



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

***“ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LOS
POLIMORFISMOS T130I DE HNF-4 α Y R133W DE
PAX-4 COMO FACTORES DE SUSCEPTIBILIDAD AL
DESARROLLO DE DIABETES EN UNA POBLACIÓN
MAYA DE QUINTANA ROO”***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICA
FARMACÉUTICO BIÓLOGA**

PRESENTA:

MARCELA ALEJANDRA AGUILLÓN MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARTA MENJÍVAR IRAHETA



MÉXICO, D.F.

2013



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora Herminia de Jesús Loza Tavera

VOCAL: Profesor José Eleazar Martínez Barajas

SECRETARIO: Profesora Marta Alicia Menjívar Iraheta

1^{er}. SUPLENTE: Profesor Ignacio Camacho Arroyo

2^o. SUPLENTE: Profesora Tzvetanka Dimitrova Dinkova

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE
ENDOCRINOLOGÍA MOLECULAR DEL HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO Y EN EL
LABORATORIO DE DIABETES DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA
FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Marta Alicia Menjívar Iraheta

FIRMA

SUPERVISOR TÉCNICO:

M en C. María Guadalupe Ortiz López

FIRMA

SUSTENTANTE:

Marcela Alejandra Aguillón Martínez

FIRMA

ÍNDICE

Abreviaturas	3
Resumen	5
I. Marco Teórico	
Epidemiología de la Diabetes	7
Diabetes	9
Clasificación de la Diabetes	10
Diagnóstico	12
Páncreas Morfofisiología y Patología	15
Insulina	16
Receptor de la Insulina	18
Resistencia a la Insulina (RI)	19
Etiología de la RI	21
Variantes Polimórficas	23
Estudio de Asociación	23
Factores de Transcripción	26
Factor Nuclear Hepático 4 α (HNF-4 α)	27
T130I	30
Paired Box 4 (Pax-4)	31
R133W	32

Etnias en México	34
II. Justificación	37
III. Objetivo	38
IV. Hipótesis	39
V. Material y Métodos	40
VI. Resultados	
Bioquímicos y Antropométricos	56
Estudio de Asociación	58
Moleculares	62
Grupo Control	68
VII. Discusión	70
VIII. Conclusión	76
IX. Referencias	77
Anexo 1	82
Anexo 2	83
Anexo 3	84

ABREVIATURAS

A1c	Hemoglobina glucosilada
ADA	Asociación Americana de Diabetes
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGA	Glucosa alterada en ayuno
AGL	Ácidos grasos libres
ATP	Adenosin trifosfato
Da	Daltones
DCCT	Control de diabetes y complicaciones
dNTP	Dinucleótidos
DT1	Diabetes tipo 1
DT2	Diabetes tipo 2
EDTA	Ácido etilen-diamin-tetra-acético
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
FPG	Glucosa en ayuno
Glut 2	Transportador de glucosa 2
HDL	Colesterol de alta densidad
HNF-4α	Factor nuclear del hepatocito-4 α
HOMA	Homeostasis Model Assessment
HTA	Hipertensión arterial
ICC	Índice de cintura/cadera
IGT	Intolerancia a la glucosa
IRS	Proteínas sustrato de la insulina
IMC	Índice de masa corporal
Kg	Kilogramo
KPD	Cetoacidosis diabética
L	Litro
LA	Ácido linoléico
LDL	Colesterol de baja densidad
m²	Metro cuadrado

Mg	Miligramo
Min	Minutos
mL	Mililitro
MODY	<i>Maturity Onset Diabetes of the Young</i> (Diabetes del adulto en el joven)
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pax-4	<i>Paired box-4</i>
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción
RI	Resistencia a la insulina
SDS	Sulfato dodecil de sodio
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
SS	Somatostatina
TGO	Transaminasa glutámico oxalacética
TGP	Transaminasa glutámico pirúvica

RESUMEN

Actualmente la diabetes se considera un problema de salud pública mundial, que además aqueja de forma severa a la población mexicana, ya que en 2012 se identificaron a 6.4 millones de adultos con diabetes en el país. Se espera que esta patología incremente su incidencia a 429 millones de personas para el 2030 a nivel mundial.

Se han encontrado poblaciones que poseen una mayor prevalencia de diabetes, lo que sugiere que existe un factor genético, no imprescindible, que las hacen más susceptibles para desarrollar esta enfermedad. A partir de 1940 empezaron a reportarse casos de diabetes en las comunidades indígenas de Norteamérica y, desde entonces, en otros grupos indígenas del mundo se han reportado casos similares. La hipótesis del presente trabajo es que el fondo diabetogénico del componente indígena es importante para la aparición de diabetes mellitus tipo 2 (DT2) en mestizos mexicanos.

En la actualidad muchos investigadores centran sus trabajos en identificar genes con polimorfismos que se dan en la población con mayor frecuencia y que influyen en el riesgo de padecer una enfermedad. Los polimorfismos más comunes son cambios de una única base, los SNP's, por sus siglas en inglés, *Single Nucleotide Polymorphisms* son variaciones en la secuencia de DNA en la cual uno de los 4 nucleótidos es reemplazado por otro. El SNP T130I del gen HNF-4 α , una variante encontrada en la población indígena mexicana con una alta frecuencia (16%) y el SNP R133W del gen Pax-4, reportado en la población africana occidental con una frecuencia de 3.2%, y del que no existen estudios en la población mexicana, fueron elegidos para realizar un estudio de asociación con la DT2. La población seleccionada fue la localidad de Sabán, que está situada en el Municipio de José María Morelos en el estado de Quintana Roo; el poblado fue elegido por su aislamiento, ya que conservan el lenguaje, costumbres y tradiciones Mayas.

Se realizó un análisis molecular mediante la técnica PCR-RFLP usando enzimas de restricción *SfuI* y *Hsp92-II* respectivamente para los genes HNF-4 α y Pax-4, se

determinaron parámetros bioquímicos y se registraron medidas antropométricas. Bajo el modelo de regresión logística multinomial, los resultados estadísticos registraron diferencias significativas en los parámetros colesterol y fosfatasa alcalina con las variantes de los genes estudiados. Las frecuencias alélicas en la población estudiada fueron de 8.6% y 0.5% de los polimorfismos T130I del gen HNF-4 α y R133W del gen Pax 4, respectivamente.

Este hallazgo permite estimar la existencia de SNPs propios de cada población, permitiendo realizar estudios que relacionen la existencia de éstos con alguna enfermedad de alta incidencia. Los estudios genéticos de los grupos indígenas tienen un papel fundamental en la búsqueda de una perspectiva que permita un mejor entendimiento de la DT2 y así poder desarrollar nuevas alternativas para el tratamiento de pacientes que cursan con esta patología.

I. MARCO TEÓRICO

Epidemiología de la diabetes

En los últimos años la esperanza de vida en México ha aumentado hasta 75.4 años promedio; para las mujeres es de 77 años y para los hombres 72 años, según lo reportado por el INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía) en el 2013. Esto, aunado a la exposición a riesgos relacionados con estilos de vida poco saludables, ha modificado el cuadro de las principales causas de muerte en nuestro país. A mitad del siglo pasado, alrededor de 50% de los decesos en el país se debían a infecciones comunes, problemas reproductivos y padecimientos asociados a la desnutrición. Hoy estas enfermedades concentran menos del 15% de los decesos, mientras que los padecimientos no transmisibles y las lesiones son responsables de poco menos de 75% y 11% de las muertes en el país, respectivamente.¹

La epidemia de la diabetes es reconocida por la OMS (Organización Mundial de la Salud) como una amenaza mundial. Esta organización publicó estimaciones para los años 2010 y 2030 analizando datos de 40 países, que se extrapolaron a los 191 estados miembros. En 2010, la diabetes afectó aproximadamente 285 millones de personas en todo el mundo y se espera que incremente en 1.5 veces (439 millones de personas) para el 2030.²

La Federación Internacional de la Diabetes (IFD) ha publicado otras estimaciones, que incluyen 216 países de las Naciones Unidas, infieren que en el 2010 la mortalidad atribuida a la diabetes en el mundo fue de 3.96 millones en el grupo de edad de 20 a 79 años y un 6.8% de la mortalidad global. Hoy en día es reconocido que son los países de ingresos medios y bajos los que se enfrentan a la mayor carga de esta enfermedad.³

En México, las tasas de mortalidad e incidencia en diabetes muestran una tendencia ascendente en ambos sexos, con más de 60 mil muertes y 400,000 casos nuevos anuales. Tan solo en 2010, último año reportado por INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía) y SINAIS (Sistema Nacional de Información en Salud) se dieron 82,964 decesos, con una tasa de mortalidad de 76.3%.³

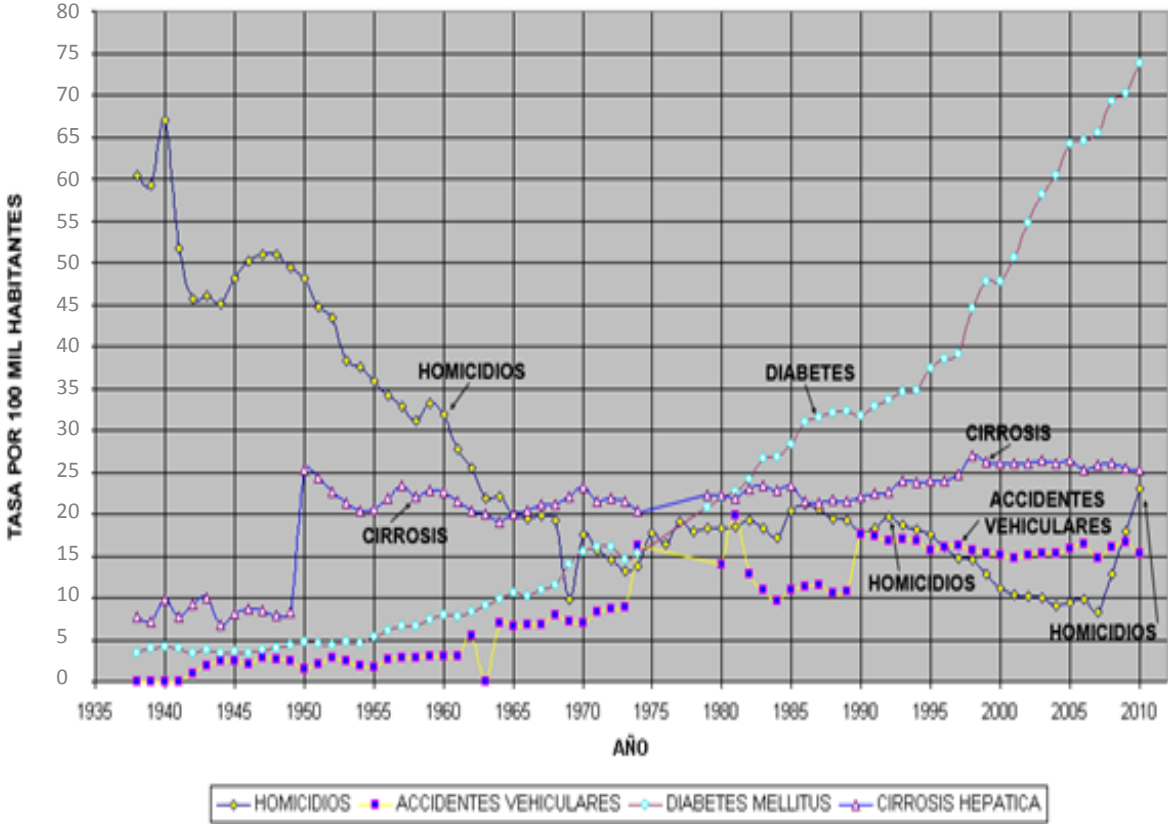


Fig 1. Causas de mortalidad en México hasta el 2010 con datos de INEGI, OMS y SINAIS.

