



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

**Evaluación molecular de los genes *Nkx2.2*, *Nkx6.1* y *Kir6.2* en
pacientes diabéticos tipo 2**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
PRESENTA

QFB. María Helena García Rodríguez



**DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARTA A.
MENJÍVAR IRAHETA**

ABRIL 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Al Programa de Fomento a la Graduación

Al Hospital Juárez de México

ÍNDICE

LISTA	5
Abreviaturas	5
Figuras	7
Tablas	9
Gráficas	10
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	12
1. ANTECEDENTES	13
1.1 Definición	13
1.2 Clasificación	13
1.2.1 Diabetes tipo 1	13
1.2.2 Diabetes tipo 2	13
1.2.3 Diabetes gestacional	13
1.2.4 Otros tipos específicos	14
1.3 Factores de transcripción	15
1.4 <i>Nkx2.2</i> y diabetes	17
1.5 <i>Nkx6.1</i> y diabetes	20
1.6 <i>Kir6.2</i> y diabetes	21
1.6.1 Canales iónicos	21
1.6.2 Estructura y función fisiológica del canal K_{ATP} -sensible	23
1.6.3 Localización cromosómica	25
1.6.4 Enfermedades asociadas con el canal K_{ATP} -sensible	25
1.7 Ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	27
1.8 Fijación de voltaje con dos electrodos (TEVC)	28
2. HIPÓTESIS	31
3. OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVO GENERAL	31
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES	31
4. METODOLOGÍA	32
4.1 Muestras	32
4.1.1 Determinaciones bioquímicas	33
4.1.2 Determinaciones hormonales	34
4.1.3 Extracción de ADN	36
4.1.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	37
4.1.5 Análisis polimórfico conformacional de cadena simple (SSCP)	38
4.1.6 Secuenciación	39
4.2 Ensayo biológico	39

4.2.1	Biología molecular	39
4.2.2	Electrofisiología	43
4.3	Análisis estadístico	44
5.	RESULTADOS	46
5.1	Medidas antropométricas	46
5.2	Determinaciones bioquímicas	47
5.3	Determinaciones hormonales	48
5.4	Determinaciones moleculares	49
5.4.1	Evaluación de <i>Nkx2.2</i> y <i>Nkx6.1</i>	49
5.4.2	Evaluación de <i>Kir6.2</i>	51
5.4.2.1	E23K y DT2	53
5.4.2.2	I337V y DT2	57
5.4.2.3	L270V y DT2	59
5.4.2.4	R325C y DT2	60
5.4.3	Ensayo biológico	61
6.	DISCUSIÓN	68
7.	CONCLUSIONES	73
8.	APÉNDICE I	74
9.	APÉNDICE II	83
10.	APÉNDICE III	87
11.	BIBLIOGRAFÍA	89

LISTA

ABREVIATURAS

ADA	Asociación Americana de Diabetes
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADP	Adenosin-5'- difosfato
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ATP	Adenosin- 5'- Trifosfato
bHLH	<i>Basic helix-loop-helix</i> (Hélice-asa-hélice básica)
°C	Grados centígrados
CE	Colesterol estearasa
CHOD	Colesterol oxidasa
CPM	Cuentas por minuto
dATP	Deoxi adenosín trifosfato
dCTP	Deoxi citosín trifosfato
dGTP	Deoxi guanosín trifosfato
dTTP	Deoxi timidín trifosfato
DAP	Dihidroxiacetona fosfato
dd	Didestilada
dL	Decilitro
DT1	Diabetes tipo 1
DT2	Diabetes tipo 2
EDTA	Ácido Etilen-diamin-tetra-acético
ENEC	Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
g	Gravedades
GAD	Descarboxilasa del ácido glutámico
GK	Glicerol cinasa
Glut2	Transportador de glucosa 2
GOD	Glucosa oxidasa
GPO	Glicerol fosfato oxidasa
G3P	Glicerol- 3- fosfato
h	Hora
HLA	Antígeno leucocitario humano
HLH	<i>Helix-loop-helix</i> (Hélice-asa-hélice)
HNF-1 α	Factor nuclear del hepatocito-1 α
HNF-4 α	Factor nuclear del hepatocito-4 α
IA2	Gen de la tirosin fosfatasa 2
IA2 β	Gen de la tirosin fosfatasa 2 β
ICAs	Anticuerpos anti-células de islote
ICC	Índice cintura/cadera
IMC	Índice de masa corporal
K-ATP	Canal de potasio dependiente de ATP
kb	Kilobases
K _{Ca}	Canal de potasio activado por calcio

kg	Kilogramos
kHz	Kilo Hertz
Kir	Canal rectificador entrante de potasio
Kir6.2	Canal rectificador entrante de potasio 6.2
Kpb	Kilo pares de bases
K _v	Canal de potasio dependiente de voltaje
L	Litro
M	Molar
m ²	Metro cuadrado
MgADP	Magnesio Adenosín difosfato
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
ms	Milisegundos
mV	Milivoltios
MODY	<i>Maturity Onset Diabetes of the Young</i> (Diabetes del adulto en el joven)
MΩ	Mega ohms
μL	Microlitros
NBDs	Dominios de unión a nucleótidos
NBF	Factores de unión a nucleótidos
ng	Nanogramos
nL	Nanolitros
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
pg	Picogramos
PHHI	Hipoglucemia hiperinsulinémica persistente de la infancia
PNDM	Diabetes mellitus neonatal permanente
POD	Peroxidasa
PP	Polipéptido pancreático
rpm	Revoluciones por minuto
SSCP	<i>Single strand conformational polymorphism</i> (Polimorfismo de conformación de cadena individual de ADN)
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
SUR	Receptor de sulfonilureas
TE	Tris / EDTA
TEVC	Fijación de voltaje con dos electrodos
TFIIIA	Factor de transcripción de la ARN polimerasa III
TNDM	Diabetes mellitus neonatal transitoria
U	Unidades
UI	Unidad internacional

FIGURAS

Antecedentes

- Figura 1.1 Modelo de desarrollo de la célula β . Ngn3 induce la expresión de Pax4, estas células también expresan Nkx2.2 y Nkx6.1 antes de la expresión de Islet1 y Pax6. Actividades paralelas de Pax4 y Nkx2.2 permiten la diferenciación hacia la célula β madura.
- Figura 1.2 Esquema de la cascada de factores de transcripción que promueven la formación de células β secretoras de insulina. En ratones *Nkx2.2*^{-/-} y *Pax4*^{-/-} no hay células positivas a insulina; sin embargo tienen otro tipo de células endocrinas que expresan la hormona grelina.
- Figura 1.3 Modelo de la actividad de Nkx2.2 en el desarrollo del páncreas.
- Figura 1.4 Vía de diferenciación de la célula β pancreática. La expresión de neurogenina 3 conlleva a la célula progenitora a su destino endocrino. Nkx2.2 permite que el progenitor progrese hacia un estado donde se expresa Nkx6.1, la ausencia de Nkx2.2 conlleva a fallo en la diferenciación hacia célula β . En ausencia de Nkx6.1 el progenitor no queda en un estado indiferenciado, sino que se pierde.
- Figura 1.5 El canal K_{ATP} es un hetero-octámero formado por 4 subunidades Kir6.2 formadoras de poro y 4 subunidades receptoras de sulfonilureas-regulatorias. Kir6.2 se conforma por dos dominios transmembranales unidos por un bucle poro. SUR1 contiene múltiples dominios transmembranales y dos dominios de unión a nucleótidos citosólicos (NBDs), cada uno de los cuales contiene motivos andadores (Walker A y B), involucrados en la activación del canal por la unión de MgADP.
- Figura 1.6 Esquema de la célula β pancreática y la regulación de la secreción de insulina vía canal de potasio Kir6.2.
- Figura 1.7 Esquema que representa al canal K_{ATP} conformado por la subunidad Sur1 y Kir6.2. Se observa la posición relativa del polimorfismo E23K, próximo al N-terminal de la proteína.
- Figura 1.8 Esquema del poro formado por Kir6.2, muestra la localización de los polimorfismos E23K e I337V.
- Figura 1.9 Ovocito del período V ó VI.

Resultados

- Figura 5.1 Productos de PCR con [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP, de muestras de diabéticos de inicio temprano y tardío.
- Figura 5.2 Fotografía tipo de un gel de acrilamida al 5.4% sin glicerol / 200 v / 18 horas. Productos de PCR con ^{32}P del gen *nkx2.2*, exón 1 en diabéticos de inicio temprano.
- Figura 5.3 Productos de PCR de las muestras de diabéticos de inicio temprano y tardío.
- Figura 5.4 Electroferogramas del exón único del gen *Kir6.2*, analizados mediante el programa SeqScape v2.6. R = guanina y/ o adenina; G = guanina y A= adenina.
- Figura 5.5 Electroferogramas del exón único del gen *Kir6.2*, analizados mediante el programa SeqScape v2.6. S = citosina y/ o guanina; C= citosina y G = guanina.
- Figura 5.6 Electroferogramas del exón único del gen *Kir6.2*, analizados mediante el programa SeqScape v2.6. Y = citosina y/ o timina; C = citosina y T= timina.
- Figura 5.7 Electroferogramas del exón único del gen *Kir6.2*, analizados mediante el programa SeqScape v2.6. R = guanina y/ o adenina, G= guanina y A= adenina.
- Figura 5.8 Topología putativa de *Kir6.2*, muestra la localización de los polimorfismos identificados.
- Figura 5.9 Fotografía de gel de agarosa al 1.5%. Identificación de la clona con el fragmento *Kir6.2* de humano por digestión con la enzima *EcoRI*. Marcador de bases: X Φ 174 RF DNA I *Hae III*.
- Figura 5.10 Fotografía de gel de agarosa al 1.5%. Producto de la digestión de la construcción pGEM+*Kir6.2* de humano por digestión con la enzima *SpeI*. Marcador de pares de bases: X Φ 174 RF DNA I *Hae III* (izquierda) y 100 pb (derecha).
- Figura 5.11 Protocolo para el ensayo electrofisiológico en canales de potasio rectificadores entrantes (*Kir6.2*).

TABLAS

Metodología

- Tabla 4.1 Oligonucleótidos para los genes *Nkx2.2*, *Nkx6.1* y *Kir6.2*
- Tabla 4.2 Reacciones de ligación en pGEM-T Easy Vector

Resultados

- Tabla 5.1 Características antropométricas
- Tabla 5.2 Parámetros bioquímicos
- Tabla 5.3 Parámetros hormonales
- Tabla 5.4 Frecuencia genotípica de la variante Kir6.2-E23K
- Tabla 5.5 Frecuencias genotípicas de E23K en diferentes poblaciones
- Tabla 5.6 Asociación del genotipo K/K con parámetros clínicos
- Tabla 5.7 Asociación del genotipo K/K con parámetros clínicos
- Tabla 5.8 Asociación del genotipo K/K con parámetros clínicos
- Tabla 5.9 Asociación del genotipo K/K con parámetros clínicos
- Tabla 5.10 Frecuencia genotípica de la variante Kir6.2-I337V
- Tabla 5.11 Frecuencias genotípicas de I337V en diferentes poblaciones
- Tabla 5.12 Asociación del genotipo V/V con parámetros clínicos
- Tabla 5.13 Asociación del genotipo V/V con parámetros clínicos
- Tabla 5.14 Asociación del genotipo V/V con parámetros clínicos
- Tabla 5.15 Asociación del genotipo V/V con parámetros clínicos
- Tabla 5.16 Frecuencias genotípicas de I337V en diferentes poblaciones
- Tabla 5.17 Muestras para la clonación en ovocito de *X. laevis*

GRÁFICAS

Resultados

- Gráfico 5.1 Corrientes endógenas. Trazos $I_f(t)$ a diferentes pulsos de potencial. Registro de las corrientes generadas por ovocitos nativos inyectados con H_2O y sin inyectar.
- Gráfico 5.2 Expresión de ARNm de Kir6.2. Trazos $I_f(t)$ a diferentes pulsos de potencial. Registro de las corrientes generadas por ovocitos inyectados con ARNm Kir6.2 silvestre.
- Gráfico 5.3 Expresión de ARNm de Kir6.2. Trazos $I_f(t)$ a diferentes pulsos de potencial. Registro de las corrientes generadas por ovocitos inyectados con ARNm Kir6.2 mutante.
- Gráfico 5.4 Corrientes de ovocitos de *Xenopus laevis* al pulso de -120 mV y 40 ms. Control: ovocito con y sin inyección de agua; Silvestre: ovocito inyectado con ARNm sin polimorfismos y Mutante: ovocito inyectado con ARNm-K23K-R325C-V337V.
- Gráfico 5.5 Corriente *versus* Potencial (I vs E). Muestra el comportamiento de los canales silvestre y mutante al tiempo de 40 ms y al pulso de -120 mV. Control: ovocito con y sin inyección de agua; Silvestre: ovocito inyectado con ARNm sin polimorfismos y Mutante: ovocito inyectado con ARNm-K23K-R325C-V337V.

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus es la enfermedad endocrina más común en México, específicamente la diabetes tipo 2 cuya patogénesis aún es desconocida; sin embargo, se considera que es el resultado de la combinación de factores genéticos, nutricionales y ambientales.

La participación de factores genéticos en la diabetes tipo 2 es indudable. A juzgar por las marcadas diferencias raciales y étnicas en su prevalencia, por la asociación entre prevalencia y mezclas genéticas híbridas, por el alto grado de concordancia en gemelos homocigóticos y por la evidente distribución familiar de la enfermedad. La búsqueda de genes específicos para la diabetes tipo 2 reproduce la controversia en torno a cuál es el trastorno inicial que participa en la patogenia de la enfermedad, en la que predominan dos corrientes: defectos en la síntesis y secreción de insulina y defectos en su acción a nivel celular. Quienes proponen que el problema inicial es la resistencia a la insulina en las células, se encaminan a la búsqueda de factores genéticos en relación con este defecto, mientras otros investigan los argumentos genéticos de la secreción pancreática deficiente.

Así, se han propuesto tres estrategias para identificar genes responsables de la diabetes tipo 2: clonación posicional, expresión diferencial de genes y genes candidatos.

- 1.- Clonación posicional: permite encontrar y mapear genes en una región cromosómica particular sin conocer previamente el producto del gen, esto se hace con ayuda de marcadores moleculares y bibliotecas de ADN.
- 2.- Expresión diferencial de genes: busca identificar genes que se expresan o dejan de expresarse en condiciones distintas: sujetos sanos y enfermos, o enfermos controlados y sin control.
- 3.- Genes candidatos: analiza la frecuencia de polimorfismos en diversos genes que codifican para proteínas involucradas en la regulación de la glucosa, y se compara en grupos de personas sanas y diabéticas.

En este contexto, el objetivo de la tesis es realizar la búsqueda de polimorfismos de secuencia en los genes candidatos *Nkx2.2*, *Nkx6.1* y *Kir6.2* a través de su secuenciación, en 50 individuos con diabetes tipo 2 de inicio temprano y 50 individuos de inicio tardío, que sirvan como marcadores de la población mexicana.

RESUMEN

Antecedentes: La diabetes tipo 2 (DT2) es la enfermedad endócrina más común en México, con una prevalencia de 12.9%. En este estudio se evaluaron los genes *Nkx2.2*, *Nkx6.1*, los cuales codifican para factores de transcripción del tipo homeodominio y *Kir6.2*, que codifica para el canal de potasio ATP-sensible. Estos genes son importantes para el desarrollo y función del páncreas, respectivamente. Las variantes E23K e I337V en *Kir6.2* se han asociado con DT2 en poblaciones asiáticas y caucásicas. Sin embargo, su relación con la susceptibilidad de DT2 en población mexicana ha sido poco estudiada.

Hipótesis: Dado que los genes *Nkx2.2*, *Nkx6.1* y *Kir6.2* participan en el desarrollo y función de las células pancreáticas, se espera que algunas de sus variantes polimórficas se asocien con la diabetes tipo 2.

Objetivo: Determinar la presencia de polimorfismos en los genes *Nkx2.2*, *Nkx6.1* y *Kir6.2* en pacientes diabéticos tipo 2 de inicio temprano y de inicio tardío.

Metodología: Se evaluaron 100 alelos de DT2 de inicio temprano (<35 años), 100 alelos de DT2 de inicio tardío (> 40 años) y 100 alelos de controles no diabéticos (> 60 años) para cada uno de los genes. Los pacientes fueron reclutados en el Hospital Juárez de México. Todos los participantes fueron de origen mexicano en al menos tres generaciones y firmaron una carta de consentimiento. El proyecto fue aprobado por el Comité Ético Institucional. Los alelos para cada gen se amplificaron por PCR y se secuenciaron por PCR-secuenciación directa. Los parámetros de laboratorio clínico se midieron por técnicas estandarizadas. Para evaluar el efecto de los SNPs E23K, R325C e I337V sobre la actividad biológica del canal K_{ATP} sensible, se utilizó la técnica de Fijación de voltaje con dos microelectrodos (TEVC). El análisis estadístico fue realizado con el paquete estadístico SPSS.

Resultados: En el gen *Kir6.2* se detectaron 4 cambios de sentido erróneo E23K, L270V, R325C e I337V. De manera interesante, las variantes E23K e I337V en su forma homocigota para el alelo menor, presentaron asociación con DT2, principalmente en el grupo de DT2 de inicio temprano (OR = 1.917 (1.049-3.503) $p = 0.003$ y OR = 2.054 (1.092-3.804) $p = 0.024$, respectivamente). El ensayo biológico reveló que el canal mutante (K23K-R325C-V337V) tuvo mayor actividad que el canal silvestre (E23E-R325R-I337I; $p = 0.045$) y esto implica la pérdida de sensibilidad al ATP. No se encontraron polimorfismos en los genes *Nkx2.2*, *Nkx6.1*.

Conclusiones: Los hallazgos sugieren que las variantes E23K e I337V del gen *Kir6.2*, en su forma homocigota para el alelo menor, pueden ser sugeridas como factores de riesgo para el desarrollo de DT2 de inicio temprano en la población mexicana. Asimismo, la triada de las variantes K23K, R325C y V337V confiere mayor actividad al canal de potasio ATP-sensible, ya que disminuyen la afinidad por el ATP y, en consecuencia, en los pacientes diabéticos tipo 2 disminuye la secreción de insulina.

1. ANTECEDENTES

1.1 DEFINICIÓN

La *diabetes mellitus* es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia, consecuencia de defectos en la secreción y/o en la acción de la insulina. La hiperglucemia crónica se asocia a largo plazo con daño, disfunción e insuficiencia de varios órganos especialmente ojos, riñones, corazón, cordón neural y vasos sanguíneos.

1.2 CLASIFICACIÓN

El comité de expertos de la Asociación Americana de Diabetes (ADA) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS), propusieron en el año 2000, la clasificación siguiente de la diabetes atendiendo a las causas de la enfermedad ^[1].

1.2.1 Diabetes tipo 1: se caracteriza por la destrucción de las células β pancreáticas, deficiencia absoluta de insulina (insulinodependientes) y tendencia a la cetoacidosis.

A. Diabetes mediada por mecanismos inmunológicos: Asociada a genes *HLA*, presenta anticuerpos anti-islotos (ICAs), anti-descarboxilasa del ácido glutámico (antiGADs) y anti-tirosin fosfatasa (IA2 e IA2 β).

B. Diabetes idiopática: Con el mismo comportamiento metabólico, pero sin presencia de anticuerpos ni asociación de genes *HLA*.

1.2.2 Diabetes tipo 2: se caracteriza por insulino-resistencia y deficiencia (no absoluta) de insulina. Los pacientes que padecen la enfermedad forman un grupo heterogéneo la mayoría obesos y/o con distribución de grasa predominantemente abdominal.

