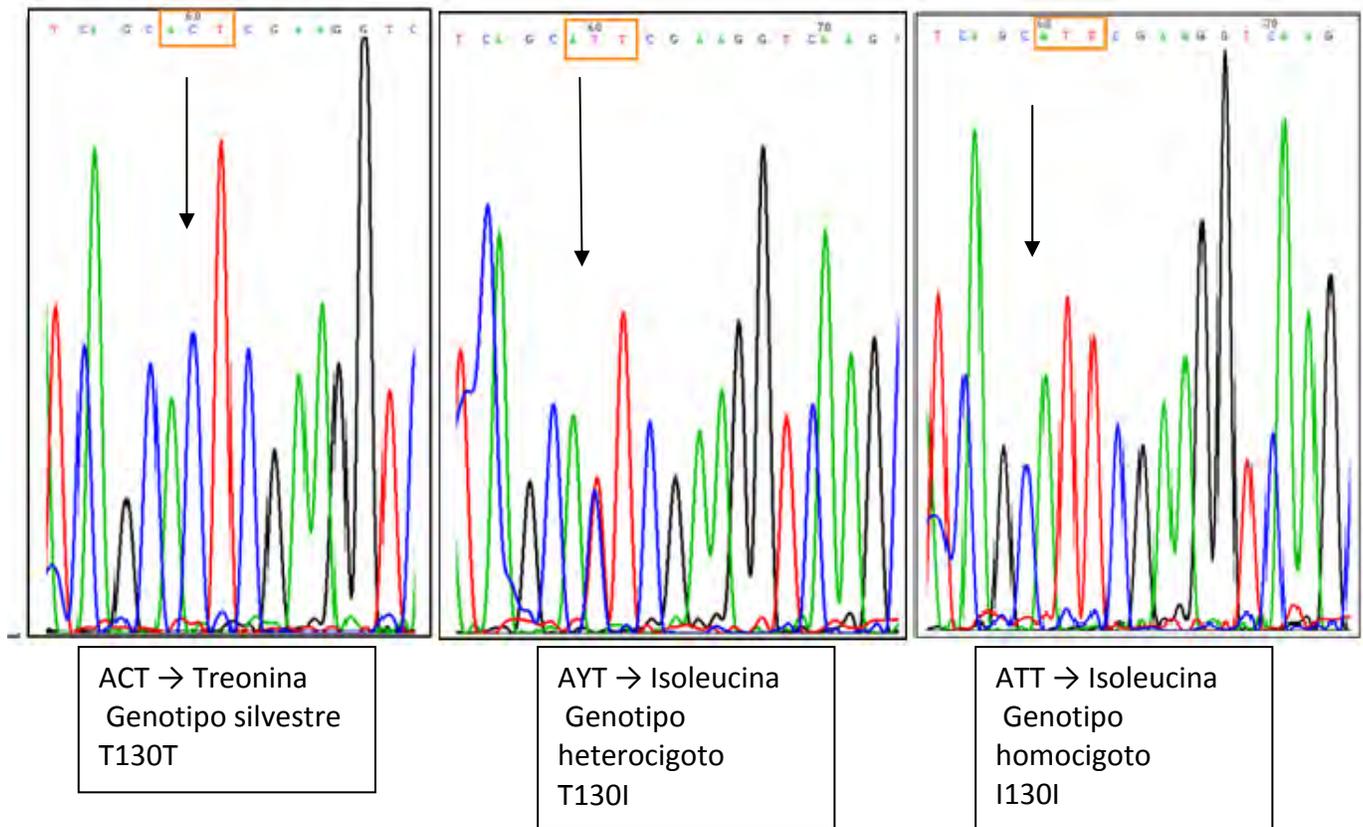


Figura 17. Electroferograma de la secuenciación automática de los genotipos: silvestre, heterocigoto y homocigoto para la T130T, T130I e I130I.

El polimorfismo T130I fue identificado en la población cora y maya en un 28% y 26% respectivamente, ambos porcentajes representa el 27% de las 234 muestras analizadas, incluyendo a los sujetos que presentaron diabetes. En las tablas 5 y 5.1 se muestran las características fenotípicas de los sujetos con presencia o ausencia de la mutación T130I.



Tabla 5. Comparación de la población Maya de acuerdo a la presencia y ausencia de la mutación T130I

Parámetro / Referencia	Alelo T130T Silvestre	Alelo T130I heterocigoto	Alelo I130I Homocigoto	p
N	78/81	24/25	4	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	29.6±0.5	29.3±0.9	28.0±2.4	ns
ICC	M: 0.85±0.05 H: 0.94±0.06	M: 0.86±0.07 H: 0.90±0.00	M: 0.80±0.08	ns
Glucosa (70-100mg/dL)	103±15	106±25	96±3	ns
Colesterol (<200mg/dL)	199±38	193±38	198±28	ns
Triglicéridos (50-200mg/dL)	189±97	187±102	189±97	ns
HDL (>40mg/dL)	49±11	47±11	37 ±10	ns
LDL (<100mg/dL)	113±28	106±28	96±49	ns
Creatinina mg/dL	M: 0.85±0.13 H: 1.48±2.28	M: 0.81±0.08 H: 1.22±0.19	M: 0.88±0.09	ns
Ácido Úrico (3.6-8.3mg/dL)	5.3±1.4	4.7 ±1.3	4.5±0.9	ns
Insulina (5-25µUI/mL)	12.5±11.6	11.8±9.4	8.7±4.7	ns

Los datos están representados como el promedio ± la desviación estándar.

p <0.05 indica que hay diferencia significativa; ns: no significativo



Tabla 5.1 Comparación de la población Cora de acuerdo a la presencia y ausencia de la mutación T130I

Parámetro / Referencia	Alelo T130T Silvestre	Alelo T130I heterocigoto	Alelo I130I Homocigoto	p
N	75/89	26/35	3	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	25.8±0.6	25.9±0.9	25.3±2.8	ns
ICC	M: 0.87±0.05	M: 0.88±0.05	M: 0.86±0.02	ns
	H: 0.92±0.06	H: 0.92±0.06	H: 0.92	
Glucosa (70-100mg/dL)	93±11	94±9	87±2	ns
Colesterol (<200mg/dL)	170±36	173±29	171±8	ns
Triglicéridos (50-200mg/dL)	140±54	130±52	154±48	ns
HDL (>40mg/dL)	37±1	37±2	32 ±5	ns
LDL (<100mg/dL)	105±3	109±5	108±26	ns
Creatinina mg/dL	M: 0.81±0.17	M: 0.76±0.11	M: 0.75±0.07	ns
	H: 0.98±0.15	H: 1.01±0.13	H: 1.00	
Ácido Úrico (3.6-8.3mg/dL)	5.3±1.4	5.0 ±1.2	4.5±0.5	ns
Insulina (5-25µUI/mL)	12.3±8.6	9.4±5.0	5.6±2.0	ns

Los datos están representados como el promedio ± la desviación estándar.

p <0.05 indica que hay diferencia significativa; ns: no significativo

Al realizar las pruebas estadísticas de los datos antropométricos, bioquímicos y hormonales entre los grupos que presentan o no el polimorfismo T130I (en estado heterocigoto y homocigoto) no se encontró una diferencia significativa, como tampoco entre los que la portan en estado homocigoto y heterocigoto.



Martínez Baltazar Ana Lilia

La tabla 6 muestra las frecuencias encontradas en las poblaciones indígenas y las de la población mestiza mexicana evaluada para esta variante en estudios anteriores por nuestro grupo.

Tabla 6. Frecuencias encontradas de la T130I en diferentes poblaciones

Población N	<i>HNF4A</i> Frecuencia genotípica			p	T130I Frecuencia Alélica			P
	T/T	T/I	Total		T	I	Total	
Mestiza (75)	71 (95%)	4 (5%)	75		146 (97%)	4 (3%)	150	
Coras (124)	89 (72%)	35 (28%)	124	0.00021	210 (85%)	38 (15%)	248	0.00007
Mayas (110)	81 (74%)	29 (26%)	110	0.00098	187 (85%)	33 (15%)	220	0.00010

$P < 0.05$  hay diferencia significativa, se evaluó la frecuencia de las poblaciones indígenas contra la de la mestiza.

El análisis de frecuencia muestra que hay diferencia significativa en la frecuencia que presenta cada etnia al comparar con la encontrada en la población mestiza mexicana.

## b) Evaluación molecular de la variante R133W del gen *PAX4*

### Verificación de amplificación y tamaño de los productos de PCR

Se realizaron 100 amplificaciones (50 de cada etnia) del exón 3 (talla 165pb) del gen *PAX4*, se corroboró la talla del producto de PCR con una electroforesis en gel de agarosa al 2%, a 80V durante una hora, se corrió frente a un marcador de pares de base de 100.

Los geles se observaron en un transiluminador UV. En la figura 18, se observa un gel para la verificación de la talla del producto de PCR.