Según datos proporcionados por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT), la prevalencia de diabetes es mayor (11.4%) entre la población con antecedentes familiares en comparación con aquellos sin familiares afectados (5.6%). La población con obesidad, según su índice de masa corporal y circunferencia de la cintura, presentó una prevalencia mucho mayor que aquella sin obesidad. Tomando en cuenta la distribución por grupos de edad la diabetes afecta principalmente a los adultos en edad productiva y adultos mayores.⁴



Fig 2. Prevalencia de Diabetes Mellitus por diagnóstico médico previo, según entidad federativa ENSANUT 2012. *Situación Nutricional en México.*

Además de las cifras alarmantes con la que la diabetes está aumentando su frecuencia, el impacto económico es aún mayor, se estima que la inversión del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) para tratar esta enfermedad en el año 2012 ascendió a 10 mil millones de pesos, sin contar lo que invierte el Sistema Nacional de Protección Social en Salud.⁵

Diabetes

Cambios en el estilo de vida y comportamiento humano debido al desarrollo y globalización han dado lugar a tasas crecientes de enfermedades crónicas de gran impacto social, como la diabetes y obesidad. La diabetes es un padecimiento

complejo caracterizado por niveles elevados de glucosa en la sangre. Estos altos niveles son debidos a dos causas principales: a la disminución de la sensibilidad de insulina en el tejido adiposo, músculo, hígado, lo cual es conocido como resistencia a la insulina y/o a un defecto de la insulina secretada por las células beta pancreáticas.⁶

La diabetes lleva implícita una serie de situaciones que comprometen a los pacientes, lo cual favorece el desarrollo de complicaciones, con los consecuentes trastornos en la calidad de vida, muerte prematura e incremento en los costos de atención y tasas de hospitalización. Ésta triplica el riesgo de aterosclerosis manifestada por infartos al miocardio y embolias cerebrales, las complicaciones más importantes producidas por la diabetes son la insuficiencia renal, la ceguera, amputaciones no traumáticas, hospitalizaciones e incapacidad prematura en las personas en edad productiva, lo cual explica el 30% de la mortalidad general.²

Debido a que la etiología específica de la diabetes es aún desconocida, se asocia a la obesidad y posee una fuerte predisposición genética.

Tipos de diabetes

La gran mayoría de los casos de diabetes se agrupan en dos categorías, aunque también existen algunos otros tipos dependiendo de su etiología.

La diabetes tipo 1 (DT1) es debido a la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas, dando como resultado la deficiencia absoluta de insulina. Esta forma de diabetes, que representa sólo el 5-10% de los casos generales en el mundo, previamente fue denominada diabetes dependiente de insulina o diabetes de inicio juvenil. Las personas con mayor riesgo de desarrollar este tipo de diabetes a menudo pueden ser identificados por pruebas serológicas, los marcadores genéticos incluyen: anticuerpos contra la insulina, autoanticuerpos contra GAD (GAD65) y los autoanticuerpos a fosfatasas de tirosina IA-2 e IA-2 β . Uno o más de estos autoanticuerpos se presentan inicialmente en el 85% a 90% de los individuos cuando existe hiperglucemia en ayunas.⁷

En la DT1, la tasa de destrucción de las células β es muy variable, siendo rápida en algunos individuos (principalmente lactantes y niños) y lentos en otros (principalmente adultos). En la última etapa de la enfermedad, hay poca o ninguna secreción de insulina, que se manifiesta por niveles bajos o indetectables de plasma del péptido C.⁷

La destrucción autoinmune de las células β tiene múltiples predisposiciones genéticas y también está relacionada con factores ambientales que todavía no están bien definidos. Estos pacientes también son propensos a otras enfermedades autoinmunes, como la enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison, vitíligo, enfermedad celíaca, hepatitis autoinmune, la miastenia grave, y la anemia perniciosa.⁸

La diabetes tipo 2 (DT2) representa más del 90% de los casos a nivel mundial. Es una combinación de resistencia a la insulina y una respuesta compensatoria inadecuada de la secreción de insulina. Un grado de hiperglucemia alta puede causar cambios patológicos y funcionales en diferentes tejidos diana, pero sin síntomas clínicos, y puede estar presente durante un periodo largo de tiempo antes de que la diabetes se detecte. Las personas con DT2 no dependen de insulina exógena, pero pueden requerirla para el control de los niveles de glucosa en la sangre, si esto no se regula con dieta y ejercicio o con hipoglucemiantes orales.⁷ La cetoacidosis rara vez se produce espontáneamente en este tipo de diabetes; pero si se presenta, es con asociación al estrés de otra enfermedad tal como una infección.

El diagnóstico de la DT2 no es inmediato, debido a que la hiperglucemia se desarrolla gradualmente y en etapas más tempranas y a menudo no es lo suficientemente grave como para que el paciente presente cualquiera de los síntomas clásicos de la enfermedad. Sin embargo, estos pacientes tienen un mayor riesgo de desarrollar complicaciones macrovasculares y microvasculares, además de que pueden tener niveles de insulina anormales debido a que se necesita una mayor cantidad para contrarrestar los niveles de glucosa en sangre, lo que puede resultar de una resistencia a la insulina.⁷

Diagnóstico

Dada la complejidad de la DT2, y a que no presenta síntomas hasta que está muy avanzada la enfermedad, el diagnóstico oportuno es un reto del sector salud hoy en día. La American Diabetes Association (ADA) en conjunto con la OMS han establecido nuevos criterios para el diagnóstico de la DT2⁷(Figura 3).

CRITERIOS	DESCRIPCIÓN
Niveles de hemoglobina glucosilada (A1C)	A1C \geq 6.5%. La prueba debe realizarse en un laboratorio que use un método certificado y estandarizado.
Glucosa plasmática en ayuno (FPG)	FPG \geq 126 mg/dL. El ayuno se define como la no ingesta calórica en por lo menos 8 horas.
Glucosa casual	Glucosa casual \geq 200 mg/dL. En un paciente con síntomas clásicos de crisis de hiperglucemia.
Prueba de tolerancia a la glucosa (PTGO)	Glucemia posprandial \geq 200 mg/dL a las dos horas después de una carga oral de 75 mg de glucosa anhidra disuelta en agua.

Fig. 3. Criterios para el diagnóstico de la Diabetes Mellitus modificado de *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION 2012.*

En ausencia de hiperglucemia inequívoca, los criterios deben ser confirmados por pruebas repetidas.

La A1C es un indicador ampliamente utilizado de glucemia crónica, reflejando la glucemia promedio de lapso de 2-3 meses. La prueba representa un papel crítico en el manejo del paciente con diabetes, ya que se correlaciona bien con las complicaciones microvasculares y, en menor medida, con las macrovasculares; además, es ampliamente utilizada como biomarcador estándar del manejo adecuado de la glucemia. Se determinó que para el diagnóstico de la diabetes se utiliza un valor de menor o igual a 6.5%.⁷

Existen algunos individuos cuyos niveles de glucosa no cumplen los criterios para la diabetes, sin embargo, son más altos que los considerados normales. Estas personas son consideradas pre-diabéticas y se distinguen por presentar:⁹

- Glucosa Alterada en Ayuno (AGA) los niveles van de 100 mg/dL (5.6 mmol/L) a 125 mg/dL (6.9 mmol/L)].
- Intolerancia a la glucosa (IGT) [Prueba realizada 2 horas después de la poscarga] glucosa oral (OGTT) de 140 mg/dL (7.8 mmol/L) a 199 mg/dL (11.0 mmol/L)].

La prueba de tolerancia a la glucosa deberá ser realizada usando una carga oral de 75 g de glucosa disuelta en agua.

Las condiciones del estado pre-diabético son considerados factores de riesgo para en un futuro presentar diabetes o enfermedad cardiovascular. Ambos estados se asocian con obesidad (especialmente abdominal), dislipidemia con hipertrigliceridemia y/o niveles bajos de colesterol HDL e hipertensión. Estudios recientes han demostrado que cambios en el estilo de vida como una dieta saludable que contenga raciones diarias de frutas y hortalizas y una cantidad reducida de azúcar y grasas saturadas, al menos 30 minutos de actividad física regular, mantenimiento de un peso corporal normal y evitar el consumo del tabaco, pueden reducir la velocidad de progresión de la DT2, por lo que la modificación del estilo de vida es imprescindible en aquellos pacientes con glucosa alterada en ayuno o intolerancia a la glucosa.¹⁰

Algunos factores de riesgo se resumen en la figura 4:

1. Todos los individuos con 45 años de edad o más deberán ser considerados para la prueba de detección de diabetes; si la prueba es normal deberá repetirse cada tres años.
 2. La prueba deberá realizarse con mayor frecuencia a partir de los 30 años de edad a individuos con:
 - Antecedente de familiares en primer grado con diabetes
 - Sobrepeso u obesidad (índice de masa corporal ≥ 25)
 - Hipertensión arterial (cifras de presión arterial $\geq 140/90$ mm Hg)
 - Niveles de colesterol > 200 mg/dL (lipoproteínas de alta densidad ≤ 35 mg/dL)
 - Triglicéridos ≥ 250 mg/dL
 - Una prueba positiva de tamizaje (glucemia capilar > 120 mg/dL)
- Y a mujeres con:
- Antecedente de hijos macrosómicos (peso al nacimiento ≥ 4 kg) o de haber cursado con diabetes gestacional

Fig. 4. Criterios para la detección de diabetes mellitus tipo 2 en individuos adultos asintomáticos. Tomado de *Guía clínica para el diagnóstico y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 2003*.