Presentan una fuerte predisposición genética no bien definida (multigénica), niveles de insulina plasmática normal o elevada, sin tendencias a la acidosis. Responden a dieta e hipoglucemiantes orales, aunque muchos con el tiempo requieren de insulina para su control.

1.2.3 Diabetes gestacional: caracterizada por hiperglucemia que aparece en el curso del embarazo y puede desaparecer al término de éste o persistir como intolerancia a la glucosa.

1.2.4 Otros tipos específicos

- A. Defectos genéticos de la función de la célula β**
 - 1. Cromosoma 12, HNF-1 α (antes MODY 3)
 - 2. Cromosoma 7, glucocinasa (antes MODY 2)
 - 3. Cromosoma 20, HNF-4 α (antes MODY 1)
 - 4. DNA mitocondrial
 - 5. Otras
- B. Defectos genéticos en la acción de la insulina**
 - 1. Resistencia insulínica tipo A
 - 2. Leprechaunismo
 - 3. Síndrome de Rabson-Mendenhall
 - 4. Diabetes lipoatrófica
 - 5. Otras
- C. Enfermedad del páncreas exócrino**
 - 1. Pancreatitis
 - 2. Traumatismo / pancreatocistomía
 - 3. Neoplasia
 - 4. Fibrosis quística
 - 5. Hemocromatosis
 - 6. Pancreatopatía fibrocalculosa
 - 7. Otras
- D. Endocrinopatías**
 - 1. Acromegalia
 - 2. Síndrome de Cushing
 - 3. Glucagonoma
 - 4. Feocromocitoma
 - 5. Hipertiroidismo
 - 6. Somatostatina
 - 7. Aldosteronoma
 - 8. Otras
- E. Sustancias químicas o fármacos capaces de inducir diabetes.**
 - 1. Vacor
 - 2. Pentamidina
 - 3. Ácido nicotínico
 - 4. Glucocorticoides
 - 5. Hormona tiroidea
 - 6. Diazóxido
 - 7. Agonistas adrenérgicos- β
 - 8. Tiacidas
 - 9. Difenilhidantoína
 - 10. Interferón α
 - 11. Otras
- F. Infecciones**
 - 1. Rubéola congénita
 - 2. Citomegalovirus
 - 3. Otras

- G.** Formas poco comunes de diabetes mediada inmunológicamente
 - 1. “Síndrome del hombro rígido”
 - 2. Anticuerpos contra el receptor de la insulina.
 - 3. Otras
- H.** Otros síndromes genéticos asociados a veces con diabetes
 - 1. Síndrome de Down
 - 2. Síndrome de Klinefelter
 - 3. Síndrome de Turner
 - 4. Síndrome de Wolfram
 - 5. Ataxia de Friedreich
 - 6. Corea de Huntington
 - 7. Síndrome de Lawrence-Moon-Beidel
 - 8. Distrofia miotónica
 - 9. Porfiria
 - 10. Síndrome de Prader-Willi
 - 11. Otras

1.3 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Los factores de transcripción pertenecen a una clase amplia de proteínas que regulan la expresión de genes, mediante mecanismos de activación o de supresión. Generalmente, estas proteínas se unen a una secuencia de nucleótidos específica en la región promotora/amplificadora del gen diana y regulan la velocidad de transcripción mediante interacción con otras proteínas accesorias.

Algunos factores de transcripción no necesariamente se unen al ADN para regular la transcripción, pero sí a otras proteínas reguladoras ya unidas al ADN y de esta manera intervienen en el proceso. También pueden unirse y secuestrar a otros factores de transcripción para suprimir la transcripción del gen diana ^[2].

La superfamilia de factores de transcripción está formada por distintas clases de proteínas: hélice-asa-hélice básica, dedos de zinc, *zipper* de leucina y hélice-giro-hélice ^[3].

1.- Hélice-asa-hélice básica (bHLH): las proteínas que poseen este motivo tienen tanto la capacidad de unión al ADN como la de formar dímeros, todas comparten un motivo común de secuencia: un segmento de 40-50 aminoácidos que contiene 2 hélices α separadas por una región de unión (asa) de longitud variable.

La capacidad para formar dímeros se sitúa en sus hélices anfipáticas, y es común a todas las proteínas con dominios HLH. La mayor parte de estas proteínas tienen una región altamente básica adyacente al motivo HLH, que es necesario para su unión al ADN.

Los miembros de este grupo de proteínas que tienen esta región se denominan proteínas bHLH y pertenecen a dos grupos principales: la clase A, formada por proteínas de expresión ubicua y la clase B, formada por proteínas que se expresan de manera específica de acuerdo al tipo de tejido. Un *modus operandi* común para una proteína específica de tejido bHLH sería la de formar un heterodímero con otra proteína de expresión ubicua.

2.- Motivo dedo de zinc: se identificó originalmente en el factor TFIIIA, necesario para que la ARN polimerasa III transcriba los genes de ARNr 5S. Posteriormente se encontró en otros factores de transcripción y una variante de este motivo se encontró en los receptores de esteroides.

Es una estructura secundaria de unión al ADN, formada por dos láminas β antiparalelas y una hélice α que se mantienen estables gracias a cuatro enlaces de coordinación que se establecen con un átomo de zinc. En estos enlaces están implicados dos residuos de histidina de la hélice α y un residuo de cisteína de cada lámina β .

3.- *Zipper* de leucina: consiste en un tramo de aminoácidos con un residuo de leucina cada siete posiciones. Forma dímeros al interactuar con otro polipéptido que posee el mismo motivo. Junto a cada *zipper* hay secuencias ricas en aminoácidos con carga positiva que pueden estar implicados en la unión al ADN.

4.- Hélice-giro-hélice (homeodominio): coloca una hélice α en el surco mayor del ADN y la otra forma un ángulo con respecto a éste. Una variante de este motivo se encontró en la caja hómo identificada inicialmente en varias proteínas codificadas por genes relacionados con la regulación del desarrollo de *Drosophila*. Posteriormente se ha encontrado en varios factores de transcripción de mamíferos.

Mucho de lo que se sabe acerca de los factores de transcripción es por el uso de modelos animales genéticamente modificados, tales como los ratones *knockout* para genes como *pdx1*, *pax4*, *nkx2.2*, *nkx6.1*, de tipo homeodominio y *neuroD1/beta2*, de tipo bHLH,

entre otros. Estos genes *knockouts* se usan para identificar mutaciones en varios genes ortólogos presentes en individuos con diabetes tipo 2 monogénica familiar ^[4].

Entender la importancia de los factores de transcripción durante el desarrollo pancreático permite abordar la patogénesis de la diabetes, en la cual la masa de células β productoras de insulina disminuye, pues se sabe que en individuos diabéticos, el desequilibrio en la homeostasis de glucosa es causado por la pérdida o disfunción de la secreción de insulina por parte de la célula β pancreática ^[5,6].

También, se ha reportado que en las poblaciones asiáticas la deficiencia en la secreción de insulina es característica de la diabetes tipo 2 ^[7]. De modo que los genes involucrados en la función de la célula β pancreática (*IPF1*, *NEUROG3*, *PAX6*, *Nkx2.2* y *Nkx6.1*, entre otros) son genes candidatos para el estudio de esta enfermedad.

1.4 Nkx2.2 Y DIABETES

El gen *Nkx2.2* es miembro de la familia NK2, en humanos se ubica en el cromosoma 20 banda p11.23, consta de dos exones ubicados a lo largo de una región aproximada de 3.5 kpb. El exón 1 incluye la región 5'-no traducida, los codones 1-86 y el primer nucleótido del codón 87, el exón 2 incluye el segundo y tercer nucleótidos del codón 87, codones del 88-273 y la región 3'-no traducida. La secuencia de aminoácidos es altamente conservada con un 98% de identidad entre humano y ratón, así como un 93% de identidad en la secuencia de nucleótidos de la región codificante para la proteína. *Nkx2.2* codifica para una proteína de 273 aminoácidos que funciona como factor de transcripción del tipo homeodominio expresado en el sistema nervioso y el páncreas. Este factor de transcripción tiene un papel fundamental en la morfogénesis pancreática, ya que se expresa de manera temprana en el desarrollo de este órgano y restringe su expresión de manera tardía hacia la formación de células α , β y PP del islote pancreático ^[8].

Se reportó que la producción de *Nkx2.2* en el desarrollo del páncreas humano, es alta en células β y α ; a la vez, en estudios con ratones transgénicos se encontró que la función de *Nkx2.2* es predominantemente represora, ya que bloquea la diferenciación hacia

2. HIPÓTESIS

Dado que los genes *Nkx2.2*, *Nkx6.1* y *Kir6.2* participan en el desarrollo y función de las células pancreáticas, se espera que algunas de sus variantes polimórficas pudieran asociarse con la diabetes tipo 2.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de polimorfismos en los genes *Nkx2.2*, *Nkx6.1* y *Kir6.2* en pacientes diabéticos tipo 2 de inicio temprano y de inicio tardío.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la presencia y/o frecuencia de polimorfismos en el gen *Nkx2.2*, *Nkx6.1* y *Kir6.2* en individuos con diabetes tipo 2 de inicio temprano y tardío, comparando con personas sanas.
- Correlacionar los polimorfismos detectados con los parámetros bioquímicos, hormonales y los datos clínicos de los pacientes.
- Determinar si los polimorfismos afectan la funcionalidad de *Kir6.2* en ovocitos de *Xenopus laevis*.

4. METODOLOGÍA

4.1 MUESTRAS

Se tomaron 30 ml de sangre periférica de 50 personas diabéticas con menos de 35 años de edad y de 50 personas diabéticas con más de 45 años de edad. Se incluyó un grupo control de 50 personas mayores de 65 años que no padecieran diabetes y que ningún miembro de su familia, al menos en tres generaciones, hubiera sido diabético.

Todas estas personas firmaron una carta de conformidad para participar en este proyecto de investigación (**Apéndice III**).

Criterios de inclusión:

- Pacientes con diagnóstico de diabetes tipo 2.
- Pacientes diabéticos sin datos que indiquen autoinmunidad.
- Pacientes diabéticos cuya enfermedad fuera detectada antes de los 35 años de edad (Diabéticos de inicio temprano).
- Pacientes diabéticos cuya enfermedad fuera detectada después de los 45 años de edad (Diabéticos de inicio tardío).
- Pacientes diabéticos con antecedentes heredofamiliares de diabetes.
- Pacientes no obesos (IMC > 30).
- Pacientes con cualquier género de tratamiento.

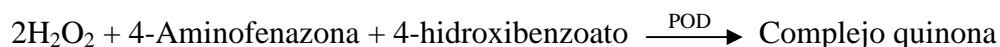
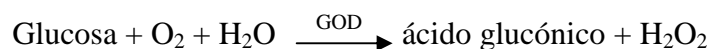
Criterios de exclusión:

- Pacientes con diagnóstico de diabetes tipo 1.
- Pacientes con diagnóstico de diabetes secundaria (pancreatitis, infecciones, traumatismos, por fármacos, etc.).
- Pacientes con diabetes tipo MODY

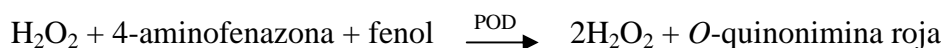
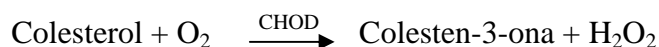
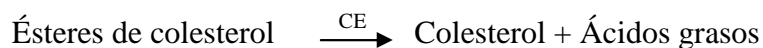
4.1.1 Determinaciones bioquímicas

Éstas se realizaron con la finalidad de determinar las concentraciones de glucosa, colesterol total y triglicéridos presentes en el plasma, y así conocer el estado metabólico tanto de los pacientes diabéticos tipo 2 como de los no diabéticos. Se utilizaron estuches comerciales enzimático-colorimétricos de la marca Wiener lab.

Glucosa: se oxida en presencia de la enzima glucosa oxidasa (GOD) a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, éste último reacciona en presencia de la enzima peroxidasa (POD) con 4-hidroxibenzoato y 4-aminofenazona para formar un complejo rojo-violeta de quinona. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de la glucosa.



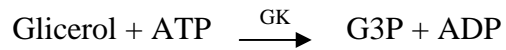
Colesterol: La colesterol estearasa (CE) hidroliza los ésteres para originar colesterol libre y ácidos grasos. El colesterol libre producido más el colesterol preformado se oxida en presencia de la enzima colesterol oxidasa (CHOD) para dar colestén-3-ona y peróxido de hidrógeno. Un cromógeno quinonimina, 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. El color rojo es proporcional a la concentración total del colesterol.



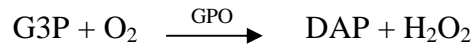
Triglicéridos:

- El glicerol y los ácidos grasos se forman en una primera etapa por acción de la lipasa sobre los triglicéridos.

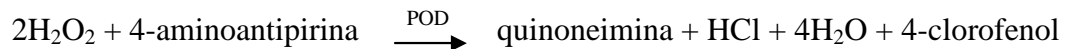
- b) El glicerol se fosforila por el adenosin-5'-trifosfato (ATP) para producir glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosin-5'-difosfato (ADP) en una reacción catalizada por la glicerol cinasa (GK).



- c) El G3P es oxidado por la glicerol fosfato oxidasa (GPO) produciendo dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrógeno.



- d) Los peróxidos reaccionan con 4-aminoantipirina y 4-clorofenol mediante la catálisis de la peroxidasa (POD) para formar una quinoneimina de color rojo.



4.1.2 Determinaciones hormonales

a) Insulina

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

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

Cálculos

Primero se calculó la media de las cuentas de unión no específica:

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

Donde: CPM = Cuentas por minuto

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

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

En un papel gráfico logarítmico se representó el porcentaje de unión en el eje vertical frente a la concentración en el eje horizontal (logarítmico) para cada calibrador y se dibujó la línea que pasa por los puntos. Los resultados de las muestras se leyeron en la curva por interpolación. Los datos se graficaron y calcularon con un contador de radioactividad marca Pakard.

b) Glucagon

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

Cálculos

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

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

Donde: CPM = Cuentas por minuto

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

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

En un papel gráfico logarítmico se representó el porcentaje de unión en el eje vertical frente a la concentración en el eje horizontal (logarítmico) para cada calibrador y se dibujó la línea que pasa por los puntos. Los resultados de las muestras se leyeron en la curva por

interpolación. Los datos se graficaron y calcularon con un contador de radioactividad marca Pakard.

c) Péptido C

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

Cálculos

Primero se calculó la media de las cuentas de unión no específica:

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

Donde: CPM = Cuentas por minuto

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

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

En un papel gráfico logarítmico se representó el porcentaje de unión en el eje vertical frente a la concentración en el eje horizontal (logarítmico) para cada calibrador y se dibujó la línea que pasa por los puntos. Los resultados de las muestras se leyeron en la curva por interpolación. Los datos se graficaron y calcularon con un contador de radioactividad marca Pakard.

4.1.3 Extracción de ADN

El ADN se extrajo mediante una técnica estándar modificada por Buffone y Darlington ^[55], a partir de leucocitos contenidos en 10 mL de sangre periférica. Para ello, los 10 mL de sangre fueron colocados en tubos cónicos de 50 mL que contenía heparina

para evitar la coagulación; se agregaron 25 mL de solución Sacarosa/ tritón 2X, se incubaron en hielo durante 10 min; se centrifugaron a 2000 rpm/15 min y se descartó el sobrenadante de cada tubo, posteriormente se agregaron 4 mL de solución Sacarosa/tritón 1X; se centrifugaron a 2000 rpm/15 min y se decantaron los tubos. A los botones obtenidos se les agregaron 3 mL de buffer de lisis, se mezclaron suavemente y se les adicionó dodecil sulfato de sodio al 10%, se agitaron cuidadosamente y se les agregaron 100 µL de proteinasa K al 0.5%. Los botones se disolvieron y se incubaron a 37 °C durante 18 h; finalmente, se les agregó 1mL de una solución de NaCl saturada y se les agitó vigorosamente para posteriormente centrifugarlos a 2000 rpm/15 min. El sobrenadante de cada tubo se recuperó en diferentes tubos cónicos de 15 mL. El ADN se precipitó adicionando 2 volúmenes de etanol al 95%, con una varilla de vidrio (pipeta pasteur sellada) se tomó el ADN y se lavó en etanol al 75% para eliminar el exceso de NaCl. El etanol se removió por evaporación y el ADN se resuspendió en buffer TE (Tris-HCl-EDTA). La preparación de los reactivos puede verse en el **Apéndice I**.

El ADN fue cuantificado espectrofotométricamente (260/280 nm) para conocer el grado de pureza (1.8-2.0 nm) y concentración. Asimismo, cada uno de los ADN fueron purificados mediante un estuche de *GeneClean turbo for PCR* de Qbiogene para utilizarlos en estudios moleculares.

4.1.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica molecular se utiliza para amplificar *in vitro* un segmento de ADN específico, utilizando una ADN polimerasa, un templado de ADN genómico y oligonucleótidos específicos que flanquean el segmento a ser amplificado. Para el gen *Nkx2.2* se diseñaron los oligonucleótidos de acuerdo a la secuencia reportada por Furuta y cols. ^[15]; en el caso del gen *Nkx6.1* se diseñaron de acuerdo con la secuencia reportada por Inoue y cols. ^[16] y para el gen *Kir6.2* se diseñarán de acuerdo con la secuencia reportada por Flanagan y cols. ^[56]. La **Tabla 4.1** muestra los oligonucleótidos que se utilizaron en el estudio.

Tabla 4.1. Oligonucleótidos para los genes *Nkx2.2*, *Nkx6.1* y *Kir6.2*

Región	Sentido(5'-3')	Antisentido(5'-3')	Talla (pb)
Nkx2.2			
Exón 1	ACGAATTGACCAAGTGAAGCTAC	AACCCGGGCTGCGGCTGCAGGAAT	380
Exón 2-1	ATCCAGGGTGCTCCGAGTCTGGTGCA	CGCGCTTCATCTTGTAGCGGT	377
Exón 2-2	GAGCGCGAACACCTGGCCAGCCTC	GTGGAGCCGAGAGTCAACTCGACT	494
Nkx6.1			
Exón 1	CGTGGGATGTTAGCGGTGGG	CTGGCCTGTACCCCTCGTGAG	682
Exón 2	CACAGATCAAGGATCCATTTTG	AGAGAGTCAGGTCAAGGTGAG	185
Exón 3	CAGGTCTGGTTCAGAACCGCCG	CGGAGAGCTCATCCTGAACGCCG	273
Kir6.2			
Exón único	CCGAGAGGACTCTGCAGT	CCACATGGTCCGTGTGTA	1310

4.1.5 Análisis de polimorfismo conformacional de cadena simple (SSCP)

Este método molecular permite detectar alteraciones del ADN al basarse en el hecho de que la sustitución de una sola base es suficiente para alterar la movilidad de una sola cadena de ADN que es sometida a electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturizantes. Dicha movilidad se atribuye a cambios conformacionales, resultantes de sustituciones, inserciones o deleciones en una cadena del ADN.

Para efectuar esta técnica, se llevó a cabo una PCR marcada con [α^{32} P] dCTP, los productos amplificados se desnaturalizan a 95 °C durante 5 min y posteriormente cargados en un gel de poliacrilamida al 5.4% y 8% en presencia y ausencia de glicerol al 10%. La electroforesis se llevó a cabo en un cuarto a temperatura ambiente a 200 v y durante 18 h. El gel se colocó en un desecador (Gel Dryer GD2A, Labnet) a 75 °C durante 1 h y una vez seco se le expuso a una película radiográfica (X-OMAT Kodak) durante 12 h para revelarlo. La preparación de reactivos y geles puede consultarse en el **Apéndice I**.

4.1.6 Secuenciación

Esta se realizó mediante el estuche comercial y el secuenciador 3130xl de Applied Biosystems.