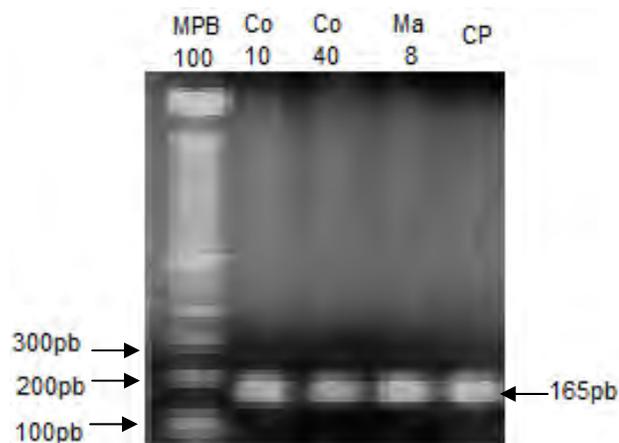


Figura 18. PCR preparativo para coras y mayas, gen *PAX4*, exón 3. Gel de agarosa al 2% en TBE 1x, teñido con bromuro de etidio. Voltaje = 80V durante 1 hora. MBP = marcador de 100 pares de bases; CP = control positivo

### Tamaño de los productos del RFLP

Verificada el tamaño del amplicón, se realizó el RFLP, mediante el uso de la enzima de restricción Hsp92II. En la figura 19, se observa un de los geles para la verificación de la talla del producto del RFLP.

El corte de la enzima Hsp92II se efectúa en el alelo con el codón TGG, generando los dos patrones TGG (109pb y 56pb), y CGG (165pb).

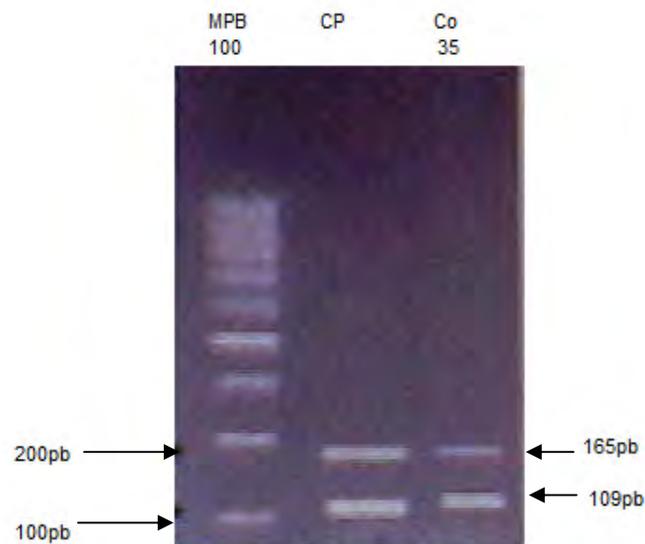


Figura 19. RFLP para coras, gen *PAX4*, exón 3. Gel de agarosa al 3% en TBE 1x, teñido con bromuro de etidio. Voltaje = 80V durante 1 hora. MBP = marcador de 100 pares de bases; CP = control positivo.

Se obtuvo un sólo sujeto con la variante polimórfica R133W, el Cora 35. En la figura 19 se observan únicamente dos bandas, ya que la tercera banda es menor a 100pb.

### Secuenciación

La muestra Co 35 fue amplificada por PCR y purificada para su secuenciación automática. La figura 20 muestra el electroferograma de la secuenciación automática del genotipo silvestre (CGG) que codifica para la arginina. También muestra el electroferograma del portador heterocigoto de la R133W, se pueden observar los picos encimados, el genotipo cambiado (TGG) que codifica para triptófano.

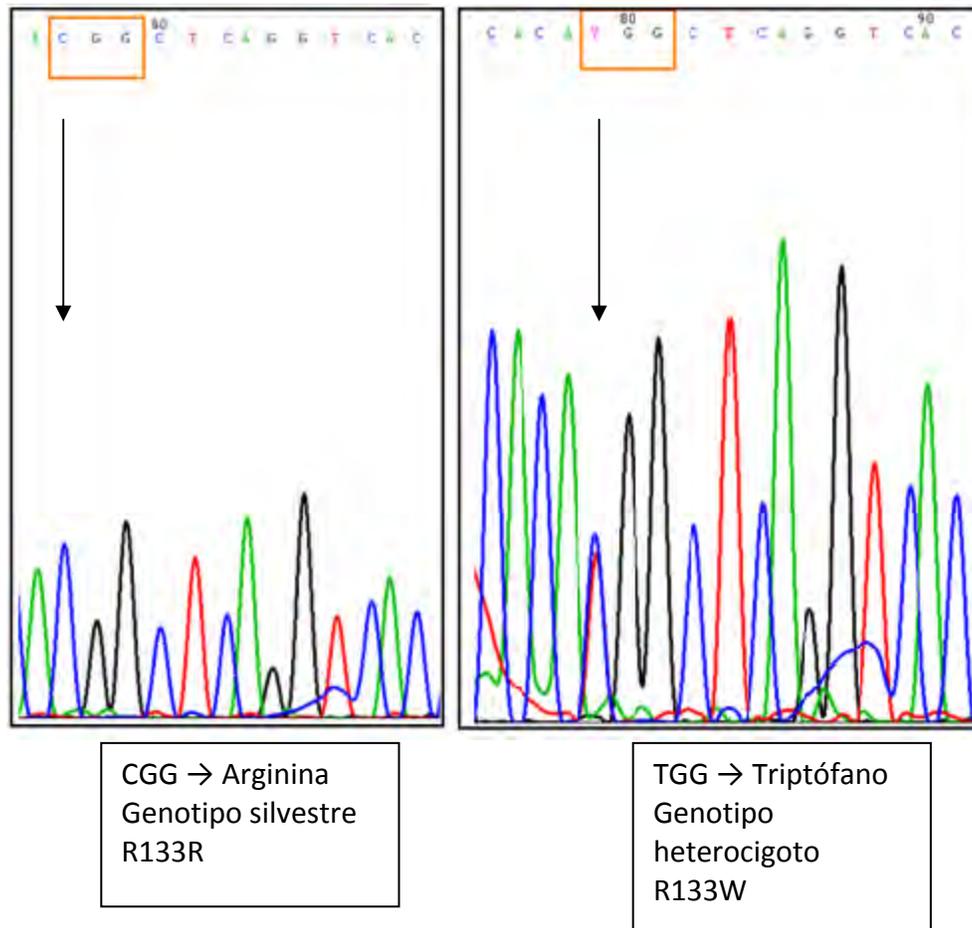


Figura 20. Electroferograma del genotipo silvestre. El triplete que codifica para la arginina es el CGG. El segundo cuadro muestra el electroferograma del genotipo mutado. Se observan dos picos (rojo y azul) encimados, el cambio es de la C por una T, TGG codifica para triptófano.

En la tabla 7 se muestran los datos antropométricos, bioquímicos y hormonal del sujeto portador de la variante R133W.

El sujeto portador es una mujer, no diabética, presenta obesidad, su IMC e ICC son muy elevados, y su perfil bioquímico y hormonal entran en los rangos de referencia normales.



Tabla 7. Datos antropométricos y bioquímicos del portador de la variante R133W

Parámetro	Alelo R133W
Sexo	Femenino
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	43.7
ICC	0.84
Glucosa (70-100mg/dL)	86
Colesterol (<200mg/dL)	158
Triglicéridos (50-200mg/dL)	129
HDL (>40mg/dL)	31
LDL (<100mg/dL)	101
Creatinina mg/dL	0.7
Ácido Úrico (3.6-8.3mg/dL)	5.4
Insulina (5-25μUI/mL)	20.7

El porcentaje portador de la variante polimórfica es del 1%.

### c) Evaluación molecular de la variante A45T del gen *NeuroD1*

#### Verificación de amplificación y tamaño de los productos de PCR

Se realizaron 100 amplificaciones (50 coras y 50 mayas) del exón 2.1 del gen *NeuroD1* ya que es en ese fragmento es donde está ubicado la variante A45T. El tamaño del exón es de 483pb. Para comprobar la talla del producto de PCR amplificado se realizaron geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio, se utilizó marcador de pares de bases de 100pb. Las condiciones de corrimiento del gel fueron 80V durante treinta minutos.

En la figura 21 se observa las fotografía de verificación de amplificación.

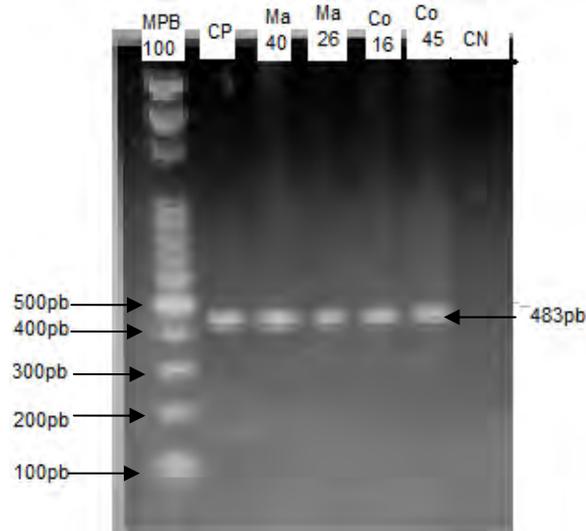


Figura 21. Gel del PCR preparativo para Coras y Mayas, gen *NeuroD1*, exón 2.1. Gel de agarosa al 2% en TBE 1x, teñido con bromuro de etidio. Voltaje = 80V durante 30 minutos. MBP = marcador de 100 pares de bases; CP = control positivo. CN = Control negativo.