Como uno de los principales factores de riesgo para padecer DT2 se encuentra el sobrepeso y la obesidad, ya que en las últimas tres décadas su prevalencia ha

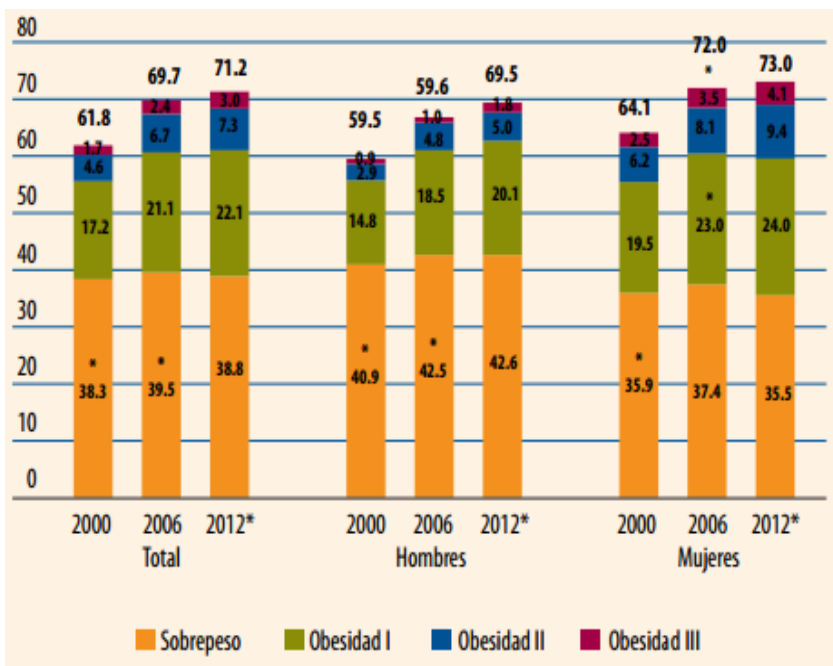


Fig. 5. Tendencias en las prevalencias de sobrepeso y obesidad en el periodo 2000 a 2011 en México. Tomado de *ENSANUT 2012*.

tenido un aumento sin precedente y su velocidad de incremento ha sido una de las más altas en el ámbito mundial. Según la ENSANUT 2012, la prevalencia en México en adultos fue de 71.28% (que representan a 48.6 millones de personas).

La tendencia en los últimos 12 años (2000-2012) muestra que la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en adultos aumentó 15.2% (Figura 5).⁴ En la clasificación de sobrepeso y obesidad aplicable tanto a hombres como mujeres en edad adulta propuesto por el comité de expertos de la OMS, el punto de corte para definir obesidad es de un valor de índice de masa corporal (IMC)= 30 kg/m². Sin embargo, sobre la base de la topografía del tejido adiposo es posible reconocer 3 tipos diferentes de obesidad; la obesidad tipo I en donde el exceso de grasa corporal puede localizarse indistintamente en todo el cuerpo (IMC entre 30.0 y 34.9 kg/m²), la obesidad tipo II en donde el exceso de grasa subcutánea se localiza primordialmente en el tronco y en el abdomen (IMC entre 35.0 y 39.9 kg/m²) y la obesidad tipo III en donde el exceso de grasa es visceral (IMC ≥ 40 kg/m²). El rango que abarca el sobrepeso en la que está incluida una gran parte de la población adulta es de un IMC entre 25 y 29.9 kg/m².⁶⁵

Es indiscutible que este es un problema de gran magnitud que requiere de la participación de todos los sectores de la sociedad y de salud para su adecuada prevención y control.

Páncreas morfofisiología y patología

El páncreas es un órgano impar, constituido por dos tipos de células secretoras, ambas relacionadas con el manejo de los nutrientes. El 98% del páncreas está constituido por el páncreas exocrino, cuya función es sintetizar, almacenar y secretar al duodeno las enzimas necesarias para la digestión de alimentos. El 2% restante está constituido por células endocrinas con función metabólica y de síntesis de varias hormonas, las cuales constituyen la unidad anatómica funcional del páncreas, los islotes de Langerhans, cuya masa corresponde a 1% del peso total del órgano. Dentro de los islotes se distinguen cuatro tipos celulares: células α , células β , células δ y células secretoras del polipéptido pancreático (PP), que presentan una organización tridimensional en la cual las células β forman un núcleo central rodeado por el resto de las células endocrinas, lo que permite la liberación adecuada de insulina en estado basal y ante un estímulo. Los islotes

tienen una fina red vascular y están dotados de un sistema venoso tipo portal orientado desde las células β .¹¹

Cada una de las hormonas insulares es capaz de influir en la secreción de las restantes. Así la somatostatina (SS) suprime la secreción de las otras tres. La insulina suprime la secreción de glucagón. El glucagón estimula la secreción de insulina y SS, y cada una de ellas, es capaz de suprimir su secreción de manera autocrina.¹²

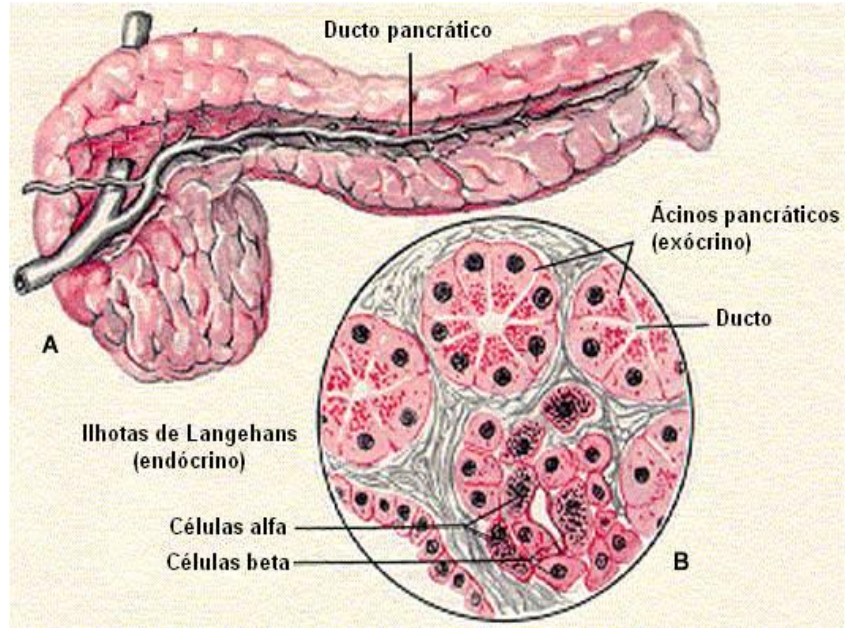


Fig 6. Estratificación morfológica del páncreas.
A. Representación gráfica del páncreas endocrino.
B. Ampliación de los islotes de Langerhans. Tomado de *Endocrinología* 2003.

Los islotes de Langerhans se distinguen del

peránquima exocrino por su escasa afinidad por la tinción del hematoxilina-eosina. El tamaño de los islotes es variable, oscilando entre los 140-250 μm y se encuentran rodeados por una capa de tejido colágeno que los separa del resto del tejido pancreático.¹²

Insulina

La insulina es la hormona más importante para el control de glucosa en la sangre, con efectos que van directamente a los músculos, al tejido adiposo y al hígado; facilita el flujo de glucosa desde la corriente sanguínea hacia los músculos o tejido adiposo y reduce el flujo de glucosa desde el hígado hacia la sangre.¹⁴

Fue descubierta en 1922, como la primera proteína de la que se conoció su estructura primaria. Es un polipéptido de peso molecular 5800 Da, compuesto por dos cadenas de aminoácidos, que en total tienen 51 aminoácidos. La cadena A, tiene 21 aminoácidos y la cadena B 30 aminoácidos. Ambas cadenas se encuentran unidas por 2 puentes disulfuro ubicados entre los aminoácidos. La integridad de la molécula es indispensable para ejercer las acciones farmacológicas, ya que luego de la destrucción enzimática, las cadenas A o B separadas carecen completamente de acciones farmacológicas.¹³

La insulina se sintetiza en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso de las células β , como preproinsulina, que tiene 109 a.a. Este precursor pierde el péptido de señalización y se transforma en proinsulina de 83 aminoácidos de cadena única en espiral.

La proinsulina, se transforma en insulina en el

aparato de Golgi de las células β , dando lugar a la insulina y a un péptido conector o péptido C, de 32 aminoácidos, que se acumula en gránulos secretorios ligados al Golgi, en el citoplasma celular. El péptido C carece de acciones, desconociéndose su rol fisiológico. Tanto la proinsulina (en pequeñas cantidades), como el péptido C, circulan en el plasma sanguíneo. La insulina circula en plasma formando dímeros o hexámeros, los que se separan en moléculas individuales para activar el receptor.¹³

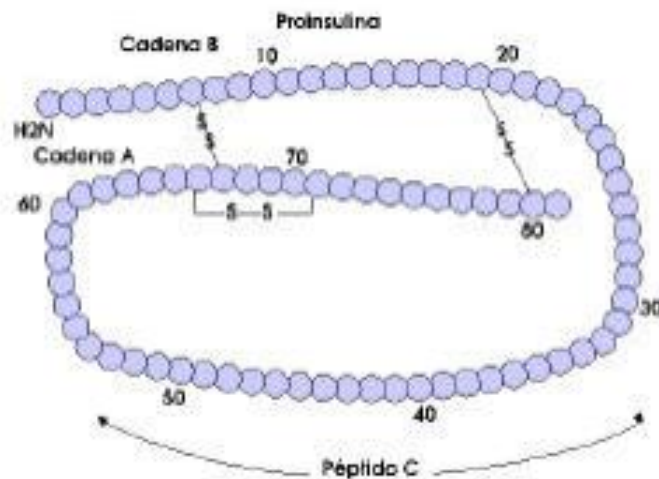


Fig 7. Representación de la cadena de insulina, mostrando la localización de los aminoácidos que forman la proinsulina y el péptido C. Tomado de *Endocrinología* 2003.

Receptor de la insulina

El receptor de la insulina (R), es una glucoproteína de la membrana celular, de PM 360 000 Da, cuya función primaria es el reconocimiento e interacción con la insulina. Tiene una estructura similar a las inmunoglobulinas y está constituido por dos subunidades α que se unen entre sí por puentes disulfuro y dos subunidades β , que también se unen a cada subunidad α por medio de puentes disulfuro. La subunidad α se encarga del reconocimiento de la insulina. La subunidad β tiene una porción extracelular y otra intracelular. En la porción intracelular se reconocen 4 dominios:¹²

1. El yuxtamembranoso que forforila y une los substratos.
2. El catalítico que se une al ATP.
3. El dominio rico en tirosinas que regula la actividad cinasa y se autofosforila.
4. El dominio carboxilo terminal que puede fosforilarse.

Al interactuar con la insulina con las subunidades α ocurre una movilización o desplazamiento lateral de los R, que conduce a una agregación de los mismos, fenómeno indispensable para el desarrollo de la acción biológica de la insulina. En la agregación se unen también algunos receptores libres, no ligados a insulina, lo que hace que la unión del complejo R + insulina se haga irreversible. La unión de la insulina a las subunidades α del receptor provoca un cambio conformacional de la parte intracelular de la subunidad β , la cual actúa como tirosina cinasa específica, lo que produce una autofosforilación y la fosforilación de otros sustratos celulares o proteínas señal. Estas proteínas se encuentran en el citosol de la célula y se encargan de llevar la información de la superficie de la célula al núcleo, produciéndose la activación a modo de cascada de señalización hasta las proteínas reguladoras de genes (factores de transcripción) y así provocar la transcripción del ADN a ARNm, con la consiguiente síntesis de proteínas. Uno de los substratos en la vía de señalización de la insulina es el llamado sustrato 1 del receptor de insulina (IRS1). Este sustrato es miembro de una familia de sustratos, los IRS-1, 2, 3, 4, que una vez fosforilados pueden activar diversas proteínas con dominios SH2. Mediante este mecanismo, la insulina regula, por una parte, la

expresión génica de distintas proteínas, a través de la vía Grb2-Sos-Ras-MAPK que finaliza en el núcleo y por otra, la captación de glucosa a través de la vía PI-3K-PKB, en el citosol. Una vez desencadenada su acción fisiofarmacológica, la insulina es degradada por proteólisis, el R, libre de insulina, es devuelto a la membrana celular¹³ (Figura 8).