4.2 ENSAYO BIOLÓGICO

Con el fin de conocer los efectos de polimorfismos y/o mutaciones presentes en la secuencia del gen *Kir6.2*, se realizó el ensayo biológico mediante la expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus* a los cuales se les inyectó el ARN complementario (sintetizado *in vitro*) de las muestras que presentaron polimorfismos. Transcurridas 78 h de incubación a 18°C, se evaluaron las corrientes del canal K_{ATP} en el ovocito mediante Fijación de voltaje con dos microelectrodos (TEVC).

4.2.1 Biología molecular

Se seleccionaron las muestras A-20 y DM-39, la primera corresponde al grupo de personas no diabéticas y tiene el genotipo silvestre para las variantes *Kir6.2*: E23K, L270I, R325C e I337V; la segunda pertenece al grupo de diabéticos y tiene el genotipo mutante: K23K, R325C e V337V. (Banco de genes D50582). Los productos de PCR fueron utilizados como ADNc para obtener el ARNm que se inyectó.

Reacción de A-Tailing para productos de PCR romos

Se colocaron de 1-7 μ L de los productos de la PCR purificada, de ambas muestras, en tubos para PCR y se les adicionó 1 μ L de buffer de reacción 10X *Taq*DNA polimerasa con $MgCl_2$, dATP para una concentración final de 0.2 mM, 5 unidades de *Taq*DNA polimerasa y H_2O libre de nucleasas para un volumen final de 10 μ L. Se incubaron a 70 °C durante 15-30 min.

Reacción de ligación en el pGEM-T Easy Vector System (Promega)

Se realizaron las reacciones siguientes como se enlistan en la **Tabla 4.2** y se incubaron a 4°C durante toda la noche para obtener el máximo número de transformantes. La preparación de los medios de cultivo se describe en el **Apéndice I**.

Tabla 4.2. Reacciones de ligación en pGEM-T Easy Vector

	Reacción estándar	Control positivo	Control negativo
2X Rapid ligation buffer, T4 DNA ligasa	5 µL	5 µL	5 µL
pGEM-T Easy Vector (50 ng/µL)	1 µL	1 µL	1 µL
Producto de PCR*	X µL	---	---
Inserto-control DNA (4 ng/µL)	---	2 µL	---
T4 DNA ligasa (3U/µL)	1 µL	1 µL	1 µL
H ₂ O dd para un volumen final de	10 µL	10 µL	10 µL

*[(ng de vector * kb del inserto) / kb del vector][razón molar inserto: vector] = ng de inserto.

1:1 ⇒ 21.5 ng *Kir6.2*; 2:1 ⇒ 43 ng *Kir6.2* y 3:1 ⇒ 65 ng *Kir6.2*

Transformación de las células competentes de alta eficiencia JM109 (Promega)

Se prepararon 2 cajas petri con medio LB/ampicilina/X-Gal/IPTG para cada reacción de ligación y 2 cajas para determinar la eficiencia de transformación. Se adicionaron 2 µL de cada reacción a tubos de microcentrifugación, estériles y de 1.5 mL y se transfirieron 50 µL de células. Los tubos se colocaron en un baño de agua a 42 °C durante 45-50 s y al término de este período se les puso inmediatamente en el hielo durante 2 min. Posteriormente, se adicionaron 950 µL de medio SOC y se incubaron con agitación durante 1.5 h a 37°C (~ 150 rpm). Se sembraron por duplicado 100 µL de cada cultivo de transformación en las cajas de LB/ampicilina y se incubaron a 37°C durante 16 a 24 h.

Extracción del ADN plásmido recombinante (Wizard *Plus* SV Minipreps DNA purification system, Promega)

Se usaron colonias aisladas para inocular de 1-10 mL de medio LB/ampicilina, se incubaron con agitación a 37 °C durante 12 a 16 h. Al término de la incubación se cosecharon 1.5 mL y se centrifugaron a 10, 000 x g / 5 min, el sobrenadante se descartó y se adicionaron 250 µL de Cell Resuspension Solution para resuspender completamente los botones de células, después se agregaron 250 µL de Cell Lysis Solution y se incubaron los tubos hasta que la solución se aclaró, posteriormente fueron adicionados 10 µL de Alkaline Protease Solution y nuevamente se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min. Al final de ésta, se agregaron 350 µL de Neutralization Solution y se centrifugó a máxima velocidad (alrededor de 14, 000 x g) durante 10 min a temperatura ambiente.

Purificación y extracción del ADN plásmido por centrifugación

El lisado aclarado se transfirió por decantación a columnas preparadas y se centrifugaron a máxima velocidad /1min / temperatura ambiente. Se descartó el filtrado se adicionaron a las columnas 750µL de Column Wash Solution y nuevamente se centrifugaron a máxima velocidad / 1min / temperatura ambiente. Se repitió el lavado con 250 µL de Column Wash Solution y se centrifugó a máxima velocidad / 2min / temperatura ambiente. Finalmente, las columnas se transfirieron a tubos de microcentrifugación estériles y se eluyó el ADN plásmido con 100 µL de agua libre de nucleasas centrifugando a máxima velocidad / 1 min / temperatura ambiente.

Secuenciación

Se usó el oligonucleótido dirigido al promotor de la T7 polimerasa para verificar que el inserto de *Kir6.2* quedó en sentido.

Secuencia: 5'-d(TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG)-3'

Linearización del plásmido

Para esta reacción se tomaron 1.5 µg de ADN plásmido, 16.3 µL de H₂O bidestilada y estéril, 2 µL RE 10X Buffer, 0.2 µL de BSA acetilada [10 µg/µL] y 0.5 µL del enzima *SpeI* [10 U/µL] en un volumen final de 20 µL. Se incubó a 37 °C durante 4h y se paró la reacción con 1 µL EDTA 0.5 M, 2 µL de acetato de sodio 3 M, 40 µL de etanol absoluto. Se enfrió la mezcla a -20 °C/15 min y se centrifugó a máxima velocidad/15 min; el sobrenadante se descartó y el ADN se resuspendió en 5 µL de agua libre de nucleasas.

Síntesis *in vitro* de ARN (mMessage mMACHINE T7, Ambion-Applied Biosystems)

1.- Reacción de Transcripción Capped

Se llevó a cabo la reacción con 1.2 µg de ADN plásmido lineal, 2 µL de agua libre de nucleasas, 10 µL de agua libre de nucleasas de 2X NTP / CAP, 2 µL de 10X Reaction Buffer y 2 µL de Mix Enzyme. La reacción se incubó a 37 °C durante 2 h.

2.- Precipitación del ARN mediante Cloruro de Litio

Para detener la actividad enzimática se precipitó el ARN con 30 µL de LiCl, se enfrió a -20 °C durante 30 min, posteriormente se centrifugó a máxima velocidad durante 15 min y a 4 °C, se removió el sobrenadante y el botón se lavó una sola vez con ~ 1 mL de etanol al 70%, se centrifugó nuevamente a -20 °C durante 30 min para eliminar los ribonucleótidos no incorporados y el ARN se resuspendió en 50 µL de H₂O-DEPC.

Cuantificación del ARNm

Se utilizó el equipo NANODROP 1000 spectrophotometer, THERMO scientific, ya que utiliza un microlitro para determinar la concentración de la muestra y el grado de pureza.

4.2.2 Electrofisiología

Extracción de ovocitos

Las ranas hembra de *Xenopus laevis* se mantuvieron en acuarios con agua declorinada y a temperatura de 14-18 °C, su alimentación fue a base de hígado de pollo y alimento comercial para rana. Para la extracción de los ovocitos, la rana se colocó en un baño de hielo a fin de anestésarla. Una vez que quedó inerte, se sometió a una minilaparotomía mediante una incisión de aproximadamente 1 cm, en el abdomen y paralela al pliegue inguinal. Se le extrajo parte de los lóbulos de ovocitos y después se le suturó por planos. Finalmente, se mantuvo aislada durante un período de 24 h para su recuperación óptima.

Cultivo de ovocitos

Los lóbulos de ovocitos se lavaron con solución de Barth sin calcio (Anexo I) y se separaron con pinzas y después se lavaron con una solución de colagenasa tipo IA (1 µg / mL) en solución de Barth sin calcio, con agitación manual cuyo tiempo se estimó cualitativamente y la digestión se prolongó hasta obtener ~ 50% de ovocitos aislados. El proceso concluyó cuando se lavaron 5 veces a los ovocitos con solución de Barth sin calcio y se dispersaron en una caja Petri para su selección. Se eligieron aquellos que estaban intactos y en un estadio V o VI. Se usaron 30 ovocitos por unidad experimental y se incubaron en solución de Barth a 18 °C.

Inyección de ovocitos

Con una micropipeta de inyección (Drummond Scientific Company) y capilares de vidrio (Custom Glass, Drummond Scientific Company) se inyectaron ~50 nL por ovocito de ARNm con una concentración de ~2 ng/µL. Los ovocitos se separaron en 4 grupos experimentales: un control sin inyección, un control negativo inyectado con agua HPLC, un control positivo inyectado con ARNm de *Kir6.2* en su forma silvestre y el grupo inyectado con ARNm de *Kir6.2* en su forma mutante. Luego de la inyección los ovocitos se incubaron en solución de Barth con antibiótico a 18 °C y se estudiaron de 1 a 4 días después de la inyección. La solución de cultivo se cambió diariamente.

Registro electrofisiológico

Los ovocitos se colocaron en una celda de plástico y en un medio con la siguiente composición (mM): 90 KCl, 1 MgCl₂, 1.8 CaCl₂, 5 HEPES a pH 7.4 con KOH (ver ANEXO I). Para la manipulación del ovocito se utilizó un esteroscópico. Las corrientes totales se obtuvieron con la técnica de electrofisiología de fijación de voltaje con dos microelectrodos y usando un amplificador (TEV 200, Dagan Corporation). Las pipetas de registro se hicieron con capilares de borosilicato llenados con una solución de KCl 3M y con resistencias de 0.5 a 1 MΩ. Luego de ubicar los dos microelectrodos, se midió en el modo de corriente el valor del potencial al cual el flujo neto de cargas fue igual a cero y a éste se denominó potencial de reposo (V_m). Posteriormente se registró a la célula en la modalidad de voltaje. Se generaron pulsos de voltaje de -120 a 0 mV con un intervalo de 20 mV desde un potencial de mantenimiento de -10 mV. Las corrientes se filtraron a 1 kHz y se digitalizaron a 4 kHz con una interfase análogo-digital (DigiData 1200 Interface, Axon Instruments, Foster City, CA) y se midieron de 280-295 ms después de comenzar un pulso de voltaje. La adquisición y análisis de los datos se realizó con los programas Clampex 10.1 y Clampfit 10.1. Los datos se analizaron con las pruebas de ANADEVVA y se consideraron significativos con valores de $p < 0.05$.

El estudio electrofisiológico fue en colaboración con el Dr. José de Jesús García Valdés, quien amablemente brindó soporte técnico, equipos y material biológico.

4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las pruebas estadísticas fueron realizadas mediante el uso del paquete estadístico SPSS versión 15.0 para Windows. Valores de $p \leq 0.05$ se consideraron como significativos.

Desde el punto de vista estadístico, un polimorfismo constituye una variable categórica con varios genotipos posibles y se suele considerar como una categoría de referencia al grupo de individuos homocigotos para el alelo más frecuente. Para evaluar la asociación de un polimorfismo con la enfermedad se construye una tabla de contingencia y se contrasta la hipótesis de asociación mediante una prueba de χ^2 . También se puede

calcular la *Odds ratio* (OR) de cada genotipo respecto a la referencia para cuantificar la magnitud de la asociación.

Para ajustar los análisis por posibles variables de confusión como el género o el IMC, se emplean modelos de regresión logística que permiten evaluar fácilmente si hay interacciones entre el polimorfismo y otros factores.

El modelo logístico se define por la ecuación: $\text{Log} [p/ (1-p)] = \alpha + \beta G + \gamma Z$

Donde: α , β y γ son parámetros estimados; p es la probabilidad de ser caso; G es el polimorfismo (que codifica los diferentes genotipos: AA, Aa, aa) y Z es una o más variables por las que se desea ajustar el modelo.

Este análisis permite definir varios modelos de herencia posibles y son 4 los principales: Modelo dominante, modelo recesivo, modelo aditivo y modelo codominante.

En este estudio se analizaron los datos bajo el modelo recesivo que supone como necesarias 2 copias del alelo de menor frecuencia para modificar el riesgo; por tanto, heterocigotos (Aa) y homocigotos (AA) tienen el mismo riesgo y se compara la combinación de ellos respecto a los homocigotos (aa).

5. RESULTADOS

5.1 MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS

En la **Tabla 5.1** se muestran los datos antropométricos de los tres grupos de estudio. Se observa la edad al momento del diagnóstico de la enfermedad, para ambos grupos de diabéticos. Asimismo, el índice de masa corporal (IMC) y el índice cintura cadera (ICC).

Tabla 5.1. CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS

Característica	Grupo	Mediana ± DE	Valores de referencia	Nº de sujetos
Edad Dx (años)	D. Tempranos	31 ± 7	--	50
	D. Tardíos	52 ± 10		50
	Control	59 ± 9		50
IMC (kg/m ²)	D. Tempranos	28.5 ± 7.8	18.5-25	50
	D. Tardíos	28.3 ± 5.0		50
	Control	26.3 ± 3.4		50
ICC	D. Tempranos	0.9 ± 0.03	Hombres: 0.95 Mujeres: 0.85	10
		0.9 ± 0.07		40
	D. Tardíos	0.95 ± 0.04		11
		0.9 ± 0.05		39
	Control	0.92 ± 0.04		18
		0.86 ± 0.05		32

IMC, Índice de masa corporal; ICC, Índice cintura cadera.

El parámetro edad fue importante para seleccionar los grupos de estudio, principalmente el control, pues se ha visto que la incidencia de la diabetes tipo 2 aumenta con la edad; de esta manera se trató de garantizar que los controles realmente representaran a personas sanas, tanto por carecer de antecedentes heredofamiliares como por no desarrollar diabetes amén de su edad avanzada ^[57].

Las medidas antropométricas como el índice de masa corporal (IMC) y el índice de cintura / cadera (ICC) son indicadores del estado nutricional de una persona y cuando sobrepasan los valores de referencia indican sobrepeso y obesidad, que se convierten en factores de riesgo importantes para el desarrollo de enfermedades crónicas, incluyendo las cardiovasculares, diabetes y cáncer ^[58].

Con el fin de interrelacionar factores genéticos con la insuficiencia de la secreción de insulina (hipoinsulinemia), sólo se seleccionaron a aquellos pacientes que no tuvieron un

IMC mayor a 30 kg/m², es decir, que no fueran obesos; pues se sabe que estos pacientes tienen resistencia hepática a la insulina debida a la grasa intraabdominal [59].

Pese a la minuciosa selección de los grupos, se observa que existe sobrepeso en los tres grupos de estudio, no así obesidad; lo cual es consistente con las estadísticas reportadas por la encuesta nacional de salud y nutrición realizada en 2006 (ENSANUT 2006), donde se menciona que el 70% de los adultos mexicanos se ven afectados por sobrepeso y obesidad.

5.2 DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

Dentro de los parámetros bioquímicos que se evaluaron están la glucosa, el colesterol y los triglicéridos, en ayunas. La **Tabla 5.2** muestra la mediana y la desviación estándar para los parámetros antes mencionados.

Tabla 5.2. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

Parámetro	Grupo	Mediana ± DE	Valores de referencia	N° de sujetos
Glucosa (mg/dL)	D. Tempranos	207.1 ± 77.1	70-100 mg/dL	50
	D. Tardíos	198.3 ± 90.3		50
	Control***	89.4 ± 13.4		50
Colesterol (mg/dL)	D. Tempranos	204.6 ± 50.8	< 200 mg/dL	50
	D. Tardíos	192.3 ± 41.4		50
	Control	203.9 ± 35.5		50
Triglicéridos (mg/dL)	D. Tempranos***	274.5 ± 232.6	50-150 mg/dL	50
	D. Tardíos	178.5 ± 106.6		50
	Control	127.2 ± 140.9		50

(***), $p < 0.0001$, Prueba no paramétrica: Kruskal-Wallis.

La determinación de la glucosa plasmática fue importante para estimar el control del estado diabético. Ambos grupos de diabéticos tienen niveles de glucosa plasmática muy elevada. Si se considera que se trata de pacientes bajo tratamiento médico, sus niveles de glucosa deberían ser más estables y presentar un patrón ligeramente más alto al de los individuos normoglicémicos, pero no con marcada diferencia ($p < 0.0001$).

En la determinación del colesterol total plasmático no se observó diferencia significativa ($p = 0.244$) entre los grupos de diabéticos y el control, no obstante, en los tres casos existe una tendencia hacia el límite superior del valor de referencia que en cierta medida refleja el 26.5% de prevalencia general en hipercolesterolemia, reportado por la ENSANUT2006.

Al determinar los niveles de triglicéridos plasmáticos se encontró diferencia significativa ($p = 0.0001$) y fue el grupo de diabéticos de inicio temprano quien presentó mayor concentración de éstos, incluso por arriba de 200 mg/dL. Tales resultados pudieran deberse a que la hipertrigliceridemia aislada es la anormalidad más frecuente en personas diabéticas; según datos reportados por la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas, 74% de los casos tiene triglicéridos > 150 mg/dL [60].

5.3 DETERMINACIONES HORMONALES

En la **Tabla 5.3** se resumen las características hormonales de los tres grupos de estudio, se muestra la mediana y la desviación estándar de cada una de ellas.

Tabla 5.3. PARÁMETROS HORMONALES

Parámetro	Grupo	Mediana \pm DE	Valores de referencia	N° de sujetos
Insulina (UI/mL)	D. Tempranos	15.4 \pm 16.2	5-25 UI/mL	50
	D. Tardíos	11 \pm 14.1		50
	Control	13.6 \pm 10.7		50
Péptido C (pg/mL)	D. Tempranos	1.5 \pm 2.7	1.1-3.2 ng/mL	50
	D. Tardíos***	5.2 \pm 3.4		50
	Control	1.8 \pm 1.4		50
Glucagon (pg/mL)	D. Tempranos	84 \pm 135.8	59-177 pg/mL	50
	D. Tardíos**	7.3 \pm 4.2		50
	Control	93.5 \pm 146.2		50

(***), $p < 0.0001$; (**), $p = 0.007$, Prueba no paramétrica: Kruskal-Wallis.

Al determinar la concentración de insulina plasmática, no se encontró diferencia significativa ($p = 0.054$). Paradójicamente, el grupo de diabéticos de inicio temprano presentó mayor nivel de insulina que el grupo control, pero si se toma en cuenta que algunos pacientes eran tratados con insulina endógena y otros con fármacos que estimulan

la secreción de esta hormona, resulta ser un dato poco confiable que debe corroborarse con la determinación de péptido C plasmático.