### Tamaño de los productos del RFLP

La figura 22 se muestra la fotografía de verificación del tamaño de los productos de digestión del RFLP con la enzima MwoI.

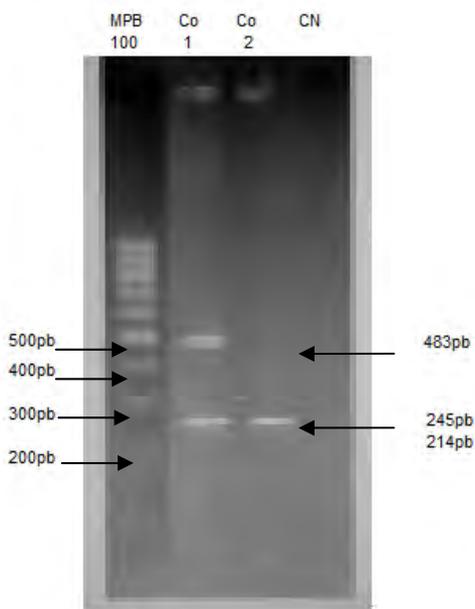


Figura 22. Gel del RFLP para Coras, gen *NeuroD1*, exón 2.1. Gel de agarosa al 3% en TBE 1x, teñido con bromuro de etidio. Voltaje = 80V durante 30 minutos. MBP = marcador de 100 pares de bases; CN = control negativo.

### Secuenciación

La figura 23 muestra la secuenciación automática del genotipo silvestre GCC que codifica para una alanina. El segundo cuadro muestra el electroferograma de un portador de la variante A45T en estado heterocigoto, donde se da la transición de GCC a ACC el cual codifica para una treonina.

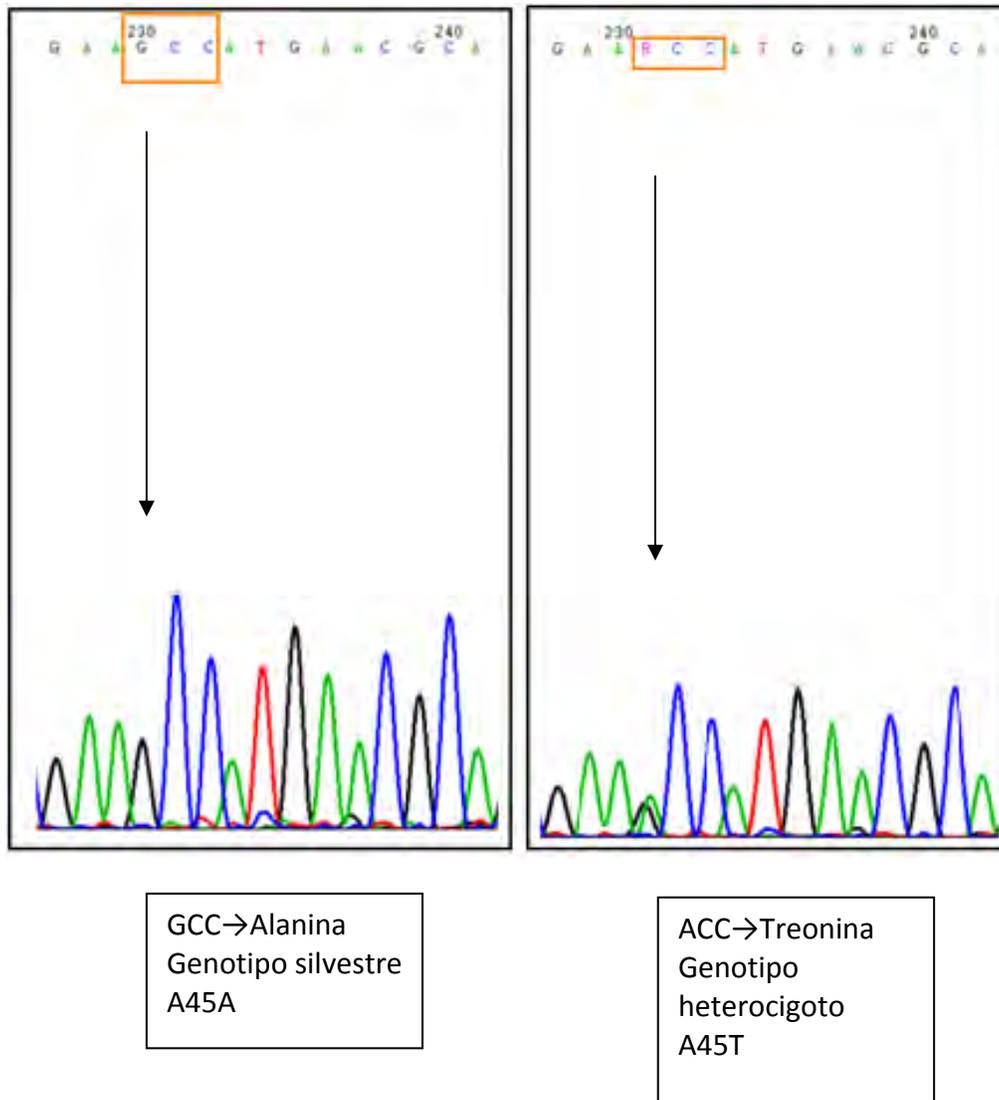


Figura 23. Electroferograma del genotipo silvestre, el triplete GCC, codifica para una alanina. El segundo electroferograma es del genotipo mutado heterocigoto, el triplete GCC cambia a ACC, codifica para una treonina. El cambio se observa por los dos picos sobrepuestos (negro y verde).



Martínez Baltazar Ana Lilia

El porcentaje de mayas portadores de la variante A45T fue del 18% (9 muestras), y de los coras el 14% (7 muestras). Un 16% de todas las muestras analizadas entre las dos etnias. En la tabla 8 y 8.1 se muestran las características fenotípicas de los sujetos con presencia o ausencia de la variante A45T.

Tabla 8. Comparación de la población Maya de acuerdo a la presencia y ausencia de la variante polimórfica A45T

Parámetro	Alelo A45A Silvestre	Alelo A45T Heterocigoto	Alelo T45T Homocigoto	p
N	42	4	5	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	30.2±4.4	28.0±2.7	28.8±5.0	ns
ICC	M: 0.84±0.07 H: 0.94±0.06	M: 0.86±0.06 H: 0.90	M: 0.87±0.05 H: 0.90	ns
Glucosa (70-100mg/dL)	104±14	105±16	105±15	ns
Colesterol (<200mg/dL)	200±34	195±50	214±35	ns
Triglicéridos (50-200mg/dL)	195±80	198±98	294±177	ns
HDL (>40mg/dL)	49.5±10	39.5±7.7	47.0±5.5	ns
LDL (<100mg/dL)	111±27	116±30	108±20	ns
Creatinina mg/dL	M: 0.90±0.11 H:1.96±3.2	M: 0.93±0.05 H:1.10	M: 0.77±0.09 H: 0.08	ns
Ácido Úrico (3.6-8.3mg/dL)	5.48±1.15	5.77±1.25	4.67±1.00	ns
Insulina (5-25µUI/mL)	14.0±13.8	15.12±9.7	14.1±12.9	Ns

Los datos están representados como el promedio ± la desviación estándar.

p <0.05 indica que hay diferencia significativa; ns : no significativo



Tabla 8.1 Comparación de la población Cora de acuerdo a la presencia y ausencia de la variante polimórfica A45T

Parámetro	Alelo A45A Silvestre	Alelo A45T Heterocigoto	P
N	43	7	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	26.4±5.2	28.2±5.2	Ns
ICC	M: 0.88±0.05 H: 0.95±0.07	M: 0.86±0.06 H: 0.94	Ns
Glucosa (70-100mg/dL)	89±9	92±11	Ns
Colesterol (<200mg/dL)	165±33	173±39	Ns
Triglicéridos (50-200mg/dL)	158±115	162±73	Ns
HDL (>40mg/dL)	34.8±9.7	38.2±8.2	ns
LDL (<100mg/dL)	100±23	102±33	ns
Creatinina mg/dL	M: 0.79±0.21 H: 0.92±0.13	M: 0.83±0.15 H: 0.90	ns
Ácido Úrico (3.6-8.3mg/dL)	5.35±1.44	4.82±1.09	ns
Insulina (5-25μUI/mL)	14.0±13.7	24.6±14.6	ns

Los datos están representados como el promedio ± la desviación estándar.

p <0.05 indica que hay diferencia significativa; ns : no significativo.

En ambas poblaciones evaluadas no hubo diferencia significativa en los parámetros evaluados entre los diferentes genotipos.



En la tabla 9 se aprecia la frecuencia encontrada en cada una de las poblaciones indígenas.