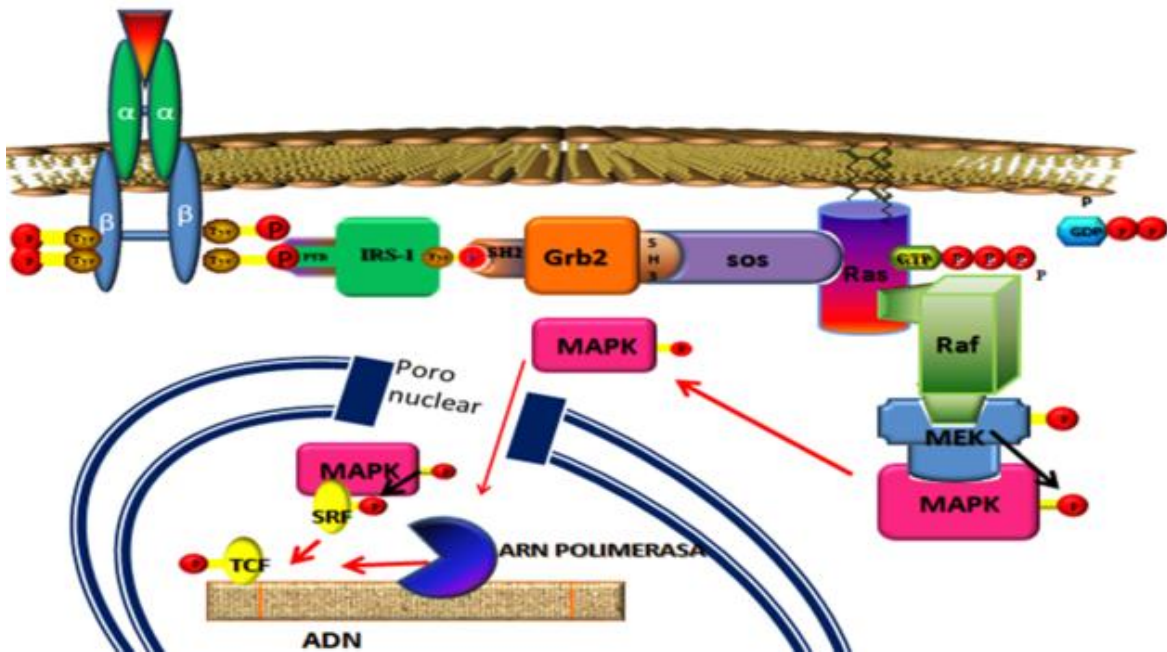


Fig 8. Representación de la transducción de señales mediada por la insulina y su receptor (R). Tomado de *Hormonas pancreáticas* 2006.

El gen del receptor de la insulina tiene 22 exones y se localiza en el brazo corto del cromosoma 19.¹²

Resistencia a la insulina

Se conoce a esta condición como la alteración de la respuesta tisular a la acción de la insulina, que en la práctica se refiere a una menor captación de glucosa mediada por insulina. Aunque puede afectar a muchos órganos, los más importantes son el músculo, el hígado y el tejido adiposo.¹⁵

La resistencia a la insulina (RI) genera que los niveles de insulina en plasma se mantengan altos (hiperinsulinismo), lo que somete a los tejidos a una inadecuada acción lipogénica. Esto implica una relación muy estrecha con el metabolismo de lípidos, lo que podría explicar porque esta enfermedad está asociada a trastornos lipídicos de la sangre, especialmente a niveles altos de triglicéridos (150 mg/dL o más), niveles bajos de HDL (30 mg/dL o menos) y aumento de partículas LDL pequeñas y densas, es decir, produce una dislipidemia.¹⁵ Las principales anormalidades de la RI son causadas por defectos en el receptor y en el mecanismo de transducción de señales de la insulina a nivel de las proteínas IRS y también en la cascada de señalización que involucra PI3K.¹³

La consecuencia durante el ayuno es que el déficit funcional de insulina estimula la síntesis hepática de glucosa, que es la principal causante de la hiperglucemia en ayunas. Esta hiperglucemia es a su vez un potente estímulo para la célula β , segregándose una mayor cantidad de insulina. El resultado es un estado de hiperglucemia e hiperinsulinemia. Este hiperinsulinismo tiene un efecto tóxico *per se* que induce hipertensión, liberación de ácidos grasos libres (AGL) y lesión endotelial, todos ellos factores predisponentes a aterosclerosis.

Se sabe que la resistencia a la insulina es de gran importancia en el desarrollo de la Diabetes (tipo 1 y 2), además está asociada a niveles altos de colesterol y de tensión arterial, aumentan el riesgo de aterosclerosis, existe un mayor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, alteraciones endoteliales y de la coagulación, e incluso colabora en la activación de procesos inflamatorios.¹⁵

El síndrome metabólico (obesidad abdominal, dislipidemia, hipertensión arterial y diabetes tipo 2) es consecuencia del hiperinsulinismo cuyas manifestaciones más importantes a largo plazo son una mayor mortalidad cardiovascular, afectando por igual a hombres y mujeres, siendo aún más probable a partir de los 60 años.¹⁵

Etiología

La causa exacta del desarrollo de la RI no se conoce, sin embargo los estudios actuales demuestran que no es el receptor de insulina lo que falla, sino las señales bioquímicas en la célula que están activadas por el receptor, se trata de un proceso multifactorial.¹⁴

Parece que los efectos de la hiperglucemia pueden contribuir a intensificar los efectos de la resistencia a la insulina, ya que los altos niveles de glucosa aumentan la producción de una molécula denominada glucosamina en varios tejidos. Esta molécula no interrumpe los efectos de la insulina en el metabolismo de la glucosa.

Algunos factores que pueden contribuir a padecer esta condición son:¹⁴

- ★ **Genéticas:** Existe una contribución hereditaria a la resistencia a la insulina, que podría asociarse también a los factores de acumulación de grasa abdominal.
- ★ **Género:** La mayoría de las mujeres que no han alcanzado la menopausia tienen aproximadamente la mitad de grasa abdominal que los hombres y tienen una respuesta mucho mejor a la insulina.
- ★ **Dieta:** El exceso de consumo de alimentos, ya sean carbohidratos, proteínas o grasas (grasas saturadas) también contribuyen a este padecimiento.
- ★ **Fármacos:** Hay un reducido número de fármacos (por ejemplo, la cortisona) que antagonizan el efecto de la insulina y contribuyen a generar resistencia a la insulina.

En este momento no existe un examen que comúnmente se use en el diagnóstico de la resistencia a la insulina. Las personas que padecen de este trastorno generalmente no presentan síntomas. Sin embargo es necesario determinar los factores de riesgo, así que se examinan los niveles de glucosa en ayunas para determinar si se padece pre-diabetes o, incluso, diabetes.¹⁶

Las técnicas más sofisticadas para medir la acción de la insulina *in vivo* son las *clamp*, principalmente porque provee información acerca de la cantidad de glucosa metabolizada por los tejidos periféricos durante la estimulación con insulina. El método consiste en la infusión endovenosa de insulina para mantener una insulinemia permanentemente elevada por encima de la correspondiente al período de ayuno; simultáneamente la glucosa sérica es ajustada al nivel normal en ayunas mediante una infusión variable de glucosa realizando determinaciones cada 2-5 minutos. El grado de insulinresistencia es inversamente proporcional a la utilización de la glucosa por los tejidos, es decir, cuanto menor es la glucosa tomada por los tejidos, más resistente es el paciente a la insulina. El resultado se expresa como mg/kg/min o bien en forma de coeficiente, siendo el valor 1 el resultado del *clamp* promedio en el grupo de edad de menos de 35 años y con 90-110% del peso ideal.⁶⁶

Sin embargo, tiene algunas desventajas ya que es bastante invasiva y se requiere instrumental sofisticado, además, al finalizar la prueba, el paciente es monitorizado durante algún tiempo porque el efecto hipoglicémico de la insulina se prolonga más allá de la recuperación de su nivel basal. Es por ello que se han ideado modelos más sencillos que relacionan la glucemia y la insulinemia en ayunas, tal como el HOMA (Homeostasis Model Assessment) que permite realizar estimaciones de resistencia insulínica y función de las células β mediante las concentraciones de la glucosa y la insulina plasmáticas en ayunas. Este método explora las características homeostáticas de un sistema metabólico para inferir el grado de sensibilidad insulínica compatible. En los últimos años, este método ha sido utilizado en varios estudios clínicos y epidemiológicos, en individuos sanos para establecer rangos de normalidad.¹⁷ Se considera resistencia insulínica cuando HOMA es mayor a 3.8, calculándose con la fórmula: **HOMA**= Insulina (mcUI/mL) x Glucemia (mg/dL)/ 405

La resistencia a la insulina puede mejorar con la reducción de peso y/o el tratamiento farmacológico de la hiperglucemia, pero rara vez se vuelve a la normalidad. El riesgo de desarrollar esta forma de diabetes aumenta con la edad, la obesidad y la falta de actividad física. Se presenta con mayor frecuencia en mujeres con diabetes gestacional previa y en individuos con hipertensión o

dislipidemia, y su frecuencia varía en los diferentes subgrupos raciales/étnicos. A menudo se asocia con una fuerte predisposición genética, más que la forma autoinmune de la DT1.⁷

Variantes polimórficas

Un polimorfismo genético se refiere a una serie de fenotipos alternativos normales y comunes. El polimorfismo en el sentido estricto, se refiere a la frecuencia de múltiples alelos en un locus, donde al menos 2 alelos aparecen con una frecuencia mayor al 1% en la población general.¹⁸

La mayoría de los polimorfismos no tienen efecto sobre el fenotipo, caen sobre regiones no codificantes, algunos pocos afectan el fenotipo, y un número muy pequeño, son responsables de enfermedades genéticas.

A nivel molecular, pueden existir codones polimórficos con variaciones en la secuencia codificante.¹⁸

Estudios de asociación

En la actualidad muchos investigadores centran sus trabajos en identificar genes con polimorfismos que se dan en la población con mayor frecuencia y que influyen en el riesgo de padecer una enfermedad, pero con baja probabilidad, a estos se les denomina variantes que confieren susceptibilidad genética a la enfermedad.¹⁹

Los estudios de asociación genética buscan establecer la relación estadística entre variables genéticas poblacionales y un fenotipo determinado (ejemplo: rasgo, riesgo de enfermedad, etc.). Estos están siendo utilizados para descubrir el componente genético que subyace a las enfermedades comunes de alta prevalencia como la DT2, la enfermedad coronaria o la insuficiencia cardíaca.²⁰

Estos estudios se dividen en dos tipos, estudios de cohortes prospectivas o de tipo casos-contróles en los cuales se establece el peso relativo del componente genómico con respecto a otros factores como el ambiente, en el riesgo de desarrollar la enfermedad.²⁰

Los polimorfismos más frecuentes son cambios de una única base, estos habitualmente se utilizan como marcadores genéticos, los llamados polimorfismos de un único nucleótido (SNP's, por sus siglas en inglés, *Single Nucleotide Polymorphisms*) son variaciones en la secuencia de DNA en la cual uno de los 4 nucleótidos es reemplazado por otro (ej.: C por A). Estos son la forma más frecuente de polimorfismo en el genoma, están presentes con un espaciamiento promedio de 1.5×10^6 bases, lo que representa aproximadamente 2×10^6 en todo el genoma humano. En la actualidad se cuenta con un mapa de alrededor de 1.4 millones de SNP's, de los cuales 60,000 se encuentran dentro de regiones codificantes o exones. Lo cual representa alrededor del 3% del total.²¹

Esta diversidad nucleotídica de SNP's en el genoma humano genera posibles haplotipos relacionados con rasgos bioquímicos o patológicos, estos cambios pueden ser en sí mismos funcionales y estar relacionadas a la fisiopatología de la enfermedad, pero en la mayoría de los casos, sólo son utilizados para el mapeo y ubicación de los verdaderos sitios relevantes. Los dos acercamientos posibles son: el análisis del "gen candidato" cuando existe evidencia previa de funcionalidad de la variante, y el riesgo de la enfermedad, o el de la "asociación indirecta", que consiste en estudiar un mapa denso de SNP's para la asociación con la enfermedad. La ventaja sería que no se requiere la determinación de cual SNP podría ser funcionalmente importante.¹⁹

Esencialmente, los marcadores son elegidos basados en algunos criterios:

- 1) La probabilidad previa de ser funcionales
- 2) La correlación con potenciales variantes causales
- 3) Ser variaciones de tipo missense (que producen la transcripción de un aminoácido alternativo) detectadas por secuenciamiento del ADN.