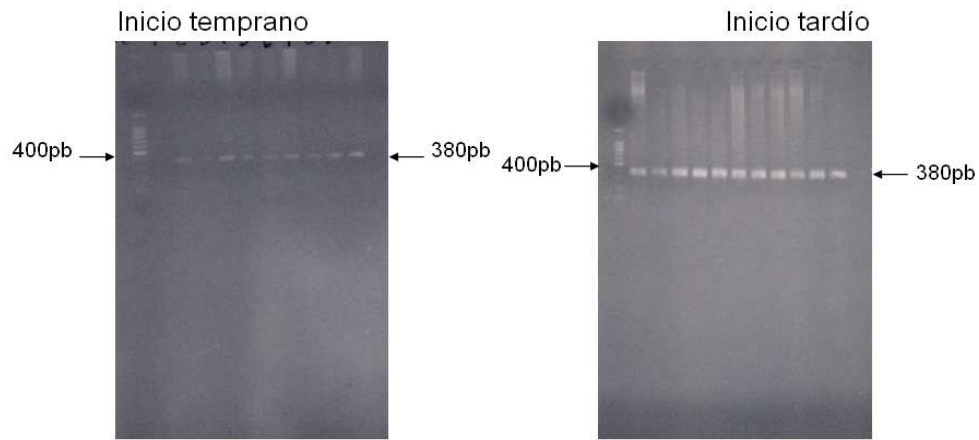
El péptido C se libera en el procesamiento de la proinsulina, es almacenado en los gránulos de las células β y cosecretado con la insulina por exocitosis en concentraciones equimolares.^[43] Como en los preparados comerciales de insulina está ausente, la secreción de éste es un índice de la masa de células β y por ende, un marcador de la producción endógena de insulina. En la determinación de péptido C se encontró diferencia significativa ($p < 0.0001$), siendo el grupo de diabéticos de inicio tardío quien posee mayor concentración de péptido C, esto podría deberse a que algunos pacientes estaban recibiendo tratamiento con sulfonilureas cuyo mecanismo de acción es estimular la secreción de insulina. En el caso del grupo de diabéticos de inicio temprano se observó que la concentración de péptido C plasmático no corresponde con la concentración de insulina reportada en la **Tabla 5.3**, lo cual permite discernir entre insulina endógena e insulina de preparados comerciales, y es esta última la que atribuyó valores altos a la concentración de insulina plasmática.

En la determinación de glucagon se obtuvo diferencia significativa ($p = 0.007$). Lo cual podría esperarse, pues se sabe que diabéticos que portan el polimorfismo E23K del gen *Kir6.2* no inhiben la secreción de glucagon en respuesta a un estado de hiperglicemia.^[61]

5.4 DETERMINACIONES MOLECULARES

5.4.1 Evaluación del gen *Nkx2.2* y *Nkx6.1*

Se realizaron amplificaciones mediante la PCR con [α^{32} P] dCTP para los genes *Nkx2.2* y *Nkx6.1* (**Fig. 5.1**). Los productos de amplificación se fraccionaron en geles de poliacrilamida no desnaturizante para el análisis por SSCP e identificar, con base en los resultados de la electroforesis, posibles cambios conformacionales resultantes de sustituciones, inserciones o deleciones de una cadena del ADN.



Fotografías tipo de geles de agarosa al 1.0%. Productos de amplificación obtenidos por PCR que corresponden al exón 1 del gen *Nkx2.2*. Marcador: 100 pb

Fig. 5.1, Productos de PCR con $[\alpha^{32}\text{P}]$ dCTP, de muestras de diabéticos de inicio temprano y tardío.

Al realizar la técnica cualitativa de SSCP, se aprecian dos diferentes patrones de migración (**Fig. 5.2**) que corresponden a las muestras D-25 y D-52. Se secuenciaron pero fue un cambio silencioso.

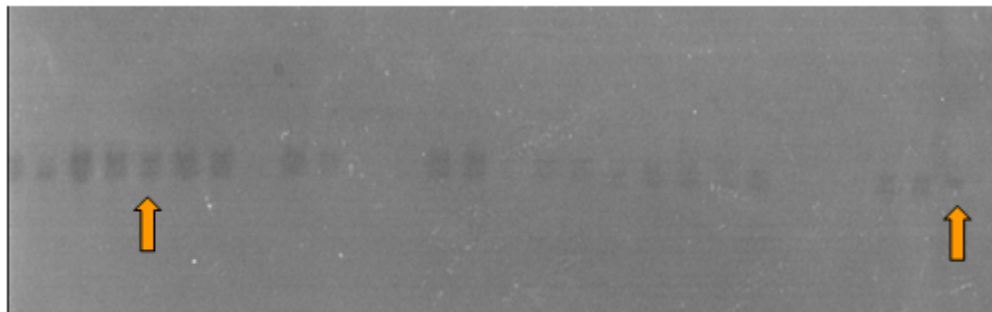
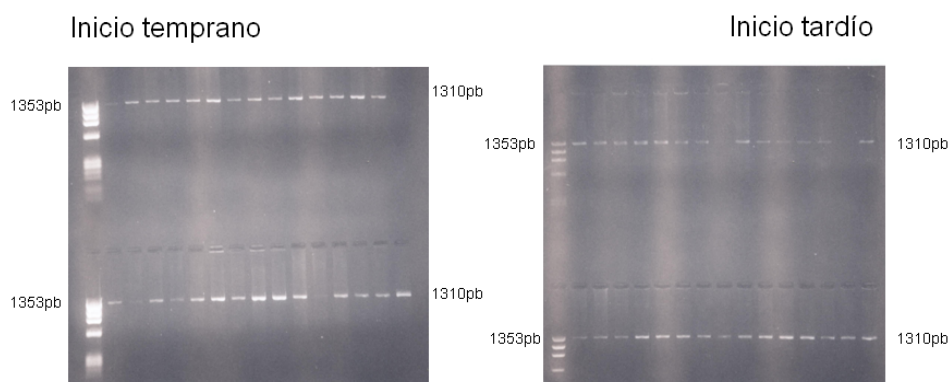


Fig. 5.2, Fotografía tipo de un gel de acrilamida al 5.4% sin glicerol / 200 v / 18 horas. Productos de PCR con ^{32}P del gen *nkx2.2*, exón 1 en diabéticos de inicio temprano.

De los análisis moleculares para estos factores de transcripción *Nkx2.2* y *Nxk6.1* no se encontraron variantes génicas que se puedan asociar con la disminución en la secreción de insulina.

5.4.2 Evaluación del gen *kir6.2*

Se llevaron a cabo 150 reacciones de PCR (50 diabéticos tempranos, 50 diabéticos tardíos y 50 controles) para la amplificación del exón único de *Kir6.2*. Asimismo, la purificación de los productos de PCR mediante el estuche comercial *GeneClean turbo for PCR* de Qbiogene, para su posterior secuenciación (**Fig. 5.3**).



Fotografías tipo de geles de agarosa al 1.5%. Productos de amplificación obtenidos por PCR de toda la secuencia del gen *Kir6.2* (*KCNJ11*). Marcador de pares de bases: XΦ174 RF DNA / *Hae III*.

Fig. 5.3, Productos de PCR de las muestras de diabéticos de inicio temprano y tardío.

Se secuenciaron las muestras de los tres grupos de estudio, mediante el secuenciador *3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems*. Para realizar las reacciones cíclicas se utilizó la química BigDye v3.1, dado que ésta se recomienda para secuencias largas.

Las secuencias obtenidas de cada una de las muestras se compararon contra la secuencia del gen *Kir6.2* reportada en el Banco de Genes, con clave de acceso: D50582.

Se encontraron tres polimorfismos, ya reportados, con efecto de sentido erróneo: E23K por el extremo 5' (Amino terminal en la proteína) y el L270V e I337V por el extremo 3' (Carboxilo terminal en la proteína). Así como el cambio R325C que no ha sido reportado y que también se encuentra situado en el extremo 3'.

La variante E23K está dada por el cambio de guanina (g) 67 a adenina (a) en la primera base del codón 23, lo que implica un cambio en la secuencia de aminoácidos: ácido glutámico (E, carga negativa) por lisina (K, carga positiva), (**Fig. 5.4, Apéndice II**).

El polimorfismo L270V implica el cambio de la citosina (c) 808 por una guanina (g) en la primera base del codón 270 y da por resultado la alteración en la secuencia de aminoácidos: leucina (L) por valina (V), cambio sinónimo porque ambos residuos de aminoácidos son no polares, (**Fig. 5.5, Apéndice II**).

En el polimorfismo R325C hay un cambio de la citosina (c) 937 por timina (t) en la primera base del codón 325, esto ocasiona la sustitución del aminoácido arginina (R) por el aminoácido cisteína (C). Cambio no sinónimo pues R tiene carga positiva y C es polar no cargado, (**Fig. 5.6, Apéndice II**).

Por otra parte, el polimorfismo I337V consta de la sustitución de la adenina 1009 por guanina en la primera base del codón 337, esto implica el cambio del aminoácido isoleucina (I) por valina (V) y como ambos son no polares, es por tanto, sinónimo. (**Fig. 5.7, Apéndice II**).

5.4.2.1 E23K y DT2

En la **Tabla 5.4** se resumen las frecuencias para cada genotipo de la variante E23K y su análisis estadístico para buscar asociación con diabetes tipo 2.

TABLA 5.4. FRECUENCIA GENOTÍPICA DE LA VARIANTE *KIR6.2-E23K*

Genotipo	Diabéticos de inicio temprano %(n=44)	Diabéticos de inicio tardío %(n=45)	Controles* %(n=44)
GG (E23E)	29.5% (13)	33.3% (15)	31.8% (14)
GA (E23K)	36.3% (16)	51.1% (23)	63.6% (28)
AA (K23K)	34.1% (15)	15.5% (7)	4.5% (2)
<i>P</i> sin ajuste con género e IMC	0.007	0.359	---
<i>P</i> ajuste con género e IMC	0.002	0.218	---
<i>p</i>	0.033	0.515	---
OR (95% IC) para la variante de riesgo (A)	1.917(1.049-3.503)	1.222(0.668-2.235)	---

* No se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg; $p < 0.05$; OR > 1 se considera como riesgo.

De acuerdo con estos datos, se observó que el genotipo AA (K23K o K/K) tuvo mayor frecuencia en el grupo de diabéticos de inicio temprano (34.1%) que en cualquiera de los otros. El análisis estadístico sin ajuste sugiere que existe una asociación entre el genotipo AA y la manifestación de diabetes tipo 2 a edad temprana ($p = 0.007$). Asimismo, el análisis estadístico con ajuste al género e IMC se realizó con el fin de excluir a estas dos variables de la influencia que pudieran aportar a la asociación, pues ambas *per se* son factores que se asocian directamente con diabetes tipo 2 y pudieran sesgar el resultado. Bajo este análisis, la asociación entre el genotipo homocigoto para el alelo menor (AA) y diabetes tipo 2 de inicio temprano se mantuvo ($p = 0.002$).

Al comparar las frecuencias genotípicas con las reportadas en otras poblaciones se observó que la frecuencia genotípica K/K, en población mexicana, fue una de las mayores (0.23) junto con la población caucásica (0.27) reportada por Hani *et al.* [64]. No obstante, la frecuencia genotípica K/K hallada en sujetos control caucásicos fue de 0.14 y en mexicanos fue de 0.05. Lo cual sugiere que el SNP K23K, en la población caucásica se asocie menos fuerte con la diabetes (**Tabla 5.5**).

TABLA 5.5. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DE E23K EN DIFERENTES POBLACIONES

Población	% Controles (n)			% Diabéticos tipo 2 (n)			Referencia
	E/E	E/K	K/K	E/E	E/K	K/K	
Japonesa	0.54 (44)	0.33 (27)	0.13 (11)	0.38 (38)	0.45 (45)	0.17 (17)	Sakura et al. (1996) ^[62]
Caucásica	0.36 (59)	0.59 (96)	0.05 (9)	0.43 (124)	0.46 (133)	0.12 (34)	Inoue et al. (1997) ^[63]
Caucásica	0.40 (45)	0.46 (53)	0.14 (16)	0.28 (53)	0.45 (87)	0.27 (51)	Hani et al. (1998) ^[64]
Caucásica (UK)	0.41 (125)	0.50 (152)	0.09 (30)	0.37 (133)	0.45 (161)	0.18 (66)	Gloyn et al. (2001) ^[65]
Caucásica (Holanda)	0.40 (26)	0.49 (32)	0.11 (7)	0.36 (34)	0.53 (50)	0.11 (10)	Hart et al. (2002) ^[66]
Caucásica (UK)	0.42 (491)	0.45 (534)	0.13 (157)	0.36 (308)	0.48 (412)	0.16 (134)	Gloyn et al. (2003) ^[67]
Caucásica	0.39 (330)	0.47 (408)	0.14 (124)	0.36 (287)	0.47 (382)	0.17 (134)	Nielsen et al. (2003) ^[68]
Caribeña	0.51 (17)	0.45 (15)	0.03 (1)	0.47 (18)	0.52 (20)	0.0 (0)	Ezenwaka et al. (2005) ^[69]
Japonesa	0.40 (503)	0.46 (570)	0.14 (171)	0.38 (610)	0.46 (734)	0.15 (246)	Yokoi et al. (2006) ^[70]
Japonesa	0.43 (386)	0.44 (396)	0.12 (107)	0.37 (333)	0.49 (446)	0.14 (127)	Sakamoto et al. (2007) ^[71]
Checa	0.42 (48)	0.41 (47)	0.15 (18)	0.38 (66)	0.49 (85)	0.12 (21)	Čejková et al. (2007) ^[72]
Caucásica (Francia)	---	---	---	0.35 (101)	0.48 (137)	0.17 (49)	Vaxillaire et al. (2008) ^[73]
Japonesa	0.40 (421)	0.48 (509)	0.11 (118)	---	---	---	Omori et al. (2008) ^[74]
Mexicana	0.32 (14)	0.64 (28)	0.05 (2)	0.31 (28)	0.44 (39)	0.23 (22)	<i>Tesis</i>

(---) indica que no hay datos reportados en ese artículo.

CORRELACIÓN ENTRE LA VARIABLE *KIR6.2-E23K* Y LOS PARÁMETROS CLÍNICOS

Diabéticos tipo 2

Para determinar la forma en que se asocia el genotipo K/K del polimorfismo E23K con los parámetros antropométricos, bioquímicos y hormonales, se hizo un análisis estadístico bajo el modelo recesivo; es decir, se agruparon los datos de ambos grupos de diabéticos que presentaron dicho genotipo y se compararon contra los genotipos E/E y E/K (K/K vs E/E + E/K). Así, se encontró una tendencia a mantener concentración elevada de triglicéridos, en individuos con genotipo K/K (333.4 mg/dL, $p = 0.054$) a diferencia de los que tuvieron genotipo E/E o E/K (**Tabla 5.6**).

TABLA 5.6. ASOCIACIÓN DEL GENOTIPO K/K CON PARÁMETROS CLÍNICOS
Estadísticos de contraste^{a,b}

	IMC	Colesterol	Triglicéridos
Chi-cuadrado	2.367	.953	3.718
gl	1	1	1
Sig. asintót.	.124	.329	.054

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: RecE23K

Programa estadístico: SPSS V.15.0

Otro parámetro en el cual se encontró diferencia significativa fue la concentración de insulina plasmática ($p = 0.048$), (**Tabla 5.7**); paradójicamente quienes mostraron mayor concentración de insulina fueron los diabéticos con genotipo K/K (Concentración promedio de 21.6 UI/mL); no obstante, este dato puede ser inexacto si se considera que algunos recibían la hormona como tratamiento.

TABLA 5.7. ASOCIACIÓN DEL GENOTIPO K/K CON PARÁMETROS CLÍNICOS
Estadísticos de contraste^{a,b}

	Glucosa	Insulina	PéptidoC	Glucagon
Chi-cuadrado	.380	3.921	.129	1.593
gl	1	1	1	1
Sig. asintót.	.537	.048	.719	.207

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: RecE23K

Programa estadístico: SPSS V.15.0

Controles

El mismo análisis de modelo recesivo se aplicó al grupo control para buscar asociación entre el genotipo K/K y las características clínicas de los individuos que lo portan. Al igual que el grupo de diabéticos, hubo diferencia significativa en la concentración plasmática de triglicéridos ($p=0.016$; **Tabla 5.8**), en donde los portadores del genotipo K/K presentaron mayor concentración de triglicéridos plasmáticos (258 mg/dL) que los individuos con genotipo E/E y E/K (121.8 mg/dL), e incluso por arriba del parámetro de referencia (< 150 mg/dL).

TABLA 5.8. ASOCIACIÓN DEL GENOTIPO K/K CON PARÁMETROS CLÍNICOS

Estadísticos de contraste^{a,b}

	IMC	Colesterol	Triglicéridos
Chi-cuadrado	.002	.184	5.805
gl	1	1	1
Sig. asintót.	.967	.668	.016

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: RecE23K

Programa estadístico: SPSS V.15.0

La concentración de insulina plasmática presentó diferencia significativa ($p=0.012$; **Tabla 5.9**); incluso, quienes poseen el alelo de riesgo en forma homocigota tienen menor concentración de insulina (3.7 UI/mL). Este hallazgo resulta de importancia porque al tratarse de personas no diabéticas, sugiere que el genotipo K/K se relaciona con una disminución en la secreción de la insulina.

TABLA 5.9. ASOCIACIÓN DEL GENOTIPO K/K CON PARÁMETROS CLÍNICOS

Estadísticos de contraste^{a,b}

	Glucosa	Insulina	PéptidoC	Glucagon
Chi-cuadrado	.261	6.291	1.029	.533
gl	1	1	1	1
Sig. asintót.	.610	.012	.310	.465

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: RecE23K

Programa estadístico: SPSS V.15.0

5.4.2.2 I337V y DT2

Otro polimorfismo que presentó alta frecuencia entre los grupos de estudio, fue el I337V (**Tabla 5.10**). De acuerdo con estos datos, se observó que el genotipo homocigoto para el alelo menor GG (V337V o V/V) tuvo mayor frecuencia en el grupo de diabéticos de inicio temprano (27.3%) que en cualquiera de los otros. El análisis estadístico sin ajuste indica que existe asociación entre el genotipo V/V y la manifestación de diabetes tipo 2 a edad temprana ($p = 0.011$). El análisis estadístico con ajuste a las variables género e IMC también mostró asociación entre V/V y diabetes tipo 2 de inicio temprano ($p = 0.007$).

TABLA 5.10. FRECUENCIA GENOTÍPICA DE LA VARIANTE *KIR6.2-I337V*

Genotipo	Diabéticos de inicio temprano % (n=44)	Diabéticos de inicio tardío % (n=49)	Controles* % (n=41)
AA (I337I)	34.1% (15)	34.6% (17)	39.0% (16)
AG (I337V)	38.6% (17)	49.0% (24)	58.5% (24)
GG (V337V)	27.3% (12)	16.3% (8)	2.4% (1)
<i>P</i> sin ajuste con género e IMC	0.011	0.058	---
<i>P</i> con ajuste con género e IMC	0.007	0.056	---
<i>P</i>	0.024	0.206	---
OR (95% IC) para la variante de riesgo (A)	2.054(1.092-3.864)	1.485(0.803-2.748)	---

* No se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg; $p < 0.05$; OR > 1 se considera como riesgo.

Al comparar las frecuencias genotípicas halladas con las reportadas en otras poblaciones se observó que la frecuencia genotípica V/V, en población diabética mexicana, fue la mayor (0.22). (**Tabla 5.11**).

TABLA 5.11. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DE I337V EN DIFERENTES POBLACIONES

Población	% Controles (n)			% Diabéticos tipo 2 (n)			Referencia
	I/I	I/V	V/V	I/I	I/V	V/V	
Caucásica (UK)	0.54 (44)	0.33 (27)	0.12(10)	0.39 (46)	0.47 (56)	0.14 (16)	H. Sakura et al. (1996) ^[75]
Afrocaribeña	---	---	---	0.91(32)	0.09(3)	0(0)	
Caucásica (Francia)	0.46 (52)	0.36 (41)	0.18 (20)	0.36 (69)	0.50 (94)	0.14 (26)	E.H. Hani et al. (1998) ^[64]
Mexicana	0.39 (16)	0.58 (24)	0.02 (1)	0.34 (32)	0.44 (41)	0.22 (20)	Tesis

(---) indica que no hay datos reportados en ese artículo.

CORRELACIÓN ENTRE LA VARIABLE *KIR6.2-I337V* Y LOS PARÁMETROS CLÍNICOS

Diabéticos tipo 2

Para ver la asociación entre el genotipo V/V del polimorfismo I337V y los parámetros antropométricos, bioquímicos y hormonales, se realizó un análisis estadístico bajo el modelo recesivo; se agruparon los datos de ambos grupos de diabéticos que presentaron dicho genotipo y se compararon contra los genotipos I/I e I/V (V/V vs I/I + I/V). No se encontró diferencia significativa entre las variables IMC, colesterol ni triglicéridos y el genotipo de riesgo V/V. (**Tabla 5.12**).