Tabla 9. Frecuencias encontradas del polimorfismo A45T

Población n	<i>NeuroD1</i> A45T			
	A/A	A/T	A	T
Coras (50)	43 (86%)	7 (14%)	93 (93%)	7 (7%)
Mayas (50)	41 (82%)	9 (18%)	86 (86%)	14 (14%)

A continuación se presentan los datos de los portadores Mayas que presentaron dos polimorfismos de los genes *NeuroD1* y *HNF4A*.

Tabla 10. Características antropométricas y perfil bioquímico de los portadores Mayas de polimorfismos en los genes *NeuroD1* *HNF4A*.

Parámetro / Referencia	Alelo T45T y T130I
N	3
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27±4.0
ICC	M: 0.86±0.057
Glucosa (70-100mg/dL)	99±9.6
Colesterol (<200mg/dL)	212±43
Triglicéridos (50-200mg/dL)	336±191
HDL (>40mg/dL)	45±6.0
LDL (<100mg/dL)	99±9.2
Creatinina mg/dL	M: 0.8±0.1
Ácido Úrico (3.6-8.3mg/dL)	4.8±1.2
Insulina (5-25µUI/mL)	12.3±4.2



Martínez Baltazar Ana Lilia

Cabe recalcar que los tres portadores de polimorfismos en los genes *NeuroD1* y *HNF4A* son mujeres Mayas, y que en los tres casos la variante del gen *NeuroD1* está en estado homocigoto (T45T), mientras que en el gen de *HNF4A* la variante está en estado heterocigoto (T130I). En lo que respecta al perfil bioquímico, el colesterol y triglicéridos sobrepasan los límites de referencia.

Resumiendo, este trabajo analizó tres polimorfismos (T130I, R133W y A45T) en población indígena (Cora y Maya) encontrándose en mayor proporción la T130I y la A45T.

En la tabla 11 se observa una recopilación con los porcentajes encontrados de cada evaluación molecular realizada.

Tabla 11 Frecuencias encontradas en las evaluaciones moleculares

Gen/ Mutación/SNP	Genotipo	Coras	Mayas	% total con SNP Coras	%total Con SNP Mayas
<i>HNF4A</i> T130I	T/T	72.0	74.0	28.0	26.0
	T/I	26.0	22.0		
	I/I	2.0	4.0		
<i>PAX4</i> R133W	R/R	98	100	2	0
	R/W	2	0		
	W/W	0	0		
<i>NeuroD1</i> A45T	A/A	86	84	14	18
	A/T	14	7.8		
	T/T	0	9.8		



## IX. Discusión de resultados

La diabetes mellitus afecta aproximadamente al 6% de la población mundial, su prevalencia es variada entre grupos étnicos y regiones geográficas [34]. La diabetes finalmente ha sido reconocida como una epidemia global, con el potencial de ocasionar una crisis de salubridad a nivel mundial, este padecimiento está creciendo más rápido de lo previsto [73]. Es una enfermedad que disminuye el promedio de esperanza de vida en unos 15 años [63], aumenta el riesgo de las enfermedades cardiovasculares de 2 a 4 veces, y es una causa principal de daño renal, entre otras [64]. La situación de la diabetes en cada país es diferente en términos de escala del problema, el tipo de problema y la habilidad del sistema de salud para lidiar con la enfermedad [73].

La DM en México como a nivel mundial es un problema de salud con consecuencias médicas, sociales, y económicas; y es una de las principales causas de mortalidad en la actualidad en nuestro país [63].

Comparando la información de 1990 con la que ahora posee el Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI, 2007), en 10 años la diabetes se elevó como causa de mortalidad en 28 entidades, en cuatro se mantuvo en idéntico lugar y en ninguna bajó. En Oaxaca y Chiapas, por ejemplo, se encontraba hace una década en el lugar 12 ó 13, pero ahora es la quinta o sexta causa de defunciones; de hecho, en ningún estado de la República Mexicana se encuentra más abajo del sexto lugar en este rubro [65].

Para poder entender la alta susceptibilidad del mexicano mestizo a la diabetes y otras enfermedades, es necesario conocer la genética de las culturas que dieron origen al pueblo mexicano de la actualidad. En México la población está conformada aproximadamente por un 10% de indígenas y más de un 80% de mestizos que son el resultado de la mezcla entre indígenas mexicanos, europeos y africanos de la época de colonización, sin embargo cada mestizo tiene proporciones ancestrales diferentes, generalizándose a un 75% de origen indígena, 25% caucásico y 5% africano. Existen estudios que muestran que las diferencias genómicas entre los mestizos mexicanos se deben principalmente a las diferencias de contribución debida a los indígenas mexicanos y los europeos [75]. Así este estudio se interesa en conocer si los polimorfismos analizados forman parte del fondo diabetogénico del mexicano heredado de los indígenas. En este contexto, se estudió la presencia de las



Martínez Baltazar Ana Lilia

variantes polimórficas R133W y A45T, y de la mutación T130I de los genes *PAX4*, *NeuroD1* y *HNF-4A*, respectivamente, en dos poblaciones indígenas mexicanas muy importantes la Cora y la Maya. Los genes que estudiamos codifican para los factores de transcripción implicados en el desarrollo y funcionamiento de las células  $\beta$  pancreáticas, que han mostrado en diferentes poblaciones asociación con el desarrollo de la DM tipo 2 [40].

Durante el periodo pre-hispánico, los grupos étnicos vivían en el centro y sur de México. Los esclavos africanos fueron traídos a esta región después de una notable reducción de la población nativa, debido a epidemias, entre 1545 y 1548. El mestizaje fue afectado por diversos factores como las condiciones demográficas, dando una heterogeneidad genética entre e intra subpoblaciones de diferentes regiones a través de todo el país [75], es por esto que no basta con estudiar una sola población indígena, y lo que también sugiere que no podemos comparar a las etnias entre ellas.

Las poblaciones en estudio tienen una salud precaria en comparación con la población mestiza, su esperanza de vida es diferente debido a las diferentes condiciones de vida, el abuso de alcohol, la deficiente alimentación, la falta o mala atención de salud que reciben, etc. En los últimos años la frecuencia de diabetes en comunidades indígenas ha aumentado, consecuencia de la falta de información que tienen sobre la prevención de la enfermedad [78]. El aumento en los casos de diabetes en estas comunidades es otro de los hechos que nos hacen pensar en la existencia del fondo diabetogénico heredado al mestizo mexicano, los indígenas poseen genes que les permiten estar en un estado de salud sano bajo una alimentación con aporte calórico bajo, se ha observado que al migrar a las ciudades desarrollan la diabetes, por el cambio en el estilo de vida, y sobre todo por la modificación que sufre su dieta [78, 79].

La selección de individuos se llevó a cabo con el propósito de coleccionar muestras representativas de cada población, todos tenían que ser mayor de edad, el género, y su historial médico no fueron requisitos, cabe notar la participación mayoritaria de las mujeres. En lo referente al estado de salud de los individuos, los casos detectados con diabetes la mayoría se hizo al estar procesando ya las muestras, de los casos encontrados únicamente uno es del sexo masculino, se observó mayor participación de las mujeres, lo que puede



deberse a que el hombre se va a trabajar desde temprano al campo, o migran a las ciudades en busca de un mejor trabajo.

Las medidas antropométricas recopiladas en la tabla 2 del IMC indican una condición de sobrepeso; el ICC revela una obesidad intra-abdominal al no estar dentro del rango normal establecido por la OMS para ambas etnias.

Por otra parte, de acuerdo a un estudio realizado por Long y cols., no hay ninguna justificación del uso generalizado del IMC, ya que encontraron que la transformación matemática correcta para describir la relación entre la altura y el peso no es la misma en todas las poblaciones, es decir, usar el IMC frecuentemente no resulta en una medida independiente de la altura. El estudio sugiere que el IMC como un índice puede ser de alguna manera alterado por proporciones que difieren en la longitud de las piernas con la altura en poblaciones diferentes genéticamente [76], desde este punto y sabiendo que las etnias Maya y Cora no fueron incluidas para determinar los parámetros de IMC e ICC, sería adecuado que México tuviera sus propios estándares de IMC e ICC para el mestizo y para el indígena, para poder evaluar de una manera correcta el estado de sobrepeso u obesidad de las personas.

En la etnia Cora y Maya es raro que presenten sobrepeso u obesidad porque los problemas de nutrición de la población tienen que ver fundamentalmente con los efectos de un bajo nivel de consumo de alimentos para enfrentar una gran cantidad de actividad física como el trabajo agrícola, la recolección de leña o el acarreo de agua, lo cual se traduce a desnutrición.

Las características genéticas desempeñan un papel importante en las condiciones nutricias de la población indígena. Existe evidencia que sugiere que el aumento de alimentos industrializados entre la población indígena da como resultado un incremento de la obesidad y de los niveles de lípidos y glucosa en la sangre [77]. Valles y cols., en un estudio realizado con otomíes, encontraron altos niveles de triglicéridos en la sangre, sobre todo en los hombres que salen a trabajar fuera de las comunidades y cambian su forma de comer. Es posible que la baja presencia de DM anteriormente en las comunidades indígenas se deba a que la dieta indígena tenga un papel protector, lo cual no implica que esta dieta sea mejor, si no que los determinantes ambientales son más importantes que los genéticos en las



Martínez Baltazar Ana Lilia

condiciones de nutrición y salud de una población, lo cual es muy interesante, ya que esto indica que la prevención del desarrollo de la diabetes en el mestizo mexicano es posible. [13, 77].