Sin embargo, el uso de variantes no codificantes para determinar variaciones funcionales es mucho más complejo ya que tenemos un conocimiento limitado de las secuencias regulatorias, con respecto al conocimiento que tenemos del código genético.

En la mayoría de las enfermedades comunes de alta prevalencia (como la enfermedad coronaria, la hipertensión arterial, etc.), sabemos que múltiples factores genéticos y no genéticos interactúan para afectar el fenotipo. Estas

enfermedades y rasgos reciben, desde el punto de vista genético, el nombre de “rasgos complejos” y para la mayoría de ellas la variación atribuible al componente genético subyacente sigue siendo desconocida.¹⁹

Desde el punto de vista estadístico, un polimorfismo constituye una variable categórica con varios genotipos posibles. Habitualmente se interpreta como significativa la asociación entre una variable genética y un fenotipo cuando el valor de $p < 0.05$, pero algunas de estas asociaciones tienen dificultades para reproducirse consistentemente. La posible falla de no replicar consistentemente las asociaciones se deban al modesto efecto que tienen las variantes causales en el riesgo de enfermedad.¹⁹ La posibilidad de encontrar nuevas variantes genéticas nos permitirá en el futuro identificar sub-grupos de riesgo, así como, describir nuevos genes involucrados. El descubrimiento de los genes directamente relacionados con la enfermedad permitirá el diseño de nuevas moléculas terapéuticas.

Estudios de asociación buscan relacionar un marcador genético particular con una enfermedad (o un rasgo complejo) a través del análisis de una población. En la genética de la DT2 la búsqueda de un gen único causante ha sido infructuosa, sin embargo, hay avances importantes en la identificación de genes relacionados a esta enfermedad denominados genes candidatos. Hasta ahora se conocen más de 250 genes relacionados con DT2 (Tabla 1). Entre estos destacan genes que codifican para proteínas involucradas en la señalización de la insulina, en el transporte de glucosa, en la síntesis de glucógeno, en la síntesis y absorción de ácidos grasos y en la diferenciación adipocítica. Ya que en las enfermedades multigénicas, las mutaciones se localizan en más de un gen y por lo tanto la afección se presenta como resultado del conjunto de alteraciones en cada uno de ellos, convirtiéndola en una enfermedad compleja y multifactorial, como lo es la DT2.²²

Gen	Alias	Localización cromosómica	Cambios asociados a DT2	Función del gen/Fenotipo asociado
CAPN10	CAPN10 o GRP35 dada su cercanía	Cromosoma 2q37.3, tamaño 51.86 kDa, de 241238803 e 241290665 (NCBI gl:13279049)	SNP43, lms del 19, SNP63	Sus diferentes productos se localizan en la membrana celular o en citoplasma. Tienen actividad enzimática intracelular tipo cisteína proteasa. Pertenecen al grupo de las peptidasas de las calpains.
PPAR-g2	PPARG1, PPARG2, HUMPPARG, NR1C3	Cromosoma 3p25, tamaño 146.97 Kb de 12303887 a 1240855	Pro12A	Proteína nuclear involucrada en la vía de los ácidos grasos. Presenta actividad de receptor.
ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1	Cromosoma 19 (19q13.2)	R230C	Proteína transportadora de membrana dependiente de ATP. Lleva colesterol y fosfolípidos hacia las apolipoproteínas propias de las HDL
KCNJ11	BIR, HHF2, IKATP, ATP-sensitive inward rectifier potassium channel 11.	Cromosoma 11 (11p15.1), del 17406794 a 17410877	Glu23Lys o E23K	Proteína a partir de la cual se producen 4 subunidades de canales de K sensibles a ATP. En estas mutaciones, los canales no cierran, reduciendo así la secreción de insulina en las células b.

Tabla1. Algunos ejemplos de los más de 250 genes que han sido relacionados con DT2. *Modificado de Genes candidatos como posibles marcadores de susceptibilidad a diabetes tipo 2. 2005.*

Factores de transcripción

Son proteínas que coordinan y regulan la expresión de un gen o de un grupo de genes. En muchos casos regulan su propia expresión y también es frecuente que regulen a otros factores de transcripción. Éstos actúan sobre segmentos específicos de DNA sobre los cuales ejercerán su efecto. Conectan los estímulos externos e internos con las respuestas biológicas actuando como transductores de señales.²³

Los factores de transcripción están formados por diferentes dominios²³:

1. Dominio de Unión al DNA: Que reconoce y se une a las secuencias de DNA que actúa de manera proximal.
2. Dominio de Transactivación: Que se encarga de activar la transcripción.
3. Dominio de Unión al Ligando: Se une al factor desencadenante de la transcripción, que en muchos de los casos no se conoce por lo que reciben el nombre de "Receptores Huérfanos".
4. Dominio de Dimerización: Permite que los factores transcripcionales pueden agruparse como dímeros, aunque no todos los factores los presentan.

Existe una importante interacción entre los factores de transcripción hepatocelulares que forman una cadena reguladora que mantiene la función de la célula β y, por lo tanto, la normalidad de la homeostasis de la glucosa. Sus alteraciones causan una disfunción progresiva de la célula β .²⁴

Particularmente PAX-4 es un factor transcripcional que contribuye al desarrollo de los islotes pancreáticos en etapas tempranas de su formación, posteriormente su presencia se restringe solo a células β pancreáticas maduras.

FACTOR NUCLEAR HEPÁTICO 4 α (HNF-4 α)

Generalidades:

Nombre: Factor nuclear 4 alfa del hepatocito

Cromosoma: 20

Localización: q12-q13.1

Estructura del gen:

Exones: 12

Tamaño: 30.106 bases

Proteína: Peso de 51.7KD, formada por 465 aminoácidos

Expresión: Se expresa en órganos del sistema digestivo (intestino e hígado), sistema endocrino (páncreas), sistema respiratorio (bronquios y pulmones) y sistema urinario (riñón). También se encuentra en tejido

epitelial (secretor-glandular-endocrino). Está relacionado directamente con células endocrinas (células α y β pancreáticas) y células epiteliales. A nivel intracelular, actúa en núcleo, cromatina y cromosoma. A la vez estudios recientes relacionan su expresión en ovario y parte externa del aparato reproductor femenino, aunque el papel de HNF-4 α en estos tejidos aún no está dilucidado.

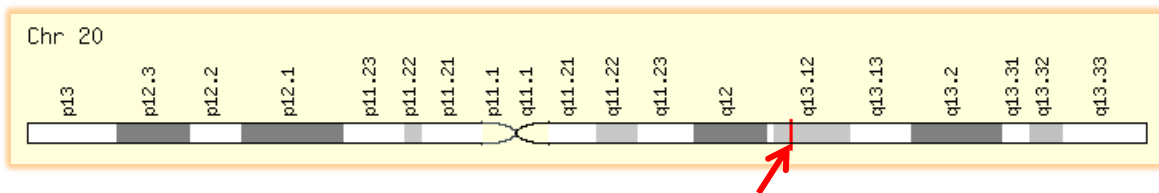


Fig. 9. Señalado con una flecha la localización del gen HNF-4 α en el cromosoma 20.

Tomado de *Transcription Factor Encyclopedia* 2010

Es miembro de la superfamilia de receptores nucleares (NR2A1) de factores de transcripción dependientes de ligando, siendo un receptor tiroideo-esteroideo. Es uno de los receptores nucleares más altamente conservados y se encuentra en cada organismo animal examinado hasta ahora, desde la esponja hasta el hombre.²³ Este receptor para glucocorticoides regula y coactiva proteínas en el páncreas, tejido adiposo, hígado, riñón e intestino, además de otras funciones. Después de varios intentos para identificar el ligando endógeno, ahora se sabe que HNF-4 α une un único ácido esencial, ácido linoléico (LA), sin embargo, la función exacta del ligando aún queda por determinarse.²⁴

HNF-4 α controla la expresión de HNF-1 α en células hepáticas y endodermo, y existe evidencia genética humana que apoya que esto es así en los islotes pancreáticos, así como la expresión de otros genes involucrados en el desarrollo y función pancreática.

La proteína codificada por este gen, es un factor de transcripción nuclear el cual se une al DNA como un homodímero. La proteína codificada, controla la expresión de varios genes y juega un papel importante en el desarrollo del hígado, riñón e intestinos.²³ Se han encontrado hasta ahora 27 mutaciones en este gen (Fig. 10),

algunas están asociadas con el desarrollo progresivo en la hiperglicemia, y de igual manera una disminución progresiva en la producción y secreción de la insulina, con un deterioro progresivo de las células β .

Estudios en otros países asocian mutaciones en este gen con la mayor prevalencia de eventos macro vasculares, así como la aparición de hiperglicemia en adolescentes y adultos jóvenes. Además de que HNF-4 α regula canales de ATP dependientes de K^{++} e insulina en las células β .²⁴

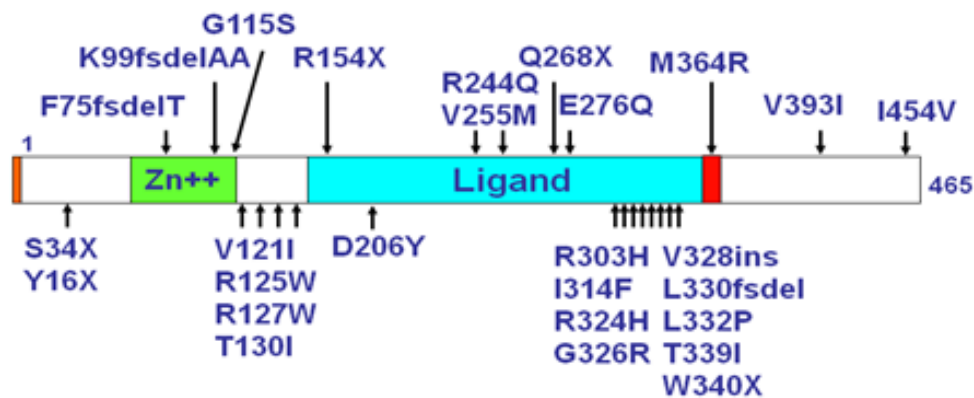


Fig. 10. Se muestran las mutaciones heterocigotas encontradas en el gen humano HNF-4 α . Tomado de *Transcription Factor Encyclopedia* 2010.