TABLA 5.12. ASOCIACIÓN DEL GENOTIPO V/V CON PARÁMETROS CLÍNICOS
Estadísticos de contraste^{a,b}

	IMC	Colesterol	Triglicéridos
Chi-cuadrado	.032	.939	1.799
gl	1	1	1
Sig. asintót.	.858	.333	.180

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Recl337V

Programa estadístico: SPSS V.15.0

Sin embargo, sí hubo diferencia significativa (**Tabla 5.13**, $p = 0.046$) en cuanto a la secreción de insulina, donde, los portadores del genotipo V/V tuvieron mayor concentración de esta hormona que los individuos I/I e I/V (15 UI/mL vs 12.3 UI/mL). Al igual que en el caso del genotipo K/K para la variante E23K, el aparente aumento de insulina plasmática se debe al uso de esta hormona como tratamiento terapéutico.

TABLA 5.13. ASOCIACIÓN DEL GENOTIPO V/V CON PARÁMETROS CLÍNICOS
Estadísticos de contraste^{a,b}

	Glucosa	Insulina	PéptidoC	Glucagon
Chi-cuadrado	.136	3.977	.411	.059
gl	1	1	1	1
Sig. asintót.	.712	.046	.521	.808

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Recl337V

Programa estadístico: SPSS V.15.0

Controles

Se realizó el mismo análisis estadístico bajo el modelo recesivo. No se encontraron cambios significativos en ninguna de las variables de interés (**Tabla 5.14** y **5.15**); no obstante, en este grupo sólo hubo un individuo con el genotipo V/V y cabe mencionar que presentó triglicéridos plasmáticos con valor de 240 mg/dL, muy por arriba del valor de referencia y superior, también, a la media grupal con genotipos I/I e I/V (124 mg/dL).

Resultó ser interesante el valor para la insulina plasmática 5.7 UI/mL, de esta misma persona V/V, y la media grupal (13.8 UI/mL). Si bien se encuentra dentro del intervalo de referencia, tiende más hacia el límite inferior y esto podría reflejar que el genotipo está relacionado con una secreción escasa de insulina.

TABLA 5.14. ASOCIACIÓN DEL GENOTIPO V/V CON PARÁMETROS CLÍNICOS
Estadísticos de contraste^{a,b}

	IMC	Colesterol	Triglicéridos
Chi-cuadrado	2.611	.000	2.315
gl	1	1	1
Sig. asintót.	.106	1.000	.128

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Recl337V

Programa estadístico: SPSS V.15.0

TABLA 5.15. ASOCIACIÓN DEL GENOTIPO V/V CON PARÁMETROS CLÍNICOS
Estadísticos de contraste^{a,b}

	Glucosa	Insulina	PéptidoC	Glucagon
Chi-cuadrado	1.830	.071	.205	1.841
gl	1	1	1	1
Sig. asintót.	.176	.790	.651	.175

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Recl337V

Programa estadístico: SPSS V.15.0

5.4.2.3 L270V y DT2

La variante L270V se encontró en menor frecuencia entre los grupos de estudio y sólo bajo el genotipo heterocigoto L/V. En el grupo de diabéticos de inicio temprano la frecuencia fue de 0%, en diabéticos de inicio tardío de 4% y en controles de 7.3%.

Al comparar las frecuencias con las ya reportadas por otros investigadores (**Tabla 5.16**), se encontró que en población mexicana el SNP L270V en la forma heterocigota es poco frecuente (0.02), a diferencia de la población caucásica (0.11 ó 0.12). En cuanto a la forma homocigota para el alelo menor GG (V270V o V/V), coincide con las otras poblaciones cuya frecuencia es casi nula.

TABLA 5.16. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DE L270V EN DIFERENTES POBLACIONES

Población	% Controles (n)			% Diabéticos tipo 2 (n)			Referencia
	L/L	L/V	V/V	L/L	L/V	V/V	
Caucásica (UK)	0.88 (73)	0.11 (9)	0.01 (1)	0.88 (89)	0.11 (11)	0.01 (1)	H. Sakura et al. (1996) ^[75]
Afro caribeña	---	---	---	0.97 (32)	0.03 (1)	0 (0)	
Caucásica (Francia)	0.92 (104)	0.08 (9)	0 (0)	0.88 (164)	0.12 (23)	0 (0)	E.H. Hani et al. (1998) ^[64]
Mexicana	0.93 (38)	0.07 (3)	0 (0)	0.98 (91)	0.02 (2)	0 (0)	<i>Tesis</i>

(---) indica que no hay datos reportados en ese artículo.

A pesar de la baja frecuencia de este polimorfismo, se compararon algunos parámetros de interés y se encontró que en el grupo de diabéticos los portadores del genotipo L/V tuvieron menor concentración plasmática de glucosa y triglicéridos (159.5 mg/dL y 157 mg/dL, respectivamente) que los diabéticos L/L (203.6 mg/dL y 220.4 mg/dL). Lo mismo se observó en el grupo de no diabéticos, quienes poseyeron el genotipo L/V mostraron menor concentración para glucosa y triglicéridos (70 mg/dL y 44 mg/dL, respectivamente) que los L/L (90.4 mg/dL y 132.5 mg/dL).

5.4.2.4 R325C y DT2

Se encontró un paciente diabético con este cambio, en forma heterocigota R/C y no se ha reportado asociación entre éste y la diabetes tipo 2.

Dentro de las características bioquímicas y hormonales de este individuo, destacan la concentración de triglicéridos y colesterol elevados por arriba de la media grupal (512 mg/dL y 262 mg/dL vs 178.5 mg/dL y 192.3 mg/dL, respectivamente); asimismo, la concentración de insulina y péptido C estuvieron por arriba de la media grupal (21.7 UI/mL

y 13.0 ng/mL vs 11 UI/mL y 5.2 ng/mL, respectivamente). Estos últimos datos pudieran resultar contradictorios si no se tiene presente que muchos de los pacientes diabéticos de inicio tardío se medican con sulfonilureas que promueven la secreción de esta hormona y por ende del péptido C.

5.4.3 Ensayo biológico

De acuerdo con los resultados de secuenciación, se escogieron siete muestras con las características que se reportan en la **Tabla 5.17**. En la **Fig. 5.8** se muestra la ubicación de éstas en la proteína.

TABLA 5.17. MUESTRAS PARA LA EXPRESIÓN HETERÓLOGA EN OVOCITO DE *X. LAEVIS*

Muestra	Polimorfismos	Característica	Grupo
A-20	E23E, L270L, R325R, I337I	Silvestre	Control
DM-55	E23K, L270V, I337V	Mutante	D. inicio tardío
D-73	E23K, I337V	Mutante	D. inicio temprano
D-62	K23K, V337V	Mutante	D. inicio temprano
D-43	E23K	Mutante	D. inicio temprano
D-55	K23K	Mutante	D. inicio temprano
DM-39	K23K, R325C, V337V	Mutante	D. inicio tardío

Sólo se probó la actividad biológica del canal de potasio ATP-sensible de la muestra DM-39, que presenta el nuevo polimorfismo R325C además de los ya estudiados como el E23K e I337V, estos últimos en forma homocigota para el alelo menor (K/K y V/V) y se comparó contra el canal silvestre (muestra A-20), que tuvo en forma homocigota los alelos mayores (E/E, L/L, R/R y V/V).

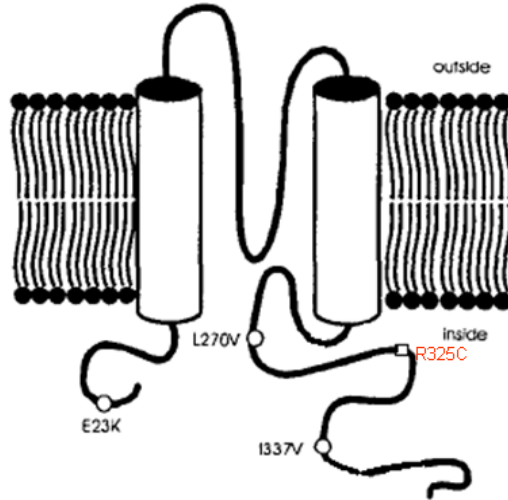


Fig. 5.8, Topología putativa de Kir6.2, muestra la localización de los polimorfismos identificados. E23K en el extremo amino terminal y L270V, R325C e I337V por El extremo carboxilo terminal.

Como el gen *Kir6.2* se compone de un solo exón, los productos de PCR de las muestras A-20 y DM-39 se ligaron al vector pGEM-T Easy y luego se utilizaron para la transformación de células competentes JM109. Se seleccionaron colonias aisladas para obtener el plásmido y comprobar mediante una digestión con *EcoRI* que se tenía el inserto esperado, *Kir6.2* de humano (**Figura 5.9**). Posteriormente se secuenciaron las clonas seleccionadas para verificar que la orientación del canal estuviera bajo el promotor T7.

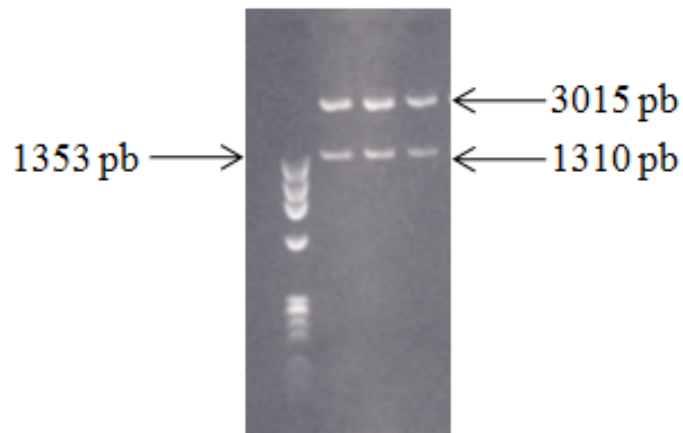


Fig. 5.9. Fotografía de gel de agarosa al 1.5%. Identificación de la clona con el fragmento *Kir6.2* de humano por digestión con la enzima *EcoRI*. Marcador de pares de bases: XΦ174 RF DNA I *Hae III*.

Una vez obtenidos los plásmidos con la secuencia de *Kir6.2* silvestre y mutante, se utilizaron para llevar a cabo la reacción de transcripción *in vitro*, es decir, la síntesis de ARNm que codifica para la subunidad Kir6.2 del canal de potasio ATP-sensible. Como primer paso se linearizó el plásmido con la enzima *SpeI* (**Figura 5.10**) y se utilizó para obtener el ARNm a través de la reacción de transcripción *in vitro* con la enzima T7 ARN polimerasa. El producto se cuantificó con el equipo NANODROP 1000 spectrophotometer, THERMO scientific y dio una concentración de 30 ng/μL para el ARNm del Kir6.2 silvestre y 35 ng/μL para Kir6.2 mutante.

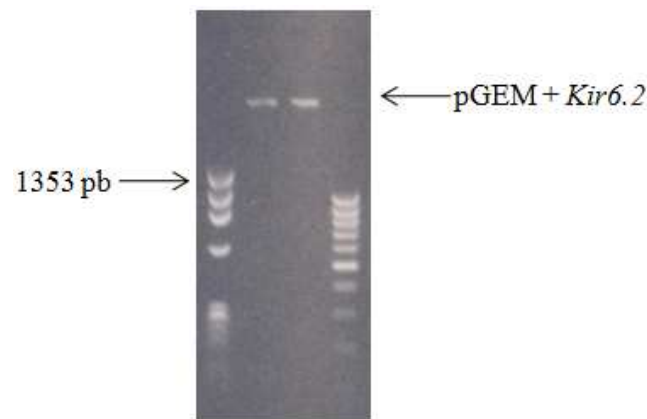


Fig. 5.10. Fotografía de gel de agarosa al 1.5%. Producto de la digestión de la construcción GEM+*Kir6.2* de humano por digestión con la enzima *SpeI*. Marcador de pares de bases: Φ 174 RF DNA I *Hae III* (izquierda) y 100 pb (derecha).

Se inyectaron ~2 ng de ARNm a cada ovocito de *Xenopus laevis* para su expresión, después de 1-4 días de la inyección, se estudiaron las corrientes de los ovocitos en función a la respuesta de cambios en el voltaje que se les impuso de acuerdo con el protocolo de pulsos específico para el canal de potasio ATP-sensible y la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos (**Fig. 5.11**):

Potencial de mantenimiento = -10 mV; Series de voltaje de -120 a 0 mV cada 20 mV; Tiempo de adquisición = 280 ms. Condiciones para el registro de corrientes: 18-24 °C en un medio de potasio 96 mM y pH 7.4 (ver **Apéndice I**).

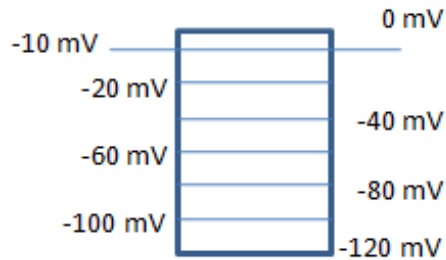


Fig. 5.11. Protocolo para el ensayo electrofisiológico en canales de potasio rectificadores entrantes (Kir6.2).

El protocolo anterior también se probó tanto en ovocitos nativos como controles (inyectados con agua destilada, libre de partículas y estéril) con el fin de tener un patrón para reconocer corrientes endógenas de estas células y compararlas con las corrientes registradas cuando Kir6.2, en su forma silvestre o mutante, se expresa.

Así, al analizar los **Gráficos 5.1, 5.2 y 5.3**, se observa una diferencia entre las corrientes endógenas de los ovocitos y aquellos que fueron inyectados con el ARNm, lo cual indica que la expresión fue adecuada y que al estimular a la célula con el protocolo de pulsos, el canal se abre permitiendo evaluar esta apertura como una corriente específica.

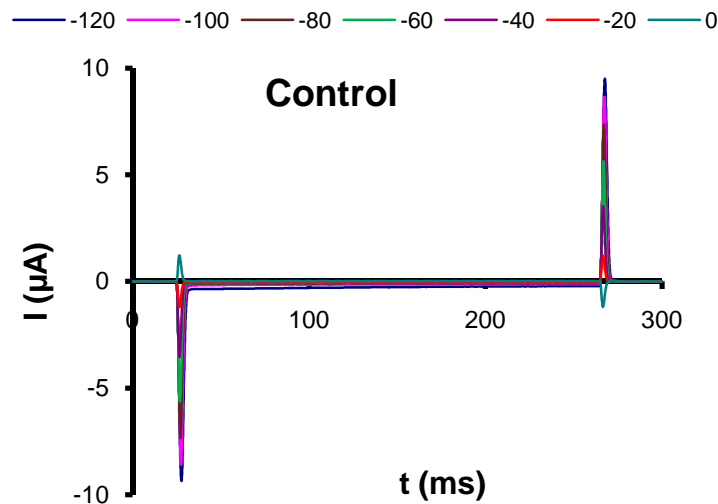


Gráfico 5.1. Corrientes endógenas. Trazos $I f(t)$ a diferentes pulsos de potencial. Registro de las corrientes generadas por ovocitos nativos inyectados con H_2O y sin inyectar.

Sin embargo, en la comparación entre los gráficos 5.2 y 5.3 hay diferencia entre la apertura del canal silvestre ($-2 \mu\text{A}$) y la del canal mutante ($> -5 \mu\text{A}$), que sugiere el efecto ocasionado por el ATP presente en el interior de ovocito y que el canal mutante, ha perdido la sensibilidad hacia este tipo de moléculas con efecto inhibitor ^[76].

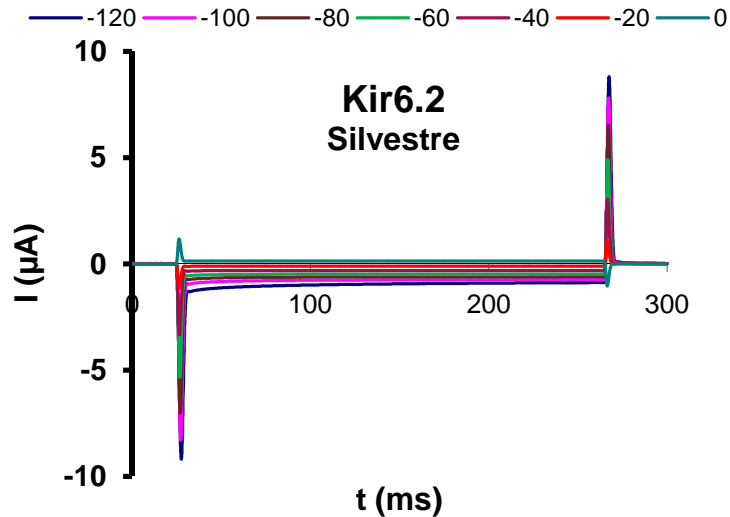


Gráfico 5.2. Expresión de ARNm de Kir6.2. Trazos $I f(t)$ a diferentes pulsos de potencial. Registro de las corrientes generadas por ovocitos inyectados con ARNm Kir6.2 silvestre.

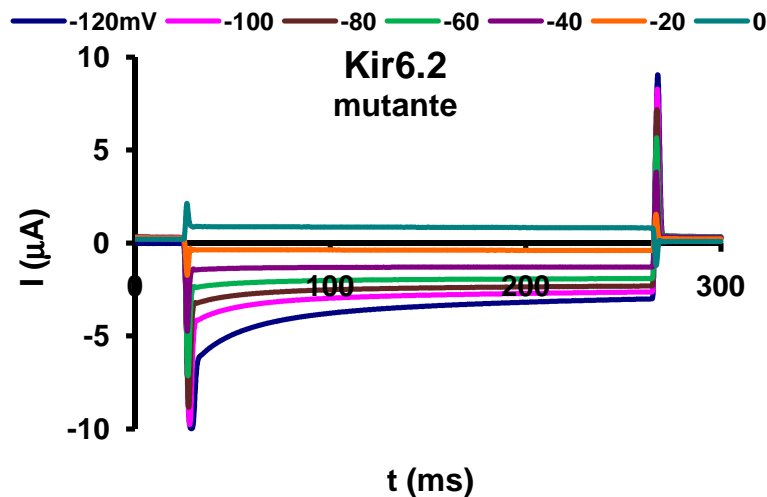


Gráfico 5.3. Expresión de ARNm de Kir6.2. Trazos $I f(t)$ a diferentes pulsos de potencial. Registro de las corrientes generadas por ovocitos inyectados con ARNm Kir6.2 mutante.

En el **Gráfico 5.4**, se muestra el comportamiento de las corrientes en los ovocitos al pulso de -120 mV y al tiempo de 40 ms. Se observa cómo el canal mutante permite el paso de mayor corriente, a diferencia del silvestre. El ovocito nativo nos muestra la forma natural en que pasan las corrientes a través de la membrana del ovocito, al aplicar el protocolo antes descrito.