Una manera de caracterizar el estado de salud a un nivel más profundo fue haciendo un perfil bioquímico de los sujetos en estudio. El perfil bioquímico de los pacientes a los que se les diagnosticó diabetes (datos no mostrados) no fueron homogéneos para cada individuo eran datos muy variables, los valores de la glucosa fueron mayores a los 200 mg/dL, así como también los valores de colesterol y lípidos, de no tratarse adecuadamente en un futuro se manifestaran las complicaciones provocadas por la diabetes.

Algunos miembros de los grupos de ambas etnias presentaron valores de glucosa elevados, fuera del rango de 70 a 100mg/dL, estos valores pueden deberse a que los individuos no se encontraban en ayunas.

Los valores de HDL en la población Cora fue menor a la recomendada, mientras que los valores de LDL fueron mayores en las dos poblaciones. Las alteraciones en el metabolismo de los lípidos pueden ser consecuencia del alto consumo de carbohidratos, que gracias a los cuestionarios (Apéndice) que se les realizó a los participantes de este estudio se pudo saber del elevado consumo de piloncillo. Otros factores que pueden influir son la obesidad, la falta de actividad física y el estrés.

Los valores de creatinina en los hombres mayas, están por arriba del rango normal, esto puede deberse a la variabilidad que existe debida a la talla y masa muscular de cada persona. Los niveles superiores pueden ser indicio de deshidratación o algún problema renal [69].

El estilo de vida que llevan las comunidades indígenas aún es diferente al de las ciudades, sin embargo, cada vez la influencia de la ciudad los alcanza más, por lo que su dieta ha sido poco a poco modificada. En un futuro su dieta se verá totalmente cambiada, la frecuencia de enfermedades metabólicas podría aumentar.

La proteína HNF-4A es un factor de transcripción de la familia de los receptores hormonales esteroideas. [70]. En el hígado, la proteína se requiere para realizar una gluconeogénesis hepática normal, mientras que en las células  $\beta$  pancreáticas está involucrada en la regulación del metabolismo de glucosa, así como también en la expresión y



excreción de la insulina. La variante Thr130Ile está localizada en el dominio D, el cual está involucrado en la unión a DNA, localizado en la región box-A [5]. Esta variante fue reportada por primera vez en individuos norteamericanos no diabéticos con una frecuencia génica del 5% [6].

Zhu y cols., reportaron que la actividad transcripcional de T130I-*HNF-4A* no es deficiente comparado con la del tipo silvestre *HNF-4A* en las líneas celulares Hela y MIN6 (línea de células de insulinoma de ratón), pero la actividad sí es reducida en la línea HepG2 (línea celular de hepatoma humano) y en cultivo primario de hepatocitos de ratón en un 46.2% en promedio (27-78% del tipo silvestres) [6].

En animales knockout para el gen la concentración de HDK es dramáticamente reducido. La función hepática del gen probablemente es lo que afecta el metabolismo de los lípidos [6].

Este polimorfismo ha sido asociado con la aparición de diabetes en población japonesa y danesa con frecuencias alélicas del 4.7% y 1.75% respectivamente. [6].

Un estudio previo de Menjívar y colaboradores descubrió la mutación T130I del gen *HNF-4A*, en diabéticos mestizos mexicanos con una frecuencia del 16% [84]. Un estudio posterior del mismo grupo de investigadores halló una frecuencia de esta mutación del 7% y 11.4% en población no diabética Mazahua y Teenek respectivamente [15]. Estos datos indican que la mutación tiene un origen indígena y por eso la importancia de tratar de evaluarla en las 65 etnias que existen en el país.

La evaluación molecular de la mutación T130I del gen *HNF-4A* en población Cora y Maya arrojó una frecuencia genotípica del 28% y 25% respectivamente, ambas frecuencias son mayores a las reportadas por Menjívar y colaboradores en población mestiza mexicana [15]. Además, al comparar las frecuencias encontradas en las etnias contra la población mestiza se encontró que existe una diferencia significativa, y que el alelo de riesgo es el I (Tabla 9). Teniendo en cuenta que la mayor parte del mestizaje fue proporcionado entre indígenas y españoles, y que además estudios realizados en población española no reportan mutaciones en el gen de *HNF4A* [80,81]. Lo anterior en conjunto con las frecuencias y la diferencia significativa encontradas en este estudio confirman que la mutación T130I forma parte del fondo diabetogénico indígena y que ha sido heredado al mestizo mexicano.



Martínez Baltazar Ana Lilia

Es importante mencionar que en estas dos poblaciones se encontraron individuos homocigotos para esta mutación, y que el estado homocigoto se pudo predecir desde los cortes realizados por la enzima de restricción en el RFLP, por la digestión de todo el DNA, este hallazgo no había sido visto en estudios previos hechos por nuestro grupo. A pesar de que no existe diferencia significativa en los parámetros evaluados, lo que probablemente se deba a una muestra limitada de individuos. Se observó que los portadores de la mutación en forma homocigota tienen valores de colesterol y triglicéridos más elevados, niveles de HDL menor al límite normal, y LDL mayor al límite normal, el metabolismo de los lípidos está alterado esto puede explicarse con la baja actividad biológica hepática de la T130I previamente mencionada [6].

Además presentaron una menor concentración de insulina; las alteraciones en los datos bioquímicos y hormonal en los homocigotos al comparar con los heterocigotos se puede deber a que no existe el alelo normal para contra restar el efecto de la mutación, y es por lo mismo que en los portadores heterocigotos las variaciones no son notorias, en cuanto al bajo nivel de la insulina, puede deberse a una actividad secretora alterada [5].

La segunda variante polimórfica evaluada fue la R133W localizada en el exón 3 del gen *PAX4*, involucrado en la diferenciación y proliferación de la célula  $\beta$ . Ratones recién nacidos knock-out para *PAX4* tienen un tamaño y peso normal, pero carecen de células maduras productoras de insulina y somatostatina. Aún así, las células productoras de insulina pueden detectarse durante etapas tempranas del desarrollo embrionario (E10.5), pero los niveles de expresión de insulina disminuyen dramáticamente para E15.5 [48].

La variante polimórfica R133W se ubica entre el *paired domain* y el homeodominio, la variante R133W ocasiona una disminución aproximada del 37% de la función represora del Pax4, lo cual puede ser consecuencia de un deterioro en la especificidad de unión, o por una alteración en la interacción con otros factores transcripcionales [50].

La aparición de diabetes se manifiesta cada vez a edades más tempranas como consecuencia de un estilo de vida caracterizado por mala alimentación, sedentarismo, estrés, etc. La importante participación de la proteína Pax4 en la diferenciación y proliferación de las células  $\beta$ , hace necesario evaluar si la variante R133W de Pax4 forma parte del fondo



diabetogénico indígena mexicano, ya que puede ser un factor que otorgue susceptibilidad para el desarrollo de diabetes de inicio temprano. [50, 71].

La variante R133W fue reportada por primera vez en población africana, y fue asociada con el riesgo de padecer diabetes propensa a cetosis, caracterizada por una severa deficiencia de insulina [50].

Esta variante polimórfica únicamente se encontró en una persona de la población Cora. Representando un 2% de la población Cora.

Los datos antropométricos y bioquímicos de la persona portadora del polimorfismo R133W están representados en la tabla 7. Se trata de una mujer que de acuerdo al IMC estándar padece obesidad. Y tiene un nivel de HDL menor al óptimo.

Es importante observar que a pesar del IMC que indica obesidad los datos de glucosa, colesterol y triglicéridos están dentro de los rangos de referencia normales, lo cual apoya la idea de que el IMC estándar universal no es adecuada de usar en todas las poblaciones.

El nivel de insulina es mayor de  $20\mu\text{UI/mL}$ , sin sobrepasar el rango de referencia, sería interesante realizar un monitoreo del comportamiento de los niveles de la hormona para determinar si con el curso del tiempo la persona crea resistencia a la insulina. Por otra parte también puede pensarse que el nivel de insulina presentado es por la variante polimórfica R133W, que propició una diferenciación y proliferación menor de las células  $\beta$  pancreáticas, recordemos que *PAX4* realiza un papel importante en la diferenciación de las células epiteliales pancreáticas a células  $\beta$  y la proliferación de las mismas [47].

La casi nula presencia del polimorfismo R133W en estas dos etnias indica que probablemente este polimorfismo no es parte del fondo diabetogénico indígena del mestizo mexicano, de ser parte, las etnias Cora y Maya no son las responsables de haberlas transmitido, por lo cual es importante seguir realizando la evaluación de este polimorfismo en más etnias indígenas.

La tercera variante polimórfica evaluada fue la A45T del gen *NeuroD1*, se eligió esta variante debido a la asociación con diabetes reportada en poblaciones caucásicas y asiáticas (India, Japón) [40].