Existen modelos fundamentales de transporte de glucosa al interior de la célula, como el de difusión facilitada que utilizan la mayoría de las células. Este tipo de transporte es uniport y existen al menos siete transportadores diferentes, que se han ido numerando según su orden de descubrimiento. Estos acarreadores de glucosa constituyen una familia de proteínas de membrana estructuralmente relacionados, que se encuentran en todos los tipos celulares, contienen de 442 a 524 aminoácidos con una estructura secundaria muy plegada y que cruzan 12 veces la membrana celular. Estas proteínas transportadoras se denominan GLUT.¹³ Para el caso de GLUT-2 que se encuentra en hígado, riñón, intestino delgado, células β pancreáticas y algunas células hipotalámicas, podría mostrar algunas alteraciones si existieran mutaciones en HNF-4 α , ya que este gen regula la expresión de genes mitocondriales que intervienen en las vías metabólicas de carbohidratos, proteínas y lípidos por lo cual se halla directamente involucrado en el metabolismo del colesterol y de los ácidos grasos.

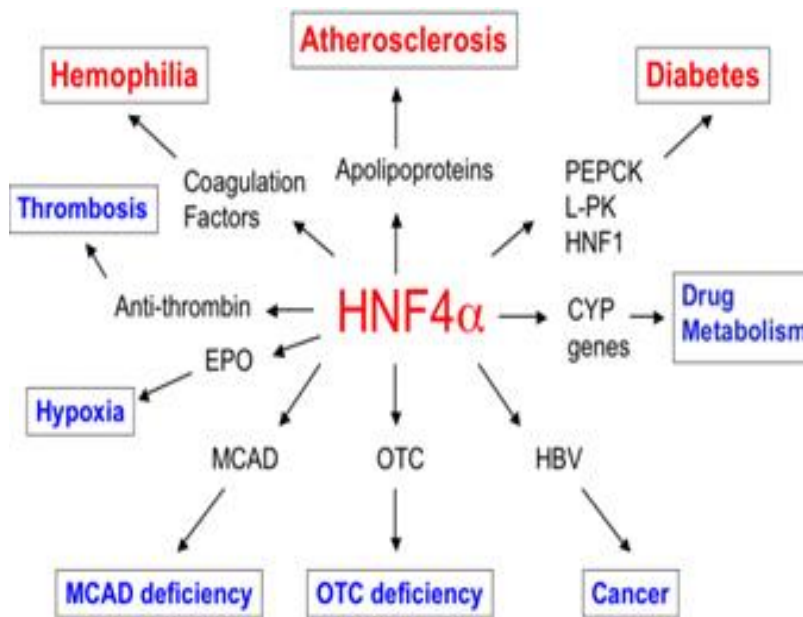


Fig 11. HNF-4 α y enfermedades humanas. Tomado de *Transcription Factor Encyclopedia* 2010.

Como se muestra en la figura 11, HNF-4 α está correlacionado con varias enfermedades humanas a través de mutaciones en sus sitios de unión (hemofilia, diabetes) o en el mismo gen (diabetes). También está indirectamente relacionado con muchas enfermedades humanas a través de

los genes diana que regula. Polimorfismos en el gen HNF-4 α también se han asociado con enfermedad de Crohn, arterosclerosis y cáncer.

T130I

Recientemente, se ha encontrado que en el exón 4 del gen HNF-4 α , la variante T130I en diabéticos mestizos, con una frecuencia alélica del 8%. Esta mutación fue descrita por Yamagata y cols. en 1996, y afecta a un aminoácido conservado del dominio de unión al DNA. La variante ha sido asociada a la aparición de la diabetes en población japonesa y danesa con una frecuencia alélica del 4.7% y 1.75% respectivamente. Sin embargo es importante notar que los resultados de estudios realizados en población española, no reportan mutaciones en este gen.²⁷ En lo referente a la mutación T130I existe una sustitución de una citosina por una timina (ACT-ATT) en el codón 133 del gen HNF-4 α dando lugar a un cambio de una treonina por una isoleucina en la proteína, observándose una pérdida de la actividad de un 30-40% aproximadamente.²⁷

El mecanismo por el cual se desarrolla la diabetes en el páncreas no es conocido, pero en ratones knock-out ocasionó alteraciones como disminución de las HDL-C y disminución de triglicéridos. La evolución de esta mutación es indicativa de un SNP responsable sólo o en conjunto de esta enfermedad en diferentes poblaciones.²⁷

PAIRED BOX 4 (Pax 4)

Generalidades:

Nombre: Paired Box 4

Cromosoma: 7

Localización: 7q32

Estructura del gen:

Exones: 9

Tamaño: 5, 637 bases

Proteína: Peso de 37.833 KDa, formada por 350 aminoácidos

Expresión: Estos genes juegan un papel importante durante el desarrollo fetal y el crecimiento de cáncer. Además de que está involucrado en el desarrollo de islotes pancreáticos y estudios en ratones han demostrado un papel en la diferenciación de las células beta de los islotes pancreáticos.

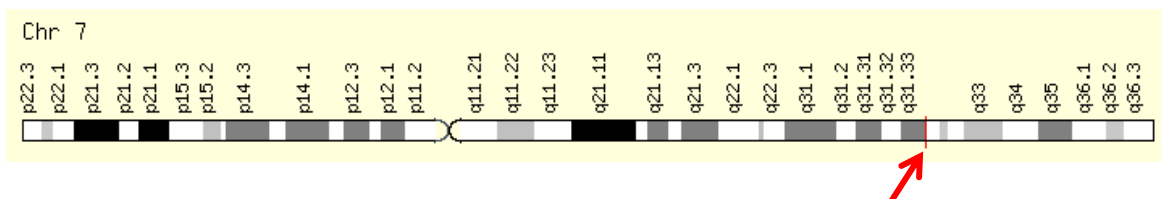


Fig 12. Señalado con una flecha la localización del gen Pax-4 en el cromosoma 7.

Tomado de *Transcription Factor Encyclopedia* 2010

Uno de los órganos más importantes dentro del metabolismo de la glucosa, es el páncreas. Sin embargo, los mecanismos moleculares para el desarrollo de este órgano no son completamente conocidos, no obstante varios factores de diferenciación y factores transcripcionales se han identificado tales como: Ngn3, IPF1, BETA2/NeuroD1, Pax4, Pax6, Isl1, Nkx2.2 y NKX6.6. que son cruciales para la organogénesis y diferenciación pancreática.²⁸

El gen Pax4 pertenece a la familia Pax cuyos miembros contienen un homeodominio. Pax4 se expresa selectivamente durante el desarrollo del páncreas y la espina dorsal. Su expresión se inicia en las primeras etapas de la diferenciación celular y posteriormente, ésta se restringe a las células β y persiste así hasta la edad adulta. La delección homocigota de Pax4 en ratones da por resultado la ausencia de células β y δ , así como muerte dentro de los 3 días posteriores al nacimiento.²⁸

R133W

Algunos defectos genéticos en el control de factores de transcripción de la expresión del gen de la insulina y otras proteínas críticas para el correcto desarrollo de la célula β -pancreática dan lugar a síndromes diabéticos caracterizados por una rápida evolución hacia la deficiencia de insulina. Se ha reportado recientemente de una mutación de sentido erróneo (R121W) de Pax4 en pacientes DT2 en una población japonesa. Los individuos portadores de esta variante se caracterizan por una dependencia de la insulina ya sea transitoria al inicio de la diabetes o una rápida evolución hacia la insulino deficiencia, lo que sugiere que mutaciones en el gen Pax4 conducen a graves disfunciones en las células β . Los mecanismos subyacentes de la disfunción de estas células no se conocen con exactitud, sin embargo, la evidencia preliminar sugiere un aumento en la desensibilización a la glucosa.

La cetoacidosis diabética (KPD) pertenece a un subgrupo raro de DT2 con deficiencia severa de insulina. Esta enfermedad es comúnmente reportada en

personas africanas y afro-americanos, aunque también se ha observado en los indios norteamericanos, individuos japoneses, chinos e hispanos.³⁰

Las similitudes clínicas entre los diabéticos japoneses portadores de la mutación R121W en PAX4 y pacientes de África occidental con KPD sugieren que las mutaciones en PAX4 podrían también predisponer a esta enfermedad.²⁹ El fenotipo de este tipo de diabetes es distinto al de tipo 1 y tipo 2. Se caracteriza por una dependencia aguda de insulina, sin los marcadores inmunológicos observados en la clásica DT1, con unos pocos días o semanas de poliuria, polidipsia y pérdida de peso. El defecto de la insulina en muchos casos se resuelve después de un tratamiento y los individuos pueden alcanzar niveles normoglucémicos que pueden durar varios meses o años sin volver a requerir insulina.²⁹

Una variante étnica específica de PAX4 (Arg133Trp) resultante de la conversión de arginina (R) a triptófano (W) en la posición 133 (R133W), asociado con alteraciones funcionales *in vivo* e *in vitro*, predispone a KPD, y representa un marcador de grave deficiencia de insulina en la población de origen africano occidental.²⁹

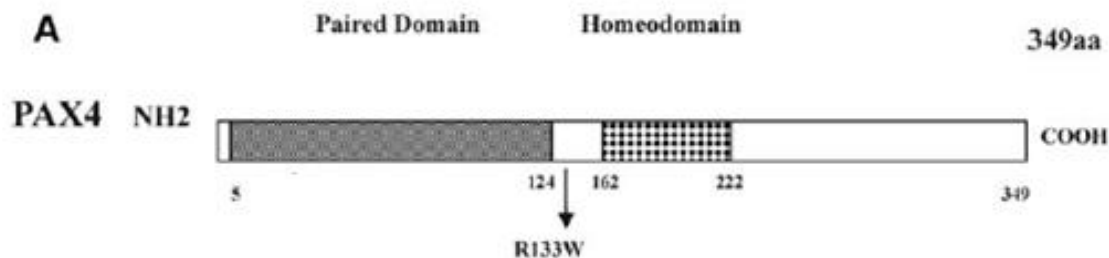


Fig. 12 Posición de la mutación R133W en el gen Pax-487 . Tomado de *Transcription Factor Encyclopedia 2010*

Así, la presencia de mutaciones en factores de transcripción clave para la diferenciación y regulación de células pancreáticas podría conferir predisposición al desarrollo de diabetes de aparición temprana en México. La gran variabilidad genética reportada en los llamados diabetogenes en diferentes partes del mundo, nos obliga a evaluar la genética de nuestra población, pues sólo así podremos entender mejor las bases moleculares de la diabetes y contribuir al desarrollo de nuevas tratamientos en México.