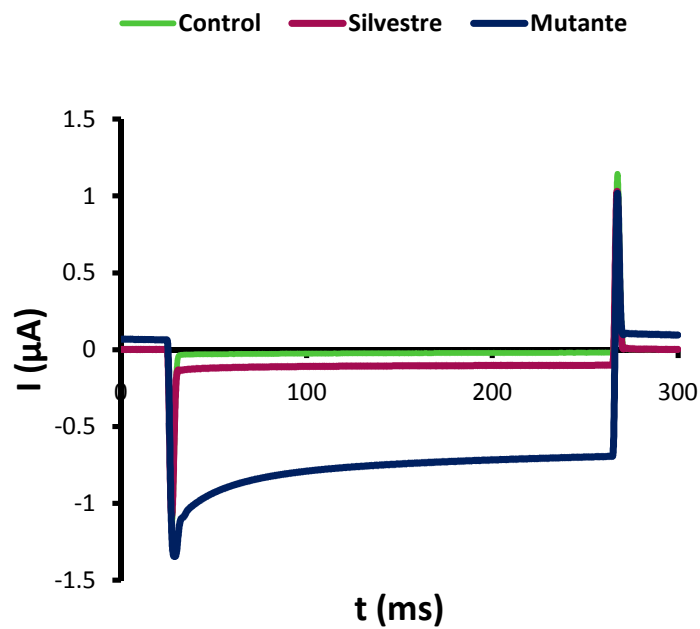


Gráfico 5.4, Flujo de iones K^+ en ovocitos de *Xenopus laevis* al pulso de -120 mV y 40 ms. Control: ovocito con y sin inyección de agua; Silvestre: ovocito inyectado con ARNm sin polimorfismos y Mutante: ovocito inyectado con ARNm-K23K-R325C-V337V.

El **Gráfico 5.5** presenta los trazos de la corriente normalizada en función del potencial, se observa diferencia estadísticamente significativa entre la actividad del canal mutante y el silvestre ($n = 15$; 5 registros de 3 lotes diferentes, $p = 0.045$).

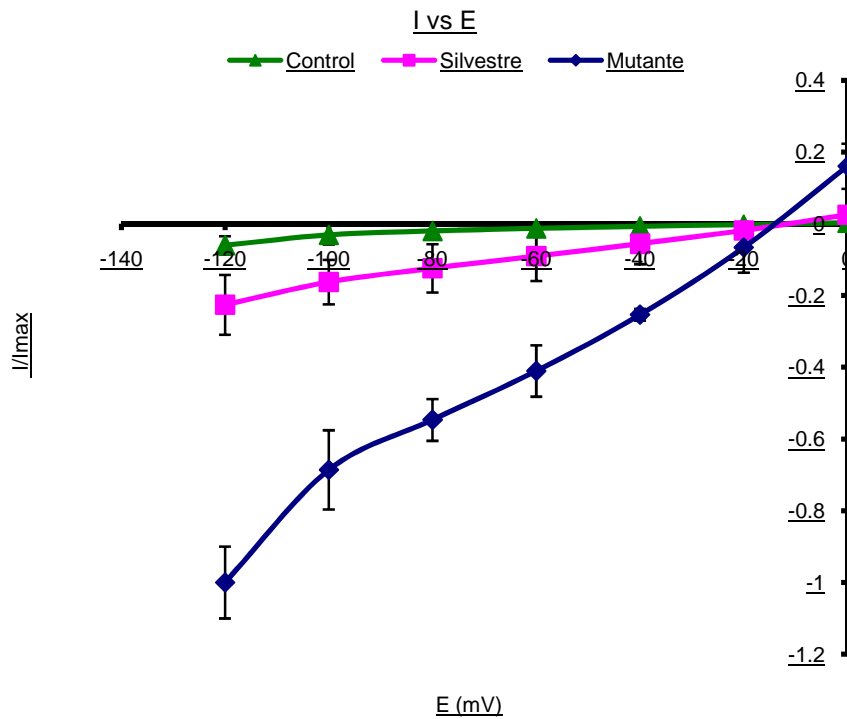


Gráfico 5.5, Corriente *versus* Potencial (I vs E). Muestra el comportamiento de los canales silvestre y mutante al tiempo de 40 ms y al pulso de -120 mV. Control: ovocito con y sin inyección de agua; Silvestre: ovocito inyectado con ARNm sin polimorfismos y Mutante: ovocito inyectado con ARNm-K23K-R325C-V337V.

6. DISCUSIÓN

Ante la problemática actual de la diabetes tipo 2, este trabajo de investigación pretende encontrar polimorfismos en genes que participan en la morfogénesis pancreática (*Nkx2.2* y *Nkx6.1*) y en la secreción de insulina como *Kir6.1* que codifica para la subunidad del canal de potasio ATP-sensible (K^+ -ATP), cuya presencia se asocia con la susceptibilidad al desarrollo de diabetes tipo 2.

Los resultados de esta investigación revelaron asociación entre los polimorfismos E23K e I337V, ambos homocigotos para el alelo menor, del gen *Kir6.2* y la susceptibilidad a desarrollar diabetes tipo 2 de inicio temprano en población mexicana (OR = 1.917 (1.049-3.503) $p = 0.003$ y OR = 2.054 (1.092-3.804) $p = 0.024$, respectivamente).

Al evaluar el estado metabólico de los grupos diabéticos, se observó que la glicemia es un factor difícil de controlar, ya que ambos grupos presentaron glucosa plasmática elevada a pesar de que el 100% de los pacientes contaba con tratamiento basado en hipoglucemiantes orales y un 20% empleaba terapia combinada con insulina. La concentración de triglicéridos también se encontró elevada en pacientes diabéticos de inicio temprano ($p < 0.001$) y esto pudiera representar una dislipidemia secundaria debida a la hiperglucemia^[77].

Dentro de los parámetros hormonales, se observó diferencia significativa en la concentración de péptido C ($p < 0.0001$) y fue el grupo de diabéticos de inicio tardío quien presentó mayor concentración de éste. Este parámetro es importante pues evidencia cómo pacientes diabéticos de inicio temprano, a pesar de ser tratados con fármacos que estimulan la secreción de insulina, no responden de la misma forma que los diabéticos de inicio tardío, es decir; la respuesta es escasa probablemente porque la funcionalidad de las células y el número están mucho más reducidos. Esto puede sustentarse con estudios que afirman que las sulfonilureas aceleran la pérdida de masa y función de las células β pancreáticas^[78, 79].

La concentración de glucagon también presentó diferencia significativa ($p=0.007$) y esto concuerda con el cuadro clínico de la diabetes en un estadio más avanzado, en el cual

se ve afectada la secreción de esta hormona por efecto de la hiperplasia de las células α pancreáticas [80].

La ausencia de polimorfismos en los genes *Nkx2.2* y *Nkx6.1* sugiere que existe una alta conservación en estos factores de transcripción, y que cambios en ellos podrían comprometer la sobrevivencia del individuo; tal como se muestra en múltiples modelos animales que al ser modificados en estos genes presentan un cuadro de diabetes y en pocos días sobreviene la muerte [10, 81, 82].

En el gen *Kir6.2* se encontraron cuatro polimorfismos de sentido erróneo y dos de ellos (E23K e I337V) presentaron asociación con diabetes tipo 2 de inicio temprano. Incluso al compararse con las frecuencias encontradas en otras poblaciones, el SNP E23K destacó entre los más altos con una frecuencia de 0.23, siendo menor por 4 centésimas de la frecuencia más alta 0.27, reportada en población caucásica (**Tabla 5.5**). También el SNP I337V fue el mayor de los hasta ahora reportados (**Tabla 5.11**).

Mediante una regresión logística multinomial y bajo un modelo recesivo (K/K vs E/E + E/K), se determinó la asociación del genotipo E23K y la manifestación de diabetes tipo 2 de inicio temprano ($p = 0.002$). Asimismo, se observó que los individuos diabéticos con doble copia del alelo de riesgo (K/K) son más propensos a tener concentraciones elevadas de triglicéridos (333.4 mg/dl; $p = 0.054$) que los individuos con genotipo diferente.

Esta misma tendencia se observó en los sujetos control con genotipo K/K que mostraron concentración elevada de triglicéridos, estadísticamente significativa (258 mg/dl; $p = 0.016$). Lo cual sugiere que el polimorfismo *per se* está asociado con triglicéridos plasmáticos elevados y que predispone a la obesidad y falla en la homeostasis de glucosa; tal como lo han informado otros investigadores que encontraron asociación entre K23K e $IMC > 25$, así como elevada concentración de ácidos grasos libres en los sujetos que lo portan. [83, 84]

Una explicación fisiológica a estos sucesos pudiera ser que el SNP K23K hace más sensible al canal K_{ATP} al efecto activador de los ácidos grasos de cadena larga libres, a la vez que lo mantiene abierto durante más tiempo y esto ocasionaría disminución de la

actividad eléctrica de la célula β y, por tanto, escasa secreción de insulina con la consecuente falla en la homeostasis de la glucosa [85, 86, 87]. Se sabe que la insulina inhibe la lipólisis y al carecer de la acción de esta hormona, los ácidos grasos continúan liberándose como forma de energía alterna. Esto se convierte en un círculo vicioso, pues también se sabe que el aumento de los ácidos grasos libres promueve la insulinoresistencia [88].

En cuanto a la concentración de insulina plasmática y la asociación entre esta variante, se observó que los diabéticos K/K tuvieron mayor concentración que el resto de ellos (21.6 UI/ml; $p = 0.048$). Lo cual parece contradictorio, pero debe tenerse en cuenta que varios de los pacientes estaban siendo tratados con insulina. Así, al correlacionar esta variante en no diabéticos se observó que los portadores del genotipo K/K presentaron, de manera significativa, menor concentración de insulina plasmática (3.7 UI/ml; $p = 0.012$) y resulta interesante porque sugiere que esta variante *per se*, en la forma homocigota para el alelo menor, predispone a la baja secreción de esta hormona. El mecanismo por el cual ocurre este fenómeno se ha estudiado ampliamente y se ha observado que en el cambio del ácido glutámico 23 por lisina, en el canal de potasio ATP-sensible, ocasiona que el canal sea más activo al perder la afinidad por el ATP que lo inhibe. [89]

La variante I337V del gen *Kir6.2*, también se analizó bajo el modelo recesivo (V/V vs I/I + I/V) y se encontró que los diabéticos con genotipo V/V presentaron mayor concentración de insulina (15 UI/ml; $p = 0.046$) que el resto del grupo. Como se mencionó anteriormente, el dato no refleja el estado hormonal del paciente debido a la administración de insulina en el 20% de los pacientes. En el caso del grupo control, no se halló asociación entre este genotipo y la baja concentración de insulina en el plasma (**Tabla 5.15**).

El polimorfismo L270V del gen *Kir6.2* se encontró sólo como heterocigoto y con baja frecuencia: dos individuos en el grupo de diabéticos tipo 2 de inicio tardío, ninguno en diabéticos tipo 2 de inicio temprano y tres en el grupo control. De manera consistente con otras frecuencias descritas (**Tabla 5.16**) esta variante no se ha asociado con diabetes tipo 2, incluso se ha encontrado que personas con polimorfismo L/V presentaron mayor concentración de insulina plasmática que los homocigotos L/L ($p = 0.0063$). [75]

De manera notable, se observó que los diabéticos con genotipo L/V tuvieron menor concentración plasmática de glucosa y triglicéridos que aquellos con genotipo L/L (159.5 mg/dl vs 203.6 mg/dl y 157 mg/dl vs 220.4 mg/dl, respectivamente). La misma tendencia se observó en personas no diabéticas, menor glucosa y triglicéridos plasmáticos en personas portadoras del genotipo L/V (70 mg/dl vs 90.4 mg/dl y 44 mg/dl vs 132.5 mg/dl, respectivamente). Este hallazgo podría sugerir que el SNP L270V tiene efecto protector o que contrarreste el efecto de las variantes E23K e I337V, no obstante para aseverar esto se necesita comprobar con estudios de actividad biológica.

Una persona del grupo de diabéticos tipo 2 de inicio tardío presentó la variante R325C en el gen *Kir6.2*, la cual no ha sido reportada *ergo*, no hay evidencias de asociación entre ésta y la diabetes tipo 2. Además, se encontraron en el mismo individuo, las variantes K23K y V337V. Dentro de sus características bioquímicas y hormonales, destacan la concentración de triglicéridos y colesterol elevados y por arriba de la media grupal (512 mg/dl vs 178.5 mg/dl y 262 mg/dl vs 192.3, respectivamente). Asimismo, la concentración de insulina y péptido C estuvieron por arriba de la media grupal (21.7 UI/ml vs 11 UI/ml y 13.0 ng/ml vs 5.2 ng/ml, respectivamente). Estos últimos datos son poco confiables, si se tiene presente que muchos de los pacientes diabéticos de inicio tardío son tratados con sulfonilureas que promueven la secreción de esta hormona y por ende de péptido C.

Para determinar si el polimorfismo R325C compromete la funcionalidad del canal de potasio ATP-sensible, se realizó un ensayo biológico que consistió en la expresión de dicho canal en ovocitos de *Xenopus laevis* (vía inyección del ARNm sintetizado a partir del producto de la PCR del gen *Kir6.2* perteneciente al paciente diabético tipo 2 de inicio tardío) y su posterior evaluación por la técnica de fijación voltaje con 2 microelectrodos.

Se encontró que el canal mutante (K23K-R325C-V337V) tuvo mayor actividad que el canal silvestre (E23E-R325R-I337I) (**Gráfico 5.4 y 5.5**), pues permitió el paso de más corriente. Este comportamiento se debe a la presencia del ATP en el interior del ovocito (aproximadamente 2.3 mM)^[76], pues de acuerdo con lo ya reportado, el canal silvestre es sensible al ATP y éste, a su vez, lo bloquea al tiempo que favorece la despolarización de la membrana de la célula β y la consecuente secreción de los gránulos de insulina.^[90, 91]

Por el contrario, el canal con los polimorfismos E23K e I337V pierde sensibilidad al ATP al tiempo que gana función porque permanece por más tiempo abierto, entonces se retarda el proceso de despolarización de la membrana y por ende la secreción de insulina.^[90, 91]

Así, la actividad del canal silvestre disminuyó en presencia del ATP citosólico del ovocito y la del canal mutante aumentó ya que perdió la sensibilidad al ATP. Sin embargo, es necesario estudiar la actividad del polimorfismo R325C de manera aislada para ver su efecto verdadero, pues al estar acompañado de las otras dos variables pudiera ocultarse su efecto en la función del canal K_{ATP} . También tendría que considerarse el uso de otras técnicas electrofisiológicas como el *Patch Clamp*, cuya precisión daría resultados más fidedignos acerca del comportamiento del canal debido al polimorfismo.

7. CONCLUSIONES

- En el gen *Kir6.2* se encontraron 4 cambios de sentido erróneo E23K, L270V, R325C e I337V, mientras que los genes *Nkx2.2*, *Nkx6.1* no presentaron polimorfismos.
- Las variantes E23K e I337V del gen *Kir6.2*, en su forma homocigota para el alelo menor, presentaron riesgo asociado a DT2 de inicio temprano [OR=1,917 (1.049-3.503) p=0,003 y OR=2.054 (1.092-3.804) p=0.024, respectivamente].
- Las variantes L270V y R325C del gen *Kir6.2*, que se presentaron con baja frecuencia no mostraron susceptibilidad al desarrollo de diabetes tipo2.
- El genotipo K/K para el polimorfismo E23K se correlacionó positivamente con los triglicéridos plasmáticos elevados y la baja secreción de insulina.
- El genotipo L/V del polimorfismo L270V parece estar relacionado con bajas concentraciones de glucosa y triglicéridos.
- Las mutaciones en las posiciones K23K, R325C y V337V repercuten positivamente en la actividad del canal de potasio ATP-sensible, y en consecuencia impiden la secreción de insulina.

8. APÉNDICE I

Insulina

Reactivos:

- Insulina ¹²⁵I
- Calibradores para insulina marcados de A-G con: 0, 5, 15, 50, 100, 200 y 350 μ UI/mL

Materiales:

Contador gamma

Vórtex

Pipetas volumétricas de 6 y 3 mL

Micropipeta de 50 y 150 μ L

Puntas desechables para micropipetas

Pipeta repetidora de 100 μ L y 1 mL

Tubos de ensayo de polipropileno de 12 x 75 mm

Gradilla para tubos de 12 x 75 mm

Gradilla de esponja para decantación

Preparación de reactivos:

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

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

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

Glucagon

Reactivos:

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

Materiales:

Contador gamma

Vórtex

Centrífuga refrigerada

Pipeta volumétrica de 1.0 mL

Pipeta graduada de 5 y 10 mL

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

Puntas desechables para micropipetas

Pipeta repetidora de 100 μL y 1 mL

Tubos de vidrio de 12 x 75 mm

Gradilla para tubos de 12 x 75 mm

Gradilla de esponja para decantación

Preparación de reactivos:

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

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

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

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

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

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

Péptido C

Reactivos:

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

Materiales:

Contador gamma

Vórtex

Centrífuga con refrigeración

Pipeta volumétrica de 10.0 mL

Micropipeta de 50 y 150 µL

Puntas desechables para micropipetas

Pipeta repetidora de 100 µL y 1 mL

Tubos de plástico o vidrio de 12 x 75 mm

Gradilla para tubos de 12 x 75 mm

Gradilla de esponja para decantación

Preparación de Reactivos:

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

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

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

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

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

Extracción de ADN

Reactivos:

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

Materiales:

Hielera

Centrífuga refrigerada

Gradilla para tubos Falcon de 50 mL

Gradilla para tubos Falcon de 15 mL

Gradilla para tubos eppendorf

Vasos de precipitado de 250 mL

Vaso de precipitado de 500 mL para decantar

Pipetas volumétricas de 5 mL

Propipeta

Micropipetas de 100 y 1000 μ L

Puntas desechables para micropipetas

Pipetas Pasteur selladas de la punta

Tubos Falcon de 15 mL

Tubos eppendorf de 1.5 mL estériles

Tubos eppendorf de 500 μ L estériles

Baño María con agitación y Baño de Temperatura

Preparación de Reactivos:

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

Tris-Base 2.42 g (0.02 M)

MgCl₂ 2.03 g (0.01 M)

Tritón 100X 10 mL (2%)

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

Mezclar en el agitador magnético hasta que se homogenice.

Ajustar el pH a 7.6

Aforar a 1 L

Filtrar con membrana

Almacenar a 4 °C

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

Buffer Lisis Nuclear: Tris-Base 1.21 g (10 mM)
NaCl₂ 23.4 g (400 mM)
Na₂EDTA 0.75 g (2 mM)

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

Mezclar en el agitador magnético hasta que se homogenice

Aforar a 500 mL

Esterilizar en autoclave

Almacenar a Temperatura ambiente

Proteinasa K 5mg/mL: pesar 50 mg de la proteinasa (0.050 g); llevar a 10 mL; mezclar completamente y hacer alícuotas de 500 µL. Almacenar a -20 °C.

NaCl saturado: disolver 35 g de NaCl en 100 mL de agua desionizada, solubilizar lo más posible hasta que quede una capa de sal en el fondo. Almacenar a temperatura ambiente.

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

Buffer TE: tomar 1 mL de Tris/HCL 10 mM a pH 8.0, agregar 200 µL de EDTA 0.5 M a pH 8.0, aforar a 100 mL y almacenar a temperatura ambiente.

Tris/HCl 10 mM a pH8.0: pesar 30.275 g de Tris/HCl, disolver con 150 mL de agua desionizada, ajustar el pH a 8.0, aforar a 250 mL y almacenar a temperatura ambiente.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Reactivos:

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

Enzimas:

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

Equipo de electroforesis:

Fuente de poder

Cámara electroforética

Gel de agarosa al 1%

Buffer 1X

Ácidos nucleicos y oligonucleótidos:

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

Material y Equipo especial:

Termociclador

Tubos eppendorf para PCR (pared delgada) estériles

Micropipetas de 2, 20 y 100 µL

Puntas desechables y estériles para micropipetas

Baño de hielo

Preparación de reactivos:

Buffer 10X para la Taq polimerasa (Promega):

60 µL de MgCl₂ 25 mM + 40 µL de Buffer 10X
Guardar a -20 °C

Solución de dNTPs (20 mM, pH 8.0):

Para 10 mM se colocan 25 µL de dATP, dTTP, dCTP y dGTP
Aforara a 400 µL con 300 µL de super agua
Guardar a -20 °C

Agua bidestilada y estéril: Se filtra por una membrana de 0.45 μm y se esteriliza en autoclave.