El gen *NeuroD1* en humano comprende dos exones, el exón 1 no se transcribe, y la región codificante de la proteína se ubica en el exón 2. *NeuroD1* ha sido mapeado a lo largo del brazo del cromosoma 2 (2q32) en humano.

Es sabido que hay un polimorfismo en el codón 45 del gen *NeuroD1* de una G→A, provocando la sustitución de Ala/Thr en el extremo amino terminal de la proteína [55]. La proteína NeuroD1 regula transcripcionalmente la expresión del gen de la insulina en las células  $\beta$  pancreáticas al formar un heterodímero con E47. Se ha demostrado que su nivel de expresión influyen la apoptosis de las células  $\beta$ . Ratones deficientes en NeuroD1 desarrollan diabetes severa, islotes anormales morfológicamente, presentan un número reducido de células  $\beta$  pancreáticas, desarrollan cetonuria y mueren después de 3-5 días de nacido [53]. NeuroD1 puede afectar la diferenciación o regeneración de las células beta [72].

Estudios de Hansen y colaboradores evaluaron la actividad biológica de Thr45 (117±36%) en la regulación sobre el promotor del gen de insulina humana y obtuvieron una actividad normal. Por lo que concluyeron que en términos de transcripción del gen de la insulina, la variante T45 probablemente representa una variante normal de NeuroD con ningún papel en la patogénesis de la diabetes tipo 1 y tipo 2 en población danesa [82].

La variante A45T fue encontrada en la población Cora en un 14%, siendo todos portadores heterocigotos. Por parte de la población Maya la frecuencia fue del 18%, siendo un 10% portadores heterocigotos y el 8% homocigotos.

Uno de los portadores homocigotos padece diabetes, se trata de una mujer, de 54 años, su perfil bioquímico y hormonal está por arriba de los límites recomendados, por lo es necesario una modificación en su estilo de vida, presenta un de insulina bajo, lo que puede ser debido a la variante A45T que afecta la expresión del gen de la insulina [52].

Las características antropométricas, bioquímicas y hormonales (tabla 8 y 8.1) de los portadores homocigotos y heterocigotos no tienen diferencia significativa entre ellos, donde se observan valores elevados puede deberse a la portación homocigota que como en el caso de la persona diabética antes mencionada, no se tiene al otro alelo para contra restar los efectos de la variación. O a la dieta que tienen los sujetos en estudio [51, 52].

De los portadores heterocigotos para la A45T, algunos resultaron portar la mutación T130I, todas son mujeres mayas, una presento peso normal, una sobrepeso y una obesidad;



además de obesidad intra-abdominal. Dos presentaron niveles muy elevados de colesterol y triglicéridos (tabla 10). Ninguna padece diabetes, sin embargo, únicamente una es mayor de 60 años. El resto son menores de 45 años, por lo que podrían desarrollar la diabetes en un futuro.

Con los resultados obtenidos podemos decir que la población indígena Cora y Maya presentan frecuencias altas para la mutación T130I y la variante polimórfica A45T, no así para la R133W. La presencia de esas variantes combinadas con una mala dieta, sedentarismo y otros factores ambientales podrían provocar que la frecuencia de diabéticos en ambas poblaciones indígenas aumente considerablemente, a pesar de que en los últimos años la prevalencia de la diabetes en comunidades indígenas si ha incrementado poco, el incremento anual sigue siendo por mucho más considerable en las zonas urbanas, y en gente mestiza. Por otra parte, el indígena al migrar a las ciudades, cambia su estilo de vida, de alimentación y al interactuar con su genética, en poco tiempo desarrollan la diabetes. [77, 78, 79].

Lo que nos lleva a concluir que las frecuencias halladas de la T30I y de la A45T en este estudio indican que estos polimorfismos forman parte de la genética indígena, la cual a través del mestizaje fue heredado al mestizo mexicano, haciéndolo más susceptible al desarrollo de la diabetes, que en conjunto con los factores ambientales ha desatado el incremento del desarrollo de la diabetes desde edades más tempranas.

Al no haber encontrado mutaciones del gen *HNF4A* en población española [80, 81], y que las frecuencias encontradas de la T130I en el mundo son mucho menores a las encontradas en México, esta variante heredada al mestizo mexicano tiene su origen en los indígenas mexicanos.

El mestizo mexicano, al haber heredado en su genética en un 75% del indígena, posee los polimorfismos que al interactuar con los factores ambientales como la alimentación, el sedentarismo y el estrés tiene como consecuencia el desarrollo de la diabetes.



## X. Conclusiones

- Las frecuencias encontradas de la mutación T130I del gen *HNF4A* y de la variante polimórfica A45T del gen *NeuroD1* en población Cora y Maya son las más altas reportadas en la actualidad, indicando que forman parte del fondo diabetogénico indígena que el mestizo mexicano a heredado.
- La variante polimórfica R133W del gen *PAX4* se encontró en una frecuencia muy baja, por lo que probablemente esta variante polimórfica no forme parte del fondo diabetogénico mexicano heredado del indígena mexicano.

### Perspectivas

Realizar estudios moleculares de estos polimorfismos y otros más en más etnias para conocer mejor aún el fondo diabetogénico que los mestizos mexicanos hemos heredado con el tiempo, y así poder tratar la diabetes de acuerdo a la genética de la diabetes mexicana.



## Apéndice



HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO  
DIVISION DE INVESTIGACION  
LABORATORIO DE ENDOCRINOLOGIA MOLECULAR

CARTA CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN LA INVESTIGACIÓN:

*“ESTUDIO DE VARIANTES POLIMORFICAS DE LOS GENES HNF4A Y SLC30A8 COMO POSIBLES FACTORES DE RIESGO PARA DESARROLLAR DIABETES TIPO 2 EN POBLACIÓN MESTIZA E INDÍGENA MEXICANA”*

México, a \_\_\_\_\_

A quien corresponda:

El (la) que suscribe \_\_\_\_\_

De \_\_\_\_\_ años, acepto participar en forma libre y voluntaria, donando una muestra de sangre que será utilizada en el proyecto *“ESTUDIO DE VARIANTES POLIMORFICAS DE LOS GENES HNF4A Y SLC30A8 COMO POSIBLES FACTORES DE RIESGO PARA DESARROLLAR DIABETES TIPO 2 EN POBLACIÓN MESTIZA E INDÍGENA MEXICANA”*, cuyo objetivo es identificar los probables genes de susceptibilidad para diabetes mellitus no insulina dependientes, en población mexicana, que se lleva a cabo como parte de un convenio entre el Hospital Juárez de México y la Facultad de Química de la UNAM.

Se me ha informado de la importancia del estudio, así como de los objetivos del mismo y de la forma en que se tomará la muestra de sangre. Dándome la oportunidad para hacer preguntas libremente y estando satisfecho (a) de la información y respuestas recibidas acepto participar en él.

Firma del participante \_\_\_\_\_

Dirección \_\_\_\_\_

Firma del Investigador \_\_\_\_\_

Testigo 1 \_\_\_\_\_

Testigo 2 \_\_\_\_\_



**“ESTUDIO DE VARIANTES POLIMORFICAS DE LOS GENES HNF4A Y SLC30A8 COMO POSIBLES FACTORES DE RIESGO PARA DESARROLLAR DIABETES TIPO 2 EN POBLACION MESTIZA E INDIGENA MEXICANA”**

Cuestionario general

**Datos personales:**

Nombre: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_  
Ocupación: \_\_\_\_\_ Estado Civil: \_\_\_\_\_  
Sexo: \_\_\_\_\_ Dirección \_\_\_\_\_  
Escolaridad: \_\_\_\_\_ Origen étnico \_\_\_\_\_

**Datos antropométricos:**

Peso: \_\_\_\_\_ kg Talla \_\_\_\_\_ m IMC \_\_\_\_\_  
Cintura \_\_\_\_\_ cm Cadera \_\_\_\_\_ cm ICC \_\_\_\_\_  
Tensión arterial \_\_\_\_\_  
Destrostix \_\_\_\_\_

**Enfermedades:**

Diabetes \_\_\_\_\_ Hipertensión \_\_\_\_\_ Hiperlipidemia \_\_\_\_\_  
Otra \_\_\_\_\_

**Antecedentes heredofamiliares:**

¿Tiene o tuvo algún familiar directo con diabetes mellitus? \_\_\_\_\_

**Observaciones**

Ingiere alcohol: \_\_\_\_\_ poco \_\_\_\_\_ moderadamente \_\_\_\_\_ frecuentemente \_\_\_\_\_  
Toma refresco: \_\_\_\_\_ poco \_\_\_\_\_ moderadamente \_\_\_\_\_ frecuentemente \_\_\_\_\_  
Fuma: \_\_\_\_\_ poco \_\_\_\_\_ moderadamente \_\_\_\_\_ frecuentemente \_\_\_\_\_  
Jugos/fruta fresca: \_\_\_\_\_ poco \_\_\_\_\_ moderadamente \_\_\_\_\_ frecuentemente: \_\_\_\_\_  
Café/té/atole: \_\_\_\_\_ poco \_\_\_\_\_ moderadamente \_\_\_\_\_ frecuentemente \_\_\_\_\_  
Pan/Tortillas/ Pan Dulce: \_\_\_\_\_ poco \_\_\_\_\_ moderadamente \_\_\_\_\_ frecuentemente \_\_\_\_\_  
Huevos/frijoles/Carne: \_\_\_\_\_ poco \_\_\_\_\_ moderadamente \_\_\_\_\_ frecuentemente \_\_\_\_\_  
Verduras de hoja verde/zanahorias/chayotes/Papas: \_\_\_\_\_ poco \_\_\_\_\_ moderadamente \_\_\_\_\_ frecuentemente \_\_\_\_\_  
Realiza algún ejercicio: \_\_\_\_\_ ¿Cual? \_\_\_\_\_