Etnias en México

Al igual que otras poblaciones latinas, los mestizos mexicanos constituyen una población mestiza de reciente formación; conformada principalmente por orígenes ancestrales amerindios y europeos, y en menor proporción africano.⁵⁹

Las diversas condiciones demográficas e históricas de México han generado heterogeneidad genética entre y al interior de las diferentes regiones del país. A lo largo de la historia, la ideología del mestizaje ha sido un proceso más que biológico, un cambio cultural y social, que señala al mestizo como el grupo dominante y que caracteriza a la población mexicana. Sin embargo, según los últimos datos recabados por el INEGI acerca de las poblaciones indígenas en México (Figura 13), se registró que cerca del 7.1% de la población en edad de 5 años y más, del país, son considerados indígenas.

La aproximación del volumen y la ubicación de la población indígena del país se realizan mediante la identificación de la población hablante de lengua indígena, ya que cada lengua corresponde a una etnia y a una cultura distinta de las demás en el país.⁶¹

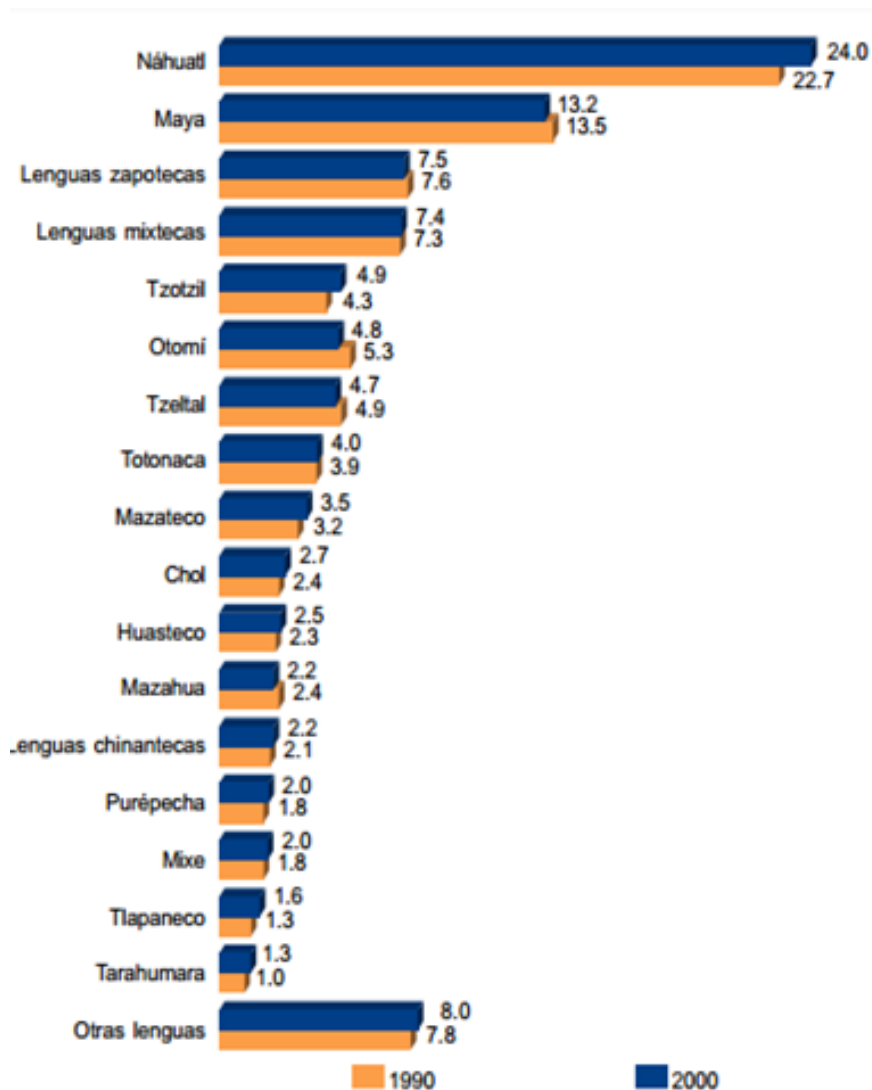


Fig. 13. Distribución porcentual de la población hablante de lengua indígena, según principales lenguas. Tomado de *INEGI, XI Censo general de población y vivienda 1990 y 2000*.

Los Mayas representan un grupo étnico geográficamente distante de otros grupos amerindios mexicanos y con marcadas diferencias culturales, sociales e históricas respecto a éstos.

En la figura 14 se muestra un mapa en donde se observa la localización exacta del Municipio José María Morelos, cuya población fue seleccionada para este estudio. Tiene apenas 2058 habitantes y se encuentra en una región geográfica asilada, donde aún conservan tradiciones y costumbres propias de la población.

Se encuentra fronteriza con los Estados de Yucatán y Campeche, además de que forma parte de la Zona Maya de Quintana Roo, junto con los municipios de Felipe Carrillo Puerto y Lázaro Cárdenas. Su superficie es de 6,739 km², tiene un total de 64 comunidades y las principales actividades económicas son las agropecuarias, tales como la agricultura, silvicultura y ganadería.⁶⁴



Fig. 14 Localización exacta de la comunidad de Sabán, marcada con el punto A

II. JUSTIFICACIÓN

Las asociaciones de los polimorfismos están bajo la influencia de la región geográfica y de la mezcla poblacional. La presencia de una asociación gen-enfermedad estadísticamente significativa facilita la detección de estas variantes moleculares en poblaciones con mayor riesgo para desarrollar cierta enfermedad, pudiendo ser empleadas como marcadores de riesgo o susceptibilidad. La población mestiza mexicana está compuesta de una mezcla genética cuyo componente mayor es el indígena, estimado en un 70% promedio, por esta razón es de vital importancia evaluar el componente genético de los grupos indígenas de México que pudieran estar asociados a fenotipos específicos.

En el presente estudio se seleccionaron dos genes involucrados en el desarrollo y función del páncreas. Existe evidencia que asocia el polimorfismo T130I del gen HNF-4 α como factor de susceptibilidad para desarrollar diabetes en población mestiza mexicana y el polimorfismo de R133W del gen Pax-4 que ha sido encontrado en pacientes diabéticos de población mexicana y africana, pero con diferentes efectos entre ellas. La investigación de estos polimorfismos en los grupos indígenas mexicanos como la población Maya de Quintana Roo, aportará información importante para ayudar a entender los factores hereditarios asociados a la diabetes de los mexicanos, para así poder desarrollar nuevas alternativas de tratamiento para este padecimiento.

III. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los polimorfismos T130I de HNF-4 α y R133W de Pax-4 como factores de susceptibilidad al desarrollo de diabetes en una población Maya de Quintana Roo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ★ Determinar la frecuencia de los polimorfismos T130I del gen HNF-4 α en una población Maya de Quintana Roo.
- ★ Determinar la frecuencia de los polimorfismos R133W del gen Pax-4 en una población Maya de Quintana Roo.
- ★ Evaluar la asociación entre los polimorfismos estudiados y la susceptibilidad para padecer diabetes tipo 2 en una población Maya de Quintana Roo.

IV. HIPÓTESIS

La presencia de polimorfismos en factores de transcripción claves para la diferenciación y regulación de células pancreáticas podría conferir predisposición al desarrollo de diabetes tipo 2 (DT2).

Se espera que en la población diabética del estudio se encuentren individuos portadores de las variantes polimórficas T130I en gen HNF-4a y R133W del gen Pax-4. Y que exista una asociación entre los polimorfismos estudiados y la susceptibilidad para padecer diabetes tipo 2 en una población Maya de Quintana Roo

V. MATERIAL Y MÉTODOS

La investigación se realizó en la población de Sabán, localizada en el Municipio de José María Morelos (en el Estado de Quintana Roo). Se colectaron 255 muestras de una población homogénea en función de los niveles socioeconómicos y culturales. Todos los participantes fueron informados del propósito y objetivo de este estudio, firmando una carta consentimiento para participar en el mismo. (ANEXO 1)

Al mismo tiempo, se trabajó con una población mínima de 20 personas entre 50 y 80 años que no padecían diabetes, y que sus parámetros bioquímicos estuvieran dentro de los establecidos por la OMS, para realizar una comparación entre este grupo del Distrito Federal y los indígenas Mayas de Quintana Roo que no padecieran diabetes.

Extracción de DNA

Las muestras tomadas fueron de aproximadamente 4.5 mL de sangre periférica y el DNA fue extraído de leucocitos. La extracción se realizó por “precipitación salina”. La técnica se basa en la purificación de núcleos, solubilizando las membranas plasmáticas por medio de Tritón X 100 seguido de la lisis de los núcleos purificados con detergentes como SDS (dodecil sulfato de sodio) y la digestión con Proteinasa K precipitándose el DNA en etanol, finalmente se determinó la pureza y concentración realizando lecturas a 260 y 280 nm.

(ANEXO 2)

Genotipificación de T130I y R133W

El análisis molecular se llevó a cabo por PCR-RFLP:

1. Amplificación del exón 4 de HNF-4 α y del exón 3 de PAX4, corroborando la talla del amplicón, 271 pb y 165 pb respectivamente, sobre un gel de agarosa 1.2% frente a un marcador de peso molecular de 100 pb.
2. Corte de la amplificación mediante el uso de enzimas de restricción *SfuI* y *HspII92* para HNF-4 α y Pax-4 respectivamente, con verificación del mismo sobre un gel de agarosa al 3% frente a un marcador de peso molecular de 100 pb. Los cortes esperados de las enzimas de restricción fueron:

***SfuI*: 81 pb + 190 pb**

***Hsp92II*: 109 pb + 56 pb**

Si un individuo tiene alguna de las variantes polimórficas analizadas en este estudio, la enzima de restricción cortará este sitio particular. Se espera que en los individuos que tengan DT2, se encuentre la presencia de este sitio de restricción en específico.

Los individuos que presentan un sitio de restricción determinado en ambos alelos serán homocigotos y generarán dos bandas electroforéticas. Los individuos con un sitio de restricción presente en un solo alelo serán heterocigotos y generarán tres bandas electroforéticas. Los individuos que son homocigotos normales (sin la variante polimórfica) no presentarán ningún corte y solo se observará la talla del amplicón correspondiente a cada gen.