Análisis polimórfico conformacional de cadena simple (SSCP)

Reactivos:

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

Geles:

Gel neutro de poliacrilamida al 5.4% sin glicerol

Gel neutro de poliacrilamida al 5.4% con glicerol

Gel neutro de poliacrilamida al 8.0% sin glicerol

Gel neutro de poliacrilamida al 8.0% con glicerol

Materiales y Equipo especial:

Tubos eppendorf de 500 μL estériles

Micropipetas de 10 μL y 50 μL

Puntas desechables estériles para micropipetas

Baño de hielo

Termociclador

Cámara de Electroforesis Vertical

Fuente de poder

Peines y espátula

Papel Filtro

Desecador de geles

Cartucho para placas de rayos X

Recipiente de desechos líquidos radiactivos

Recipiente de desechos sólidos radiactivos

Preparación de reactivos:

dNTPs para SSCP:

Para una concentración de 10 mM se colocan en un tubo eppendorf de 0.5 mL

25 μ L de dATP, dTTP y dGTP, respectivamente.

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

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

Guardar a -20 °C

Buffer de carga para SSCP:

Azul de bromofenol 25 mg

Cianol-Xileno 25 mg

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

Gel neutro de poliacrilamida al 5.4% sin glicerol:

Agua destilada 42.9 mL

TBE 5X 14.0 mL

Acrilamida:Bisacrilamida 30% 12.6 mL

Para un volumen de 70 mL, degasificar con agitación al vacío durante 5', adicionar 1 mL de persulfato de amonio al 10% y 15 μ L de TEMED.

Gel neutro de poliacrilamida al 5.4% con glicerol:

Agua destilada 35.9 mL

Glicerol 7.0 mL

TBE 5X 14.0 mL

Acrilamida:Bisacrilamida 30% 12.6 mL

Para un volumen de 70 mL, degasificar con agitación al vacío durante 5', adicionar 1 mL de persulfato de amonio al 10% y 15 μ L de TEMED.

Gel neutro de poliacrilamida al 8.0% sin glicerol:

Agua destilada 36.85 mL

TBE 5X 14.0 mL

Acrilamida:Bisacrilamida 30% 18.6 mL

Para un volumen de 70 mL, degasificar con agitación al vacío durante 5',
adicionar 1 mL persulfato de amonio al 10% y 15 μ L de TEMED.

Gel neutro de poliacrilamida al 8.0% con glicerol:

Agua destilada 29.85 mL

Glicerol 7.0 mL

TBE 5X 14.0 mL

Acrilamida:Bisacrilamida 30% 18.6 mL

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

Cultivo celular

Medio LB (por litro):

10 g de triptona

5 g de extracto de levadura

5 g de NaCl

Ajustar a pH 7.0 con NaOH

Placas de LB con ampicilina:

Adicionar 5 g de agar a un litro de medio LB. Esterilizar con autoclave.
Permitir que el medio se enfríe ~ 50 °C antes de agregar la ampicilina en una
concentración final de 100 μ g/mL. Verter de 30-35 mL de medio en cajas
petri de 85 mm. Dejar que solidifique el agar y almacenar a 4 °C.

Solución stock de IPTG (0.1 M):

1.2g IPTG

Adicionar agua hasta un volumen final de 50 mL. Filtrar (0.22 μ m) y
almacenar a 4 °C.

X-Gal (2 ml):

100 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactosido

Disolver en 2 mL de N,N'-dimetil-formamida. Cubrir con aluminio y
almacenar a -20 °C.

Placas de medio LB con ampicilina/IPTG/X-Gal:

A las placas de medio LB se les agregan 100 μ L de una solución de IPTG
100 mM y 20 μ L de una solución de X-Gal 50 mg/ mL. Dejar que se
absorban durante 30 min a 37 °C antes de usarse.

Medio SOC (100 ml):

2.0 g de triptona
0.5 g de extracto de levadura
1 mL de NaCl 1 M
0.25 mL de KCl 1 M
1 mL de solución stock Mg^{2+} 2 M, filtrado (0.22 μ m)
1 mL de glucosa 2 M, filtrada (0.22 μ m)

Adicionar la triptona, el extracto de levadura, el NaCl y el KCl a 97 mL de agua destilada. Disolver con agitación. Esterilizar en autoclave y enfriar a temperatura ambiente. Adicionar el stock de Mg^{2+} 2 M y la glucosa 2 M, cada uno con concentración final de 20 mM. Llevar a 100 mL con agua destilada y estéril. El pH final debe ser de 7.0.

Stock de Mg^{2+} 2M:

20.33 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
24.65 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$
Adicionar agua destilada para 100 mL. Filtrar (0.22 μ m).

Electrofisiología

Solución de Barth (mM):

88 NaCl
1 KCl
0.41 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
2.4 $NaHCO_3$
0.82 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
0.33 $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$
20 HEPES
Ajustar a pH 7.5

ND96(mM):

90 KCl (3.35 g)
1 $MgCl_2$ (0.0474 g)
1.8 $CaCl_2$ (0.0998 g)
5 HEPES (0.5957 g)
Disolver en 500 mL de agua destilada, ajustar pH a 7.4 con KOH 1 M, filtrar (0.22 μ m) y almacenar a 4 °C.

9. APÉNDICE II

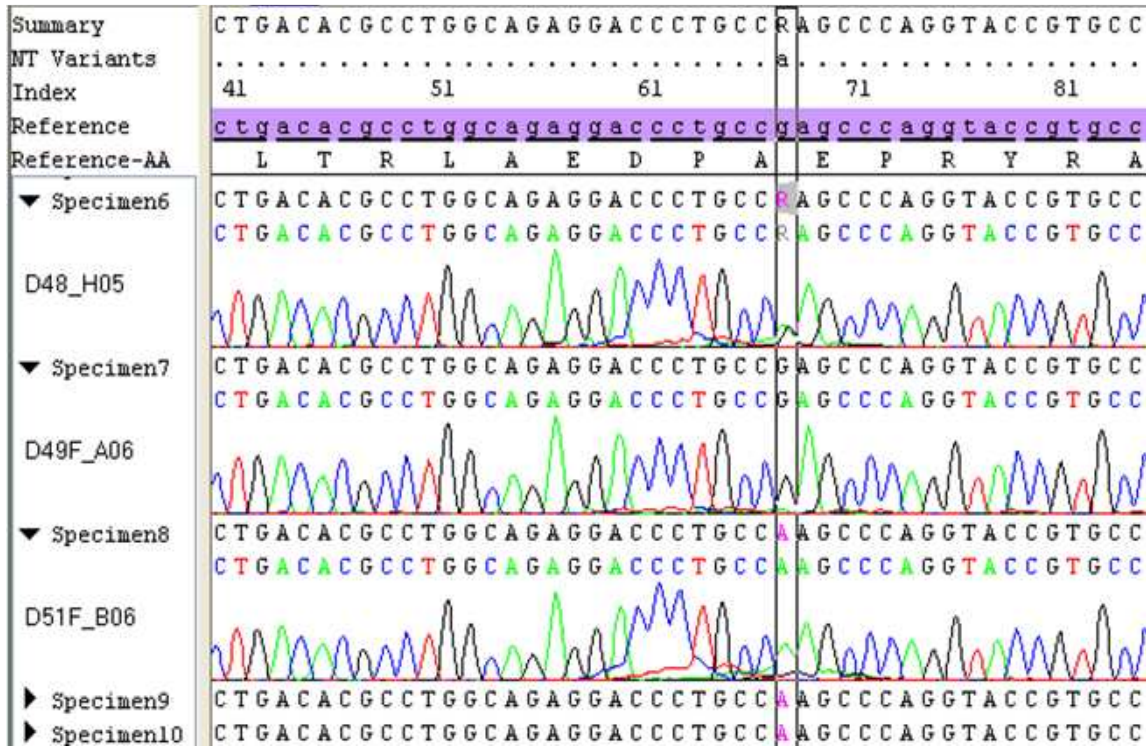


Fig. 5.4, Electroferogramas del exón único del gen *Kir6.2*, analizados mediante el programa SeqScape v2.6. R = guanina y/ o adenina; G = guanina y A= adenina.

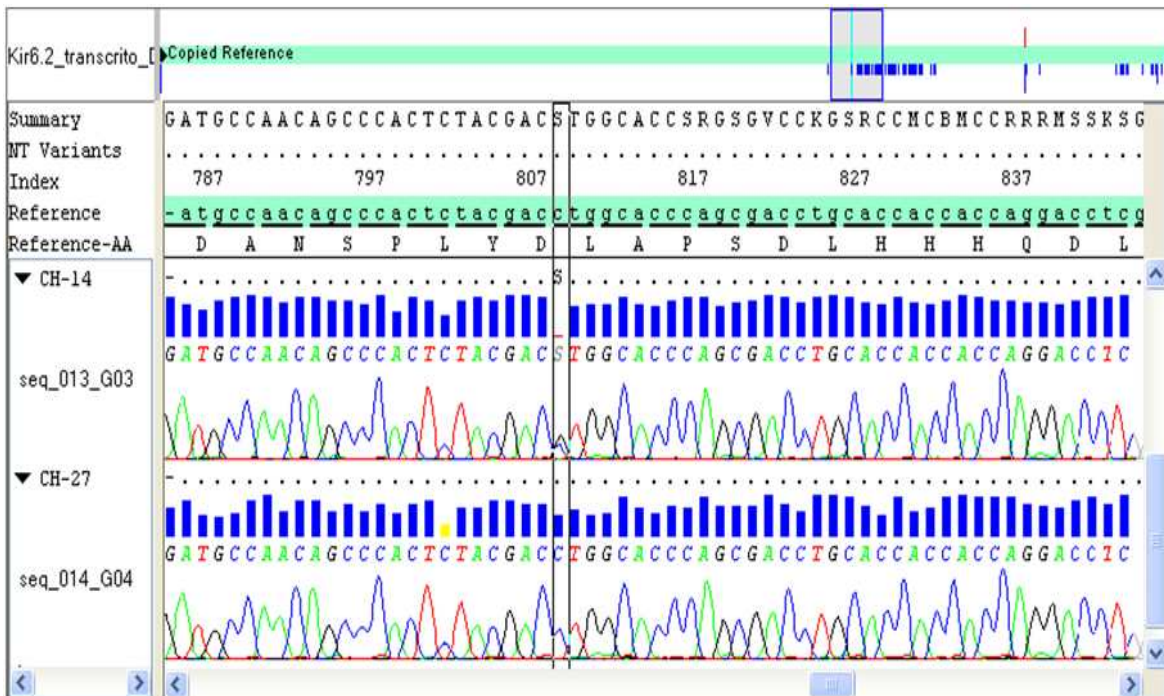


Fig. 5.5, Electroferogramas del exón único del gen *Kir6.2*, analizados mediante el programa SeqScape v2.6. S = citosina y/ o guanina; C= citosina y G = guanina.

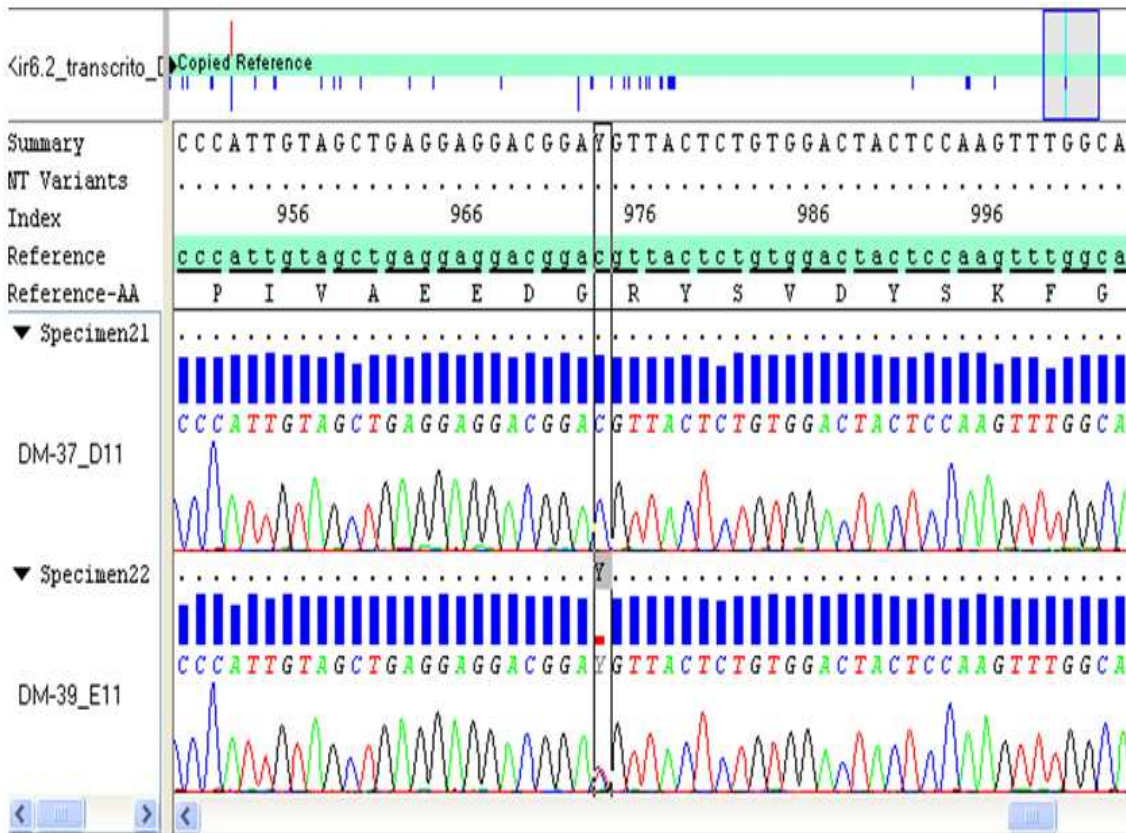


Fig. 5.6, Electroferogramas del exón único del gen *Kir6.2*, analizados mediante el programa SeqScape v2.6. Y = citosina y/ o timina; C = citosina y T= timina.

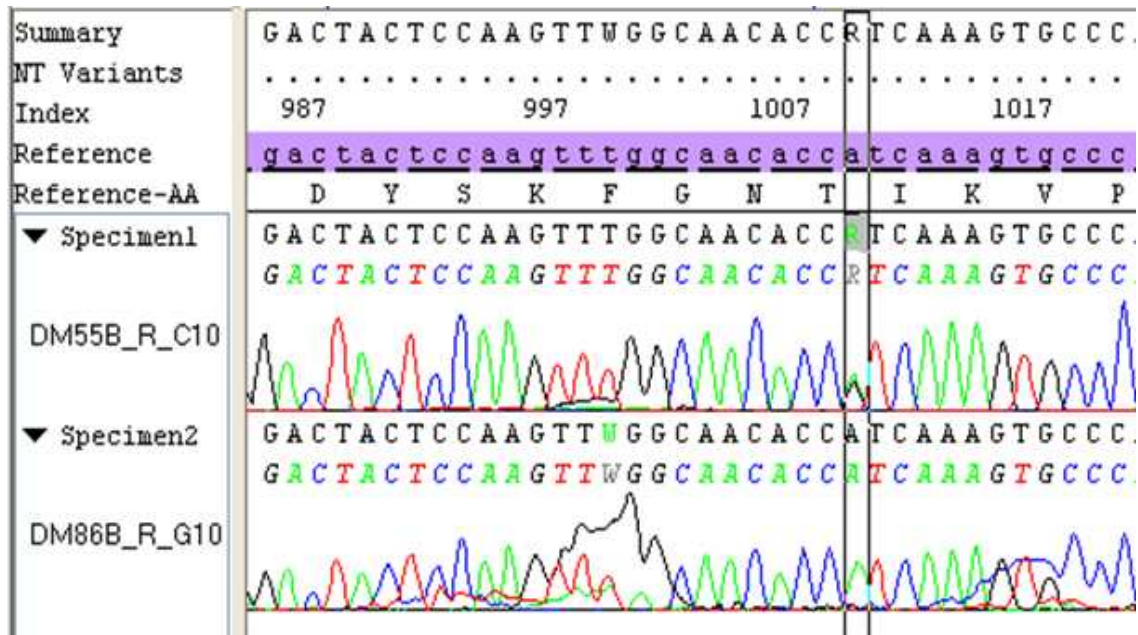


Fig. 5.7, Electroferogramas del exón único del gen *Kir6.2*, analizados mediante el programa SeqScape v2.6. R = guanina y/ o adenina, G= guanina y A= adenina.

10. APÉNDICE III



HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN, LAB. DE ENDOCRINOLOGÍA MOLECULAR

CARTA CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN LA INVESTIGACIÓN:

México D.F. _____

A quien corresponda:

Yo, el (la) abajo suscrito(a) _____ de ____ años de edad, en forma libre y voluntaria acepto participar en el estudio **“Evaluación molecular de los genes *Nkx2.2*, *Nkx6.1* y *Kir6.2* en pacientes diabéticos tipo 2”**, cuyo objetivo es identificar los genes responsables de la diabetes tipo 2, en población Mexicana.

Se me ha informado sobre la importancia del estudio, los motivos, duración y forma en que se llevará a cabo; así como la manera y condiciones en las que se me tomará la muestra de sangre. Se me ha otorgado la oportunidad para hacer preguntas sobre el estudio y quedo satisfecho sobre la información y respuestas recibidas.

Nombre del paciente: _____

Dirección: _____

Firma: _____

Nombre y Firma del investigador: _____



“Evaluación de los genes Nkx2.2, Nkx6.1 y Kir6.2 en pacientes diabéticos tipo 2”



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 con diabetes tipo 2? _____

Observaciones

Ingiere alcohol: _____ poco _____ moderadamente _____ frecuentemente _____

Toma refresco: _____ poco _____ moderadamente _____ frecuentemente _____

Fuma: _____ poco _____ moderadamente _____ frecuentemente _____

Jugos / fruta fresca: / / poco / / moderadamente / / frecuentemente / /

Café / atole: / / poco / / moderadamente / / frecuentemente / /

Pan / tortillas / pan dulce: / / / poco / / / moderado / / / frecuente / / /

Huevo / carne / frijoles: / / / poco / / / moderado / / / frecuente / / /

Verduras de hoja verde / zanahoria / chayote / papa: _____ poco _____ moderado _____ frecuente _____

Realiza ejercicio: _____ ¿Cuál? _____

11. BIBLIOGRAFÍA

1. The Expert committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.** *Diabetes Care* (2000); 26: 5-20.
2. Moore KL, Persaud TVN. **The developing human. Clinically oriented embryology.** 8^a Ed; Elsevier saunders (2009).
3. Lewin B, Aguilera-López A. **Genes.** 2^a Ed; Reverté S.A. (1994).
4. Hill DJ, Duvillié B. **Pancreatic Developmet and Adult Diabetes.** *Gediatric Reserch* (2000); 48: 269-274.
5. Habener JF, Kemp DM, Thomas MK. **Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development.** *Endocrinology* (2005), 146: 1025-1034.
6. Laybutt DR, Glandt M, Xu G, Ahn YB, Trivedi N, Bonner-Weir S, Weir GC. **Critical Reduction in β -cell mass results in two distinct outcomes over time.** *J Biol Chem* (2003); 278: 2997-3005.
7. Henseleit KD, Nelson SB, Kuhlbrodt K, Hennings JC, Ericson J, Sander M. **NKX6 transcription factor activity is required for α - and β -cell development in the pancreas.** *Development* (2005); 132: 3139-3149.
8. Yokoi N, Kanamori M, Horikawa Y, Takeda J, Sanke T, Furuta H, Nanjo K, Mori H, Kasuga M, Hara K, Kadowaki T, Tanizawa Y, Oka Y, Iwami Y, Ohgawara H, Yamada Y, Seino Y, Yano H, Cox NJ, Seino S. **Association studies of variants in the genes involved in pancreatic β -cell function in type 2 diabetes in Japanese subjects.** *Diabetes* (2006); 55: 2379-2386.
9. Wang J, Elghazi L, Parker SE, Kizilocak H, Asano M, Sussel L, Sosa-Pineda B. **The concerted activities of Pax4 and Nkx2.2 are essential to initiate pancreatic beta cell differentiation.** *Dev Biol* (2004); 266:178–189.
10. Doyle MJ, Loomis ZL, Sussel L. **Nkx2.2-repressor activity is sufficient to specify cells and a small number of cells in the pancreatic islet.** *Development* (2007); 134: 515-523.
11. Prado CL, Pugh-Bernard AE, Elghazi L, Sosa-Pineda B, Sussel L. **Ghrelin cells replace insulin-producing β cells in two mouse models of pancreas development.** *Proc Natl Acad Sci USA* (2004); 101: 2924-2929.
12. Ogihara T, Fujitani Y, Uchida T, Kanno R. **Combained expresión of transcription factors induces AR42J-B13 cells to differentiate into insulin-producing cells.** *Endocr J* (2008); 55: 691-8.
13. Sussel L, Kalamaras J, Hartigan-O'Connor DJ, Meneses JJ, Pedersen RA, Rubenstein JR, German MS. **Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic β cell.** *Development* (1998); 125: 2213-222.
14. Sander M, German MS. **The beta cell transcription factors and development of the pancreas.** *J Mol Med* (1997); 75: 327-340.
15. Furuta H, Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M, Sussel L, Le Beau MM, Davis EM, Ogata M, Iwamoto Y, German MS, Bell GI. **β -Cell transcription factors and diabetes. Mutations in the coding region of the BETA2/NeuroD1 and Nkx2.2 genes are not associated with maturity onset of the young in Japanese.** *Diabetes* (1998); 47:1356-1358.
16. Inoue H, Rudnick A, German MS, Veile R, Donis-Keller H, Permutt MA. **Isolation, characterization and chromosomal mapping of the human Nkx6.1 gene (NKX6A), a new pancreatic islet homeobox gene.** *Genomics* (1997); 40: 367-370.