## Bibliografía

- [1] Brink Christopher, Chowdhury Kamal, Gruss Meter. ***Pax 4* regulatory elements mediate beta cell specific expresión in the páncreas**. *Mechanisms of Development* 100 (2001) 37-43.
- [2] Pickup JC and Williams G, editors, **Textbook of diabetes**. 3<sup>rd</sup> Ed, USA: Blackwell Science Ltd 2003.
- [3] Keen H, Ng Tang Fui S. **The definition and classification of diabetes mellitus**. *Clinical Endocrinology Metabolism* 1982; 11:279-305.
- [4] Kanatsuka A, Yoshiharu Tokuyama, Nozaki O, et al.  **$\beta$ -Cell Dysfunction in Late-Onset Diabetic Subjects Carrying Homozygous Mutation in Transcription Factors NeuroD1 and Pax4**. *Metabolism* 51(9): 1161-1165. 2002.
- [5] Ek J, Schack R. C, Packert J. D, Glümer C, et al. **The Functional Thr130Ile and Val25Met Polymorphisms of the Hepatocyte Nuclear Factor-4 $\alpha$  (HNF4A): Gene Associations with Type 2 Diabetes or Altered  $\beta$ -Cell Function among Danes**. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90(5):3054-3059.
- [6] Zhu Q, Yamagata K, Miura A, Shihara N, et al. **T130I mutation in HNF-4 $\alpha$  gene is a loss-of-function mutation in hepatocytes and is associated with late-onset Type 2 diabetes mellitus in Japanese subjects**. *Diabetología* 2003; 46: 567-573.
- [7] Ortíz G, Montúfar I, Menjívar M. **Evaluación Molecular del Gen Pax-4 en pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2 de Inicio Temprano**. 2º Congreso Nacional de Química Médica. Consultado el 19 de noviembre de 2008. Disponible en:  
[http://www.inmegen.gob.mx/mambo/images/stories/publicaciones/pdf/memorias\\_congreso.pdf](http://www.inmegen.gob.mx/mambo/images/stories/publicaciones/pdf/memorias_congreso.pdf)
- [8] Mauvais F, Smith S, Le May C, Leal Suzanne, et al. **PAX4 gene variations predispose to ketosis-prone diabetes**. *Human Molecular Genetics* 2004; 13(24): 3151-3159.
- [9] Kristinsson S, Thorolfsdottir E, Talseth B, et al. **MODY in Iceland is associated with mutations in HNF-1 $\alpha$  and a novel mutation in NeuroD1**. *Diabetologia*. 2001. 44(11): 2098-2103.



Martínez Baltazar Ana Lilia

- [10] Vella A, Howson J, Barratt B, Twells R, et al. **Lack of Association of the Ala<sup>45</sup>Thr Polymorphism and Other Common Variants of the *NeuroD* Gene With Type 1 Diabetes.** Diabetes 2004; 53: 1158-1161.
- [11] Wilson Ruíz Marx. **Polimorfismos del gen CYP2D6: pequeños cambios, grandes consecuencias.** Farmacogenética (revisiones bibliográficas). 3(18) 2008. [Artículo en línea (consultado el 12 de enero de 2009): [http://www.infarmate.org/pdfs/marzo\\_abril08/polimorfismo\\_gen18.pdf](http://www.infarmate.org/pdfs/marzo_abril08/polimorfismo_gen18.pdf)]
- [12] Marju Orho-Melander. **El síndrome metabólico: estilo de vida, genética y origen étnico.** Diabetes Voice 2006; 51: 21-24.
- [13] Osuna C, Milian F, Valles V. **Prevalencia de diabetes mellitus e hiperlipidemias en indígenas otomíes.** Salud Pública de México. 43(5): 459-463.
- [14] World Health Organization. **World Health Organization prevalence statistics.** Disponible en: <http://www.who.int/ncd/dia/databases.htm>
- [15] Granados Ma., Ortiz G, Menjívar M. **Evaluación de la Frecuencia de la Mutación T130I del Gen *HNF4-α* en dos Grupos Indígenas Mexicanos.** [Consultado 19 de noviembre de 2008] Disponible en: [http://www.inmegem.gob.mx/mambo/images/stories/publicaciones/pdf/memorias\\_congreso.pdf](http://www.inmegem.gob.mx/mambo/images/stories/publicaciones/pdf/memorias_congreso.pdf)
- [16] Godoy Alberto. **Epidemiología de la diabetes y sus complicaciones no coronarias.** Revista Española de Cardiología 2002; 55(6): 657-70.
- [17] Arredondo, A., Zúñiga, A. **Economic consequences of epidemiological changes in diabetes in middle-income countries: the Mexican case.** Diabetes Care 2004; 27, 104-109.
- [18] Hurtado, J., Salas, M. **Prevalencia de Diabetes Mellitus en Población Náhuatl.** 2° Congreso Nacional de Química Médica. . [Consultado el 19 de noviembre de 2008] Disponible en: [http://www.inmegem.gob.mx/mambo/images/stories/publicaciones/pdf/memorias\\_congreso.pdf](http://www.inmegem.gob.mx/mambo/images/stories/publicaciones/pdf/memorias_congreso.pdf)



Martínez Baltazar Ana Lilia

- [19] Jáuregui Jesús. **Coras. Pueblos Indígenas del México Contemporáneo.** Comisión Nacional Para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas. PNUD. 2004. [Consultado el 6 de enero de 2009] Artículo disponible en línea en: <http://www.cdi.gob.mx>
- [20] Humberto Ruz Mario. **Mayas. Primera Parte. Pueblos Indígenas del México Contemporáneo.** Comisión Nacional Para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas. PNUD. 2004. [Consultado el 6 de enero de 2009] Artículo disponible en línea en: <http://www.cdi.gob.mx>
- [21][[http://www.healthsystem.virginia.edu/uvahealth/adult\\_liver\\_sp/pancreas.cfm](http://www.healthsystem.virginia.edu/uvahealth/adult_liver_sp/pancreas.cfm)] [Consultado el 2 de febrero 2009].
- [22] Jara Albarran, Antonio.2003. Endocrinología. España, Ed. Panamericana. España. Págs. 439-489.
- [23][<http://www.britannica.com/EBchecked/topic-art/186893/101913/The-islets-of-Langerhans-are-responsible-for-the-endocrine-function>] [Consultado el 13 de enero 2009].
- [24] Yu Run, Melmed Shlomo. **Insulin Secretion and Action.** Endocrinology: Basic and Clinical Principles. 2<sup>nd</sup> Edition. Capítulo 20. 311-319.
- [25] Baileys E., Guest P., and Hutton J., **Insulin synthesis.** Molecular biology to pathology. Oxford New York Tokyo. pp 64.
- [26] Seino Susumu and Bell Graeme. **Pancreatic Beta Cell in Health and Disease.** Capítulo 2 (Arner Isabella and Stein Roland. **Transcriptional Regulation of Insulin Gene Expression**). 13-30.
- [27] [<http://www.betacell.org/content/briefs/index.php?id=40>] [Consultado el 25 de enero 2009]
- [28] Arderiu, M J., Castiñeiras L and Queralto C. **Bioquímica Clínica y Patología Molecular.** 2da Edición. Ed. Reverté. 1999. 655-657.
- [29][Consultado el 25 de enero 2009]. [[http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Obenrader/insulin\\_webpage.htm](http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Obenrader/insulin_webpage.htm)]
- [30] Horenstein R, Shuldiner, A. **Genetics of diabetics.** Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders 2004; 5: 25-36.