Datos antropométricos

Se registraron medidas antropométricas de todos los participantes; cintura, cadera, estatura y peso. Se calcularon el índice de masa corporal (ICM) y el índice cintura-cadera (ICC)

Índice de Masa Corporal (IMC)

Esta medida califica a la población dentro de parámetros de normopeso, sobrepeso y obesidad, y se calcula de la siguiente manera:³¹

$$\text{IMC} = \frac{\text{Peso (Kg)}}{\text{Estatura (mts}^2\text{)}}$$

Interpretación:

Normopeso: 18.5 – 24.9

Sobrepeso: 25.5 – 29.9

Obesidad > 30

Índice Cintura-Cadera (ICC)

Estima la cantidad de grasa abdominal, y se calcula:³¹

$$\text{ICC} = \frac{\text{Cintura (cm)}}{\text{Cadera (cm)}}$$

Interpretación:

Mujeres < 0.84

Hombres < 0.93

Perfil Bioquímico

El perfil bioquímico constó de las siguientes pruebas:

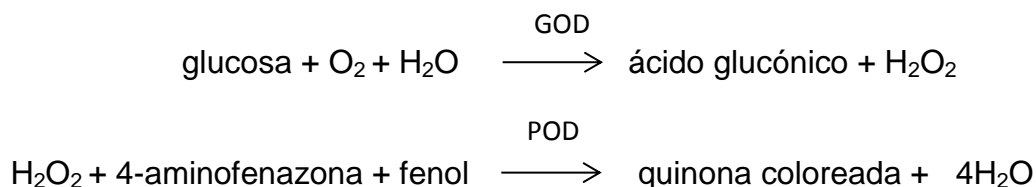
❖ **GLUCOSA**

La patología más común relacionada con el metabolismo de hidratos de carbono es la DT2. El diagnóstico precoz y control de los pacientes diabéticos tiene por objetivo evitar las complicaciones de los síntomas resultantes de la hiperglucemia.³²

FUNDAMENTO

La glucosa es oxidada en presencia de glucosa oxidasa (GOD). El peróxido de hidrogeno formado, reacciona bajo la influencia de la peróxidasa (POD) con fenol y 4-aminofenazona para formar un complejo rojo-violeta de quinona. La intensidad del color es proporcional a la concentración de glucosa.³²

El esquema de la reacción es la siguiente:



VALORES DE REFERENCIA

Suero o plasma sanguíneo: 70-100 mg/dL

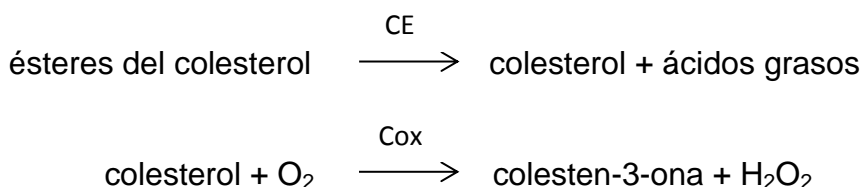
❖ COLESTEROL

La determinación de colesterol en forma aislada tiene utilidad diagnóstica limitada y su concentración varía en un gran número de condiciones clínicas. El colesterol es uno de los factores contribuyentes al desarrollo de arteoesclerosis.³³

FUNDAMENTO

La colesterol esterasa (CE) hidroliza los ésteres para originar colesterol libre y ácidos grasos. Este colesterol libre se oxida en presencia de colesterol oxidasa (Cox) para dar colestén-3-ona y peróxido de hidrógeno. Un cromógeno quinonaimina, con absorción máxima de 500 nm, se produce cuando el fenol se acopla oxidativamente con 4-aminofenazona, en presencia de peroxidasa (POD) con peróxido de hidrógeno. La intensidad del color rojo final es proporcional a la concentración total de colesterol.³³

El esquema de la reacción es la siguiente:





VALORES DE REFERENCIA

La NCEP (*National Cholesterol Education Program*) provee los siguientes valores de referencia:

Deseable: < 200 mg/dL

Moderadamente alto: 200-239 mg/dL

Elevado \geq 240 mg/dL

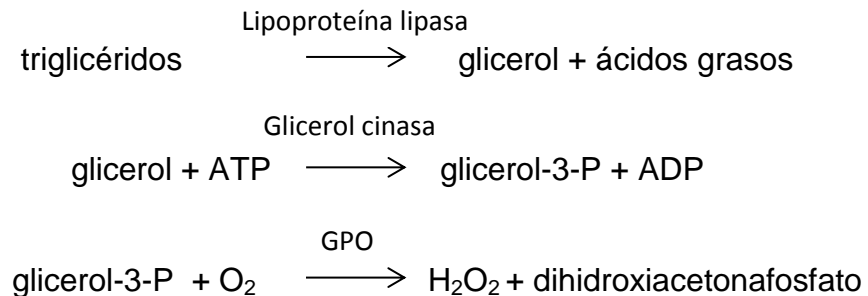
❖ TRIGLICÉRIDOS

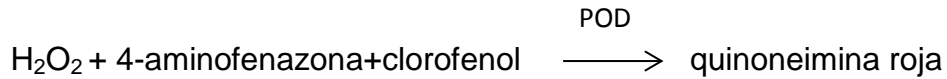
Su medición es importante en el diagnóstico y manejo de las hiperlipidemias, que pueden ser de origen genético o secundario a algunos tipos de patologías como la DT2.³⁴

FUNDAMENTO

El glicerol y los ácidos grasos se forman en una primera etapa por la acción de la lipasa sobre los triglicéridos. El glicerol se fosforila por el adenosin-5-trifosfato (ATP) para producir glicerol-3 fosfato (G-3-P) y adenosin-5'-difosfato (ADP) en una reacción catalizada por la glicerol-cinasa. La G-3-P es oxidada por la glicerolfosfato oxidasa (GPO) produciendo dihidroxiacetonafosfato (DAP) y peróxido de hidrógeno. Los peróxidos reaccionan con 4-aminoantipirina y clorofenol bajo la influencia catalítica de la peroxidasa (POD) para formar una quinoneimina de color rojo.³⁴

El esquema de la reacción es la siguiente:





VALORES DE REFERENCIA

La NCEP (*National Cholesterol Education Program*) provee los siguientes valores de referencia:

Deseable: < 150 mg/dL

Moderadamente alto: 150-199mg/dL

Elevado: 200 – 499 mg/dL

Muy Elevado: ≥ 500 mg/dL

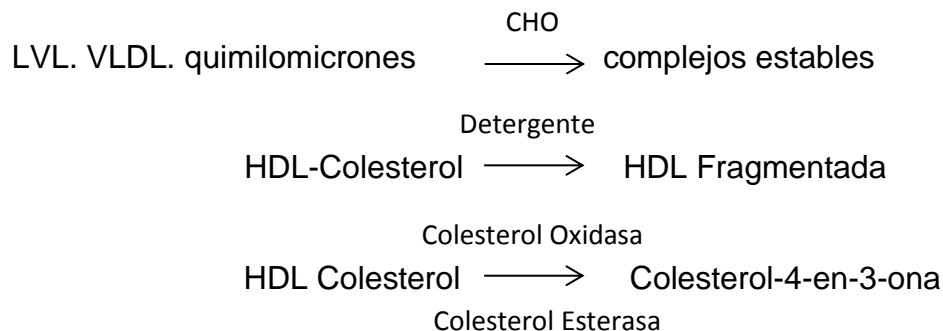
❖ HDL-C

Las lipoproteínas plasmáticas son partículas esféricas que contienen cantidades variables de colesterol, triglicéridos, fosfolípidos y proteínas. La proporción relativa de proteína y lípido determina la densidad de estas lipoproteínas y provee las bases sobre la cual establecer la clasificación.³⁵

FUNDAMENTO

En la primera etapa de la reacción, se solubiliza y consume el colesterol libre o unido a proteínas distintas de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en una reacción que involucra a colesterol oxidasa (CHO) dando lugar a un complejo estable no coloreado. En una segunda etapa, las HDL son selectivamente fragmentadas por un detergente. El HDL-colesterol es liberado para reaccionar con colesterol esterasa y colesterol oxidasa, dando un producto coloreado.³⁵

El esquema de la reacción es el siguiente:



VALORES DE REFERENCIA

La NCEP (*National Cholesterol Education Program*) provee el siguiente valor de referencia : 40-60 mg/dL

❖ **LDL-C**

La lipoproteína de baja densidad (LDL-c) se puede medir directamente, aunque normalmente se reporta mediante el cálculo de una fórmula llamada “*Friedwald*”, pero ésta no tiene validez cuando los triglicéridos superan los 400mg/dL. La fórmula es:³⁶

$$LDLc = \text{colesterol total} - HDLc - \frac{\text{Triglicéridos}}{5}$$

VALORES DE REFERENCIA

La NCEP (*National Cholesterol Education Program*) provee el siguiente valor de referencia:

Óptimo < 100 mg/dL

Aceptable: 110- 129 mg/dL

Límite: 130- 159 mg/dL

Alto: 160-189 mg/dL

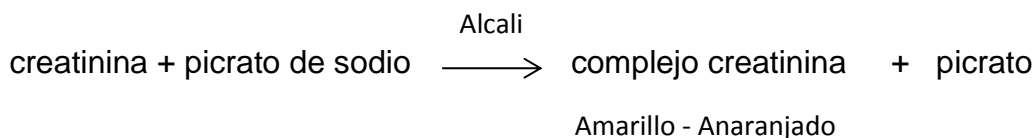
Muy alto: > 190 mg/dL

❖ **CREATININA**

La creatinina es sintetizada en el cuerpo en una proporción relativamente constante a partir de la creatina, originada durante las contracciones musculares, ésta es eliminada por filtración a través de los glomérulos renales y excretada por la orina. Los niveles elevados de creatinina sérica están por lo general asociados a trastornos renales. Además de que una de las complicaciones graves es la nefropatía diabética.³⁷

FUNDAMENTO

Este procedimiento está basado en una modificación de la reacción original del picrato. La creatinina en condiciones de alcalinidad reacciona con los iones picrato con formación de un complejo rojizo.³⁷



VALORES DE REFERENCIA

Suero, plasma

Hombres 0.70 – 1.20 mg/dL (62 - 106 $\mu\text{mol/L}$)

Mujeres 0.50 – 0.90 mg/dL (44 - 80 $\mu\text{mol/L}$)

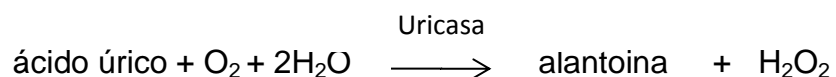
❖ **ÁCIDO ÚRICO**

El ácido úrico es el mayor producto del catabolismo de los nucleósidos púricos (adenosina y guanosina). Estas pueden sintetizarse endógenamente por descomposición de los ácidos nucleicos o incorporarse externamente a través de dietas en que los ácidos nucleicos estén presentes. Es también un marcador de los defectos en la reabsorción renal.³⁸

FUNDAMENTO

El ácido úrico es oxidado por la acción de la uricasa, en alantoina y peróxido de hidrógeno. En presencia de peroxidasa (POD) la mezcla de diclorofenol sulfonato (DCFS) y 4-aminoantipirina (4-AA) se condensan por acción del peróxido de hidrógeno, formando una quinonaimina coloreada proporcional a la concentración de ácido úrico en la muestra.³⁸

Se basa en la siguiente reacción:



VALORES DE REFERENCIA

Suero, plasma

Hombres 3,5 - 7,2 mg/dL (208 - 428 $\mu\text{mol/L}$)

Mujeres 2,6 - 6,0 mg/dL (155 - 357 $\mu\text{mol/L}$)

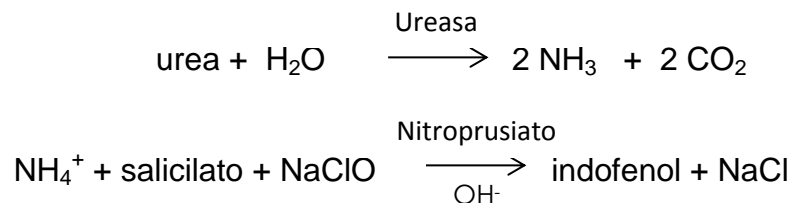
❖ UREA

La urea es el principal producto final del metabolismo proteico en el cuerpo. La importancia de la concentración de urea en sangre reside en su valor como indicador de la función renal.³⁸

FUNDAMENTO

La urea es hidrolizada por la ureasa convirtiéndose en amoníaco y anhídrido carbónico