17. Iype T, Taylor DG, Ziesmann SM, Garmey JC, Watada H, Mirmira RG. **The transcriptional repressor Nkx6.1 also functions as a deoxyribonucleic acid context dependent transcriptional activator during pancreatic β -cell differentiation: Evidence for feedback activation of the nkx6.1 by Nkx6.1.** *Mol Endocrinol* (2004); 18: 1363-1375.
18. Watada H, Mirmira RG, Leung J, German MS. **Transcriptional and translational regulation of β -cell differentiation factor Nkx6.1.** *J Biol Chem* (2000); 275: 34224-30.
19. Hald J, Sprinkel AE, Ray M, Serup P, Wright C, Madsen OD. **Generation and characterization of Ptf1a antiserum and localization of Ptf1a in relation to Nkx6.1 and Pdx1 during the earliest stages of mouse pancreas development.** *J Histochem Cytochem* (2008); 56: 587-595.
20. Gauthier BR, Gosmain Y, Mamin A, Philippe J. **The β -cell specific transcription factor Nkx6.1 inhibits glucagon gene transcription by interfering with Pax6.** *Biochem J* (2007); 403: 593-601.
21. Friedrich P. **Basic concepts of ion channel physiology and anesthetic drug effects.** *Eur J anesthesiol* (2003); 20: 343-353.
22. Blank M. **The surface compartment model: a theory of ion transport focused on ionic processes in the electrical double layers at membrane protein surfaces.** *Biochim Biophys Acta* (1987); 906: 277-294.
23. Almers W. **Gating currents and charge movements in excitable membranes.** *Rev Physiol Biochem Pharmacol* (1978); 82:96-190.
24. Miller C. **Ion channels: doing hard chemistry with hard ions.** *Curr Opin Chem Biol* (2000); 4: 148-151.
25. Alberts B. **Molecular biology of the cell.** 4th edition; Garland Science; USA. 631-633.
26. Cooper EC, Jan LY. **Ion channel genes and human neurological disease: recent progress, prospects and challenges.** *Proc Natl Acad Sci USA* (1999); 96: 4759-4766.
27. Herrera E. **Bioquímica. Biología Molecular y bioquímica fisiológica.** 2^a Edición, reimpresión; MacGraw-Hill Interamericana; España, Madrid. Vol. II, 1113-1117.
28. Aidley DJ, Stanfield P. **Ion channels; molecules in actions.** Cambridge University press (1996).
29. Isamoto S, Kondo C, Yamada M, Matsumoto S, Higashiguchi O, Horio Y, Matsuzawa Y, Kurachi Y. **A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K^+ channel.** *J Biol Chem* (1996); 271: 24321-24324.
30. Lorenz E, Terzic A. **Physical association between recombinant cardiac ATP-sensitive K^+ channel subunits Kir6.2 and SUR2A.** *J Mol Cell Cardiol* (1999); 31: 425-434.
31. Babenko AP, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Bryan J. **Reconstituted human cardiac K_{ATP} channels from the sarcolemma of human ventricular cells.** *Circ Res* (1998); 83: 1132-1143.
32. Ritzel RA, Hansen JB, Veldhuis JD, Butler PC. **Induction of β -cell rest by a Kir6.2/SUR1-selective K_{ATP} -channel opener preserves β -cell insulin stores and insulin secretion in human islets cultured at high (11mM) glucose.** *J Clin Endocrinol Metab* (2007); 89: 795-805.
33. Hiriart M, Aguilar-Bryan L. **Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic β -cell.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2008); 295: 1298-1306.
34. Inagaki N, Gono T, Clement IV JP, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S, Bryan J. **Reconstitution of I(KATP): An inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor.** *Science* (1995); 270: 1166-1170.
35. Ashfield R, Ashcroft SJ. **Cloning of the promoters for the beta-cell ATP-sensitive K -channel subunits Kir6.2 and SUR1.** *Diabetes* (1998); 47: 1274-1280.

36. Gloyn AL, Siddiqui J, Ellard S. **Mutations in the genes encoding the pancreatic β cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) in diabetes mellitus and hyperinsulinism.** Hum Mutat (2006); 27: 220-231.
37. Dunne MJ, Cosgrove KE, Shepherd RM, Aynsley-Green A, Lindley KJ. **Hyperinsulinism in infancy: from basic science to clinical disease.** Physiol Rev (2004); 84: 239-275.
38. Ashcroft FM. **ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion.** J Clin Invest (2005); 115: 2047-2058.
39. Edghill EL, Gloyn AL, Gillespie KM, Lambert AP, Raymond NT, Swift PG, Ellard S, Gale EA, Hattersley AT. **Activating mutations in the KCNJ11 gene encoding the ATP-sensitive K^+ channel subunit kir6.2 are rare in clinically defined type 1 diabetes diagnosed before 2 years.** Diabetes (2004); 53: 2998-3001.
40. Gloyn AL, Reimann F, Girard C, Edghill EL, Proks P, Pearson ER, Temple IK, Mackay DJ, Shield JP, Freedenberg D, Noyes K, Ellard S, Ashcroft FM, Gribble FM, Hattersley AT. **Relapsing diabetes can result from moderately activating mutations in *KCNJ11*.** Hum Mol Genet (2005); 14: 925-934.
41. Schwanstecher C, Meyer U, Schwanstecher M. **Kir6.2 polymorphism predisposes to type 2 diabetes by inducing overactivity of pancreatic β cell ATP-sensitive K^+ channels.** Diabetes (2002); 51: 875-879.
42. Riedel MJ, Steckley DC, Light PE. **Current status of the E23K Kir6.2 polymorphism: implications for type-2 diabetes.** Hum Genet (2005); 116: 133-145.
43. Riedel MJ, Boora P, Steckley D, de Vries G, Light PE. **Kir6.2 Polymorphisms Sensitize Cell ATP-Sensitive Potassium Channels to Activation by Acyl CoAs A Possible Cellular Mechanism for Increased Susceptibility to Type 2 Diabetes?** DIABETES (2003); 52: 2630-2635.
44. Tucker SJ, Baukowitz T. **How Highly Charged Anionic Lipids Bind and Regulate Ion Channels.** J Gen Physiol (2008); 131: 431-438.
45. Dumont NJ. **Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals.** J Morphol (1972); 136: 153-179.
46. Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Mairbaix G. **Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells.** Nature (1971); 233: 177-182.
47. Stühmer W, Parek AB. **Electrophysiological recordings from *Xenopus* oocytes in single-channel recording.** Plenum press New York USA (1995); 341-356.
48. Baumgarther W, Islas L, Sigworth FJ. **Two-microelectrode voltage Clamp of *Xenopus* oocytes: voltage errors and compensation for local current flow.** Biophys J (1999); 77: 1980-1991.
49. Weber W. **Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art.** Biochim Biophys Acta (1999); 1421:213-233.
50. Stühmer W. **Electrophysiological recording from *Xenopus* oocytes.** In: Rudy B., Iverson L. E.: **Ion channels.** Methods Enzymol (1992); 207: 319-338.
51. Stühmer W. **Electrophysiological recording from *Xenopus* oocytes.** In: Conn MP (ed): **Ion channels.** Part B. Methods Enzymol (1998); 293: 280-300.
52. Wagner CA, Friedrich B, Setiawan I, Lang F, Bröer S. **The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins.** Cel Physiol Biochem (2000); 10: 1-12.
53. Polansky KS, Shuris J, Bell GI: **Non-insulin dependent diabetes mellitus- a genetic programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance.** N Engl J Med (1996); 334: 777-783.
54. Permutt MA, Chiu K, Ferrer J, Glaser D, Inoue IL, Nestorowicz A, Stanley CA, Tanizawa Y. **Genetics of type II diabetes.** Recent Prog Horm Res (1998); 53: 201-216.

55. Buffone GJ, Darlington GJ. **Isolation of DNA from biological specimens without extraction with phenol.** Clin Chem (1985); 31: 164-165.
56. Flanagan SE, Edghill EL, Gloyn AL, Ellard S. **Mutations in *KCNJ11*, which encodes Kir6.2, are a common cause of diabetes diagnosed in the first 6 months of life, with the phenotype determined by genotype.** Diabetologia (2006); 49: 1190-1197.
57. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006.
58. González- Juárez T, Flores-Fernández V, Vélez-Márquez MGD. **Valoración de factores de riesgo para DM2 en una comunidad semiurbana de la ciudad de México.** Rev Enferm IMSS (2004); 12: 65-70.
59. Wajchenberg BJ. **Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome.** Endocrine Reviews (2000); 21: 697-738.
60. Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas, (ENEC 1993).
61. Tschritter O, Stumvoll M, Machicao F, Holzwarth M, Weisser M, Maerker E, Teigeler A, Haring H, Frischie A. **The prevalent Glu23Lys polymorphism in the potassium inward rectifier 6.2 (*KIR6.2*) gene is associated with impaired glucagon suppression in response to hyperglycemia.** Diabetes (2002); 51: 2854-2860.
62. Sakura H, Wat N, Horton V, Millns H, Turner RC, Ashcroft FM. **Sequence variations in the human kir6.2 gene, a subunit of the beta-cell ATP-sensitive K-channel: no association with NIDDM in the white Caucasian subjects or evidence of abnormal function when expressed in vitro.** Diabetologia (1996); 39: 1233-1236.
63. Inoue H, Ferrer J, Warren-Perry M, Zhang Y, Millns H, Turner RC, Elbein SC, Hampe CL, Suarez BK, Inagaki N, Seino S, Permutt MA. **Sequence variants in the pancreatic islet beta-cell inwardly rectifying k⁺ channel kir6.2 (*Bir*) gene: identification and lack of role in Caucasian patients with NIDDM.** Diabetes (1997); 46: 502-507.
64. Hani EH, Boutin P, Durand E, Inoue H, Permutt MA, Velho G, Froguel P. **Missense mutations in the pancreatic islet beta cell inwardly rectifying K⁺ channel gene (*KIR6.2/BIR*): a meta analysis suggests a role in the polygenic basis of type II diabetes mellitus in Caucasians.** Diabetologia (1998); 41: 1511-1515.
65. Gloyn AL, Hashim Y, Ashcroft SJ, Ashfield R, Wiltshire S, Turner RC, UK Prospective Diabetes Study. **Association studies of variants in promoter and coding regions of beta-cell ATP-sensitive K-channel genes *SUR1* and *Kir6.2* with type 2 diabetes mellitus.** Diabet Med (2001); 18: 206-212.
66. Hart LM, de Knijff P, Dekker JM, Stolk RP, Nijpels G, van der Does FE, Ruige JB, Grobbee DE, Heine RJ, Maassen JA. **Variants in the sulphonylurea receptor gene: association of the exon 16-3t variant with type II diabetes mellitus in Dutch Caucasians.** Diabetologia (2002); 43: 617-620.
67. Gloyn AL, Weedon MN, Owen KR, Turner MJ, Knight BA, Hitman G, Walker M, Levy JC, Sampson M, Halford S, McCarthy MI, Hattersley AT, Frayling TM. **Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits *Kir6.2* (*KCNJ11*) and *SUR1* (*ABCC8*) confirm that the *KCNJ11* E23K variant is associated with type 2 diabetes.** Diabetes (2003); 52: 568-572.
68. Nielsen EM, Hansen L, Carstensen B, Echwald SM, Drivsholm T, Glümer C, Thorsteinsson B, Broch-Johnsen K, Hansen T, Pedersen O. **The E23K variant of *Kir6.2* associates with impaired post-OGTT serum insulin response and increased risk of type 2 diabetes.** Diabetes (2003); 52: 573-577.
69. Ezenwaka C, Kalloo R, Uhlig M, Schwenk R, Eckel J. **The E23K variant in the *Kir6.2* subunit of the ATP-sensitive K⁺ channel does not augment impaired glucosa tolerance in Caribbean subjects with a family history of type 2 diabetes.** J Endocrinol (2005); 185: 439-444.
70. Yokoi N, Kanamori M, Horikawa Y, Takeda J, Sanke T, Furuta H, Nanjo K, Mori H, Kasuga M, Hara K, Kadowaki T, Tanizawa Y, Oka Y, Iwami Y, Ohgawara H, Yamada

- Y, Seino Y, Yano H, Cox NJ, Seino S. **Association studies of variants in the genes involved in pancreatic β -cell function in type 2 diabetes in Japanese subjects.** *Diabetes* (2006); 55: 2379-2386.
71. Sakamoto Y, Inoue H, Keshavarz P, Miyawaki K, Yamaguchi Y, Moritani M, Kunika K, Nakamura N, Yoshikawa T, Yasui N, Shiota H, Tanahashi T, Itakura M. **SNPs in the KCNJ11-ABCC8 gene locus are associated with type 2 diabetes and blood pressure levels in the Japanese population.** *J Hum Genet* (2007); 52: 781-793.
 72. Cejková P, Novota P, Cerná M, Kolostová K, Nováková D, Kucera P, Novák J, Andel M, Weber P, Zdráský E. **KCNJ11 E23K Polymorphism and Diabetes Mellitus with Adult Onset in Czech Patients.** *Folia Biol (Praha)* (2007); 53: 173-175.
 73. Vaxillaire M, Veslot J, Dina C, Proença C, Cauchi S, Charpentier G, Tichet J, Fumeron F, Marre M, Meyre D, Balkau B, Froguel P; DESIR Study Group. **Impact of common type 2 diabetes risk polymorphisms in the DESIR prospective Study.** *Diabetes* (2008); 57: 244-254.
 74. Omori S, Tanaka Y, Takahashi A, Hirose H, Kashiwagi A, Kaku K, Kawamori R, Nakamura Y, Maeda S. **Association of CDKAL1, IGF2BP2, CDKN2A/B, HHEX, SLC30A8, and KCNJ11 with susceptibility to type 2 diabetes in Japanese population.** *Diabetes* (2008); 57: 791-795.
 75. Sakura H. **Sequence variations in the human Kir6.2 gene, a subunit of the β -cell ATP-sensitive K-channel: no association with NIDDM in white Caucasian subjects or evidence of abnormal function when expressed in vitro.** *Diabetologia* (1996); 39: 1233-1236.
 76. Gribble FM, Asfield R, Ämmälä, Ashcroft FM. **Properties of cloned ATP-sensitive K^+ currents expressed in *Xenopus* oocytes.** *J Physiol* (1997); 498: 87-98.
 77. Aguilar Salinas CA, Gómez Díaz R, Gómez Pérez FJ. **Dislipidemias de lo clínico a lo molecular.** Intersistemas Editores, México 2008; 135.
 78. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. **Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes.** *Lancet* (1998); 352: 837-853.
 79. Maedler K, Carr RD, Bosco D, Zuelling RA, Berney T, Donath MY. **Sulfonylurea induced beta-cell apoptosis in cultured human islets.** *J Clin Endocrinol Metab* (2005); 90: 501-506.
 80. Rahier J, Goebbels RM, Henquin JC. **Cellular composition of the human diabetic pancreas.** *Diabetologia* (1983); 24: 366-371.
 81. Doyle MJ, Sussel L. **Nkx2.2 regulates beta cell function in the mature islet.** *Diabetes* (2007); 56: 1999-2007.
 82. Jørgensen MC, Ahnfelt-Rønne J, Hald J, Madsen OD, Serup P, Hecksher-Sørensen J. **An illustrated review of early pancreas development in the mouse.** *Endocr Rev* (2007); 28: 685-705.
 83. Nielsen EM, Hansen L, Carstensen B, Echwald SM, Drivsholm T, Glümer C, Thorsteinsson B, Borch-Johnsen K, Hansen T, Pedersen O. **The E23K variant of Kir6.2 associates with impaired post-OGTT serum insulin response and increased risk of type 2 diabetes.** *Diabetes* (2003); 52: 573-577.
 84. Tschritter O, Stumvoll M, Machicao F, Holzwarth M, Weisser M, Maerker E, Teigeler A, Häring H, Fritsche A. **The prevalent Glu23Lys polymorphism in the potassium inward rectifier 6.2 gene associated with impaired glucagon suppression in response to hyperglycemia.** *Diabetes* (2002); 51: 2854-2860.
 85. Branstrom R, Corkey BE, Berggren PO, Larsson O. **Evidence for a unique long chain acyl-CoA ester binding site on the ATP-regulated potassium channel in mouse pancreatic beta cells.** *J Biol Chem* (1997); 272: 17390-17394.

86. Branstrom R, Leibiger IB, Leibiger B, Corkey BE, Berggren PO, Larsson O. **Long chain Coenzyme A esters activate the pore-forming subunit (Kir6.2) of the ATP-regulated potassium channel.** J Biol Chem (1998); 273: 31395-31400.
87. Gribble FM, Proks P, Corkey BE, Ashcroft FM. **Mechanism of cloned ATP-sensitive potassium channel activation by oleoyl-CoA.** J Biol Chem (1998); 273: 26383-26387.
88. Del Prato S. **Role of glucotoxicity and lipotoxicity in the pathophysiology of type 2 diabetes mellitus and emerging treatments strategies.** Diabetic medicine (2009); 26: 1185-1192.
89. Ashcroft FM. **The yin and the yang of the K(ATP) channel.** J Physiol (2000); 528: 405.
90. Lin YW, Bushman JD, Yan FF, Haidar S, MacMullen C, Ganguly A, Stanley CA, Shyng SL. **Destabilization of ATP-sensitive Potassium Channel Activity by Novel *KCNJ11* mutations identified in congenital hyperinsulinism.** J Biol Chem (2008); 283: 9146-9156.
91. Tucker SJ, Gribble FM, Zhao C, Trapp S, Ashcroft FM. **Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K⁺ channels in the absence of the sulphonylurea receptor.** Nature (1997); 387: 179-183.