- [31] Qi Lu. **Genetic effects, gene-lifestyle interactions, and type 2 diabetes.** Central European Journal of Medicine. 2008; 3(1): 1-7.
- [32] American Diabetes Association. **Diagnosis and classification of diabetes mellitus.** Diabetes Care 2006; 29: S43-S48.
- [33] Sánchez L, Fanghänel G, Márquez M, et al. **Actualización en los diferentes subtipos de diabetes tipo “MODY”.** Revista de Endocrinología y Nutrición 2001; 9(1): 5-11.
- [34] Lowe L. William. **Diabetes Mellitus.** Endocrinology (Section IV). pág. 308-318.
- [35] Kaput J, Dawson K. **Complexity of type 2 diabetes mellitus data sets emerging from nutrigenomic research: A case for dimensionality reduction?.** Mutation Research 2007; 622: 19-32.
- [36] Winter P, Hickey G, Fletcher H. **Genetics.** Bios Scientific Publishers. 2<sup>nd</sup> edition. 2002. 57-60.
- [37] Ferrer J. **Diabetes autosómica dominante y defectos genéticos de reguladores transcripcionales.** Cardiovascular Risk Factors 2004; 13(4): 209-218.
- [38] [<http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch4F.htm>][Consultado el 7 de febrero 2009]
- [39] Servitja J, Ferrer J. **Transcriptional networks controlling pancreatic development and beta cell function.** Diabetología 2004; 47: 597-613.
- [40] Chakrabarti S, Mirmira R. **Transcription factors direct the development and function of pancreatic  $\beta$  cells.** Trends in Endocrinology and Metabolism 2003; 14(2): 78-84.
- [41] Tusié Luna María Teresa. **Genes and Type 2 Diabetes Mellitus.** Archives of Medical Research 2005; 36: 210-222.
- [42] Huang J, Levitsky L, Rhoads D. **Novel P2 promoter-derived HNF-4  $\alpha$  isoforms with different N-terminus generated by alternate exon insertion.** Experimental Cell Research 2009; 080 34: 1-12.
- [43] Navas A, Muñoz E, Kim J, et al. **Functional Characterization of the MODY1 Gene Mutations HNF4(R127W, HNF4(V255M), and HNF4(E276Q).** Diabetes (1999) 48: 1459-1465.
- [44] Gagnoli C, Menzinger G, Habener J. **Triple Genetic Variation in the HNF-4 $\alpha$  Gene is Associated with Early-Onset Type 2 Diabetes Mellitus in a Philippino Family.** Metabolism 2004; 53(8): pp 959-963.



- [45] Gupta R, Kaestner K. **HNF-4 $\alpha$ : from MODY to late-onset type 2 diabetes.** Trends in Molecular Medicine 2004; 10(11): 521-524.
- [46] Mitchel S, Gloyn A, Owen K, et al. **The role of the HNF4A enhancer in type 2 diabetes variants of the HNF4A enhancer are not common cause of susceptibility to type 2 diabetes.** Molecular Genetics and Metabolism 2002; 76: 148-151.
- [47] Kanno R, Ogihara T, Igarashi Y, et al. **Activin A-induced expression of PAX4 in AR42J-B13 cells involves the increase in transactivation of E47/E12.** Biochimica et Biophysica Acta. 2006; 1759: 44-50.
- [48] Dohrmann C, Gruss P, Lamiere L. **Pax genes and the differentiation of hormone-producing endocrine cells in the pancreas.** Mechanisms of Development. 2000; 92: 47-54.
- [49] Hermann R, Mantere J, Lipponen K, et al. **Lack of Association of PAX4 Gene With Type 1 Diabetes in the Finnish and Hungarian Populations.** Diabetes. 2005; 54: 2816-2819.
- [50] Mauvais FJ, Smith S, Le May C, et al. **PAX4 gene variations predispose to ketosis-prone diabetes.** Human Molecular Genetics. 2004 ; 13(24) : 3151-3159.
- [51] Miyachi T, Maruyama H, Kitamura T, et al. **Structure and regulation of the human NeuroD (BETA2/BHF1) gene.** Molecular Brain Research. 1999; 69: 223-231.
- [52] Malecki M, Cyganek K, Klupa T, Sieradzki J. **The Ala45Thr polymorphism of Beta2/NeuroD1 gene and susceptibility to type 2 diabetes mellitus in a Polish population.** Acta Diabetol 2003 ; 40 : 109-111.
- [53] Liu L, Jia W, Zheng T et al. **Ala45Thr variation in NeuroD1 gene is associated with early-onset type 2 diabetes with or without diabetic pedigree in Chinese.** Molecular and Cellular Biochemistry 2006; 290: 199-204.
- [54] Malecki M, Jhala U, Antonellis A, et al. **Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus.** Nature Genetics. 1999; 23: 323-328.
- [55] Boraska V, Terzic J, et al. **NeuroD1 Gene and Interleukin-18 Gene Polymorphisms in Type 1 Diabetes in Dalmatian Population of Southern Croatia.** Croat Medical Journal. 2006: 47: 571-578.
- [56] Dra. Hernández García. **Rituales y Género entre las mujeres mayas de Campeche.** Coordinación de Publicaciones Digitales. DGSCA-UNAM. 2008; 9(7). ISSN: 1067-6079.



- [57] [[http://www.cdi.gob.mx/mapas/mapa\\_nacional\\_lenguas\\_2000.jpg](http://www.cdi.gob.mx/mapas/mapa_nacional_lenguas_2000.jpg)] Consultado el 14 de febrero 2009.
- [58] [<http://pacificosur.ciesas.edu.mx/anexos/mapas/atlas/cora.gif>] Consultado el 14 de febrero de 209.
- [59] [<http://pacificosur.ciesas.edu.mx/anexos/mapas/atlas/maya.gif>] Consultado el 14 de febrero de 2009.
- [60] [[http://www.fmdiabetes.org/v2/paginas/d\\_numeros.php](http://www.fmdiabetes.org/v2/paginas/d_numeros.php)] Consultado el 5 de marzo de 2009.
- [61] [<http://www.diabetes.org>] Consultado el 5 de marzo de 2009.
- [62] Lyssenko V, Almgren P, Anevski, Orho-Melander M, Sjögren M, Saloranta C, Tuomi T, Leif Groop, the Botnia Study Group. *Genetic Prediction of Future Type 2 Diabetes*. December 2005, 2:12; 345
- [63] *Portuese E and Orchard T: Mortality in Insulin-Dependent Diabetes. In Diabetes in America* (pp.221-232). Bethesda, MD: National Diabetes Data Group, NIH, 1995.
- [64] [[www.cdc.gov/diabetes/pubs/pdf/ndfs\\_2005.pdf](http://www.cdc.gov/diabetes/pubs/pdf/ndfs_2005.pdf) ]
- [65] [<http://saludymedicinas.com.mx/nota.asp?id=1413>]
- [66] [<http://www.findrxonline.com/articulos-medica/obesi-complic.html>]
- [67] [<http://www.diabetes.org/espanol/diabetes-tipo-2/hiperglucemia.jsp>]
- [68] [<http://www.vrp.com/articles.aspx?ProdID=art2217&zTYPE=2>]
- [69] [<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003475.htm>]
- [70] Gupta R., Kaestner K. ***HNF4A: from MODY to late-onset type 2 diabetes***. Trends in Molecular Medicine 2004. 10(11): 521-524.
- [71] Smith. S, Ee, H, Conners. J and German. M. **Paired-Homeodomain Transcription Factor Pax4 Acts as a Transcriptional Repressor in Early Pancreatic Development**. Molecular and Celular Biology. 1999. 19(12): 8272-8280.
- [72] Kavvoura F, Ioannidis J. ***Ala45Thr polymorphism of the NEUROD1 gene and diabetes susceptibility: a meta-analysis***. Human Genetics. 2005. 116: 192-199.
- [73] [<http://www.diabetes.co.uk/global-diabetes/index.html>]
- [74] García José. **Identidad Maya y Globalización**. Centro de Estudios Mayas, IIFL, UNAM.



- [75] Silva I, Hidalgo A, et al. **Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico.** PNAS Early Edition. 2008
- [76] Long AE, Prewitt TE, et al. **Weight-height relationships among eight populations of West African origin: the case against constant BMI standards.** International Journal of Obesity 1998. 22: 842-846.
- [77] Miriam Bertran Vilá. **Cambio alimentario e identidad de los indígenas mexicanos.** UNAM. 95-98. Consultado en línea en:  
<http://books.google.com/books?id=k7xxZZKZGrcC&pg=PA95&dq=indígena+obesidad&ei=w8A1SrDTNZTOkwSE7aiBBQ>
- [78] [http://news.bbc.co.uk/hi/spanish/science/newsid\\_6143000/6143036.stm](http://news.bbc.co.uk/hi/spanish/science/newsid_6143000/6143036.stm)
- [79] Jennie R., Robert S. **Diabetes as a Disease of Civilization. The Impact of Culture Change on Indigenous Peoples.** Mouton de gruyter. 5, 435-440.
- [80] Barrio R. C. Bellané-chantelot, et al. **Nine Novel Mutations in Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY) Candidate Genes in 22 Spanish Families.** Journal of Clinical Endocrinology Metabolic. 2002. 87(6): 2532-2539.
- [81] Costa A., Besco's M. et al. **Genetic and clinical characterization of maturity-onset diabetes of the Young in Spanish families.** European Journal of Endocrinology. 2000. 142: 380-386.
- [82] Hansen L., Jensen JN., Urioste S., et al. **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. 2000. 49: 876-878.
- [83] **Rendición de cuentas en salud 2007.** Gobierno Federal. [www.dged.salud.gob.mx](http://www.dged.salud.gob.mx)
- [84] Menjívar M., Granados S., et al. **High frequency of T130I mutation of HNF4A gene in Mexican patients with early-onset type 2 diabetes.** Clinical Genetics. 2008. 73 (2): 185-187.
- [85] Tavaré J. and Dickens M. **Changes in insulin-receptor tyrosine, serine and threonine phosphorylation as a result of substitution of tyrosine-1162 with phenylalanine.** Biochemistry Journal. 1991. 274: 173-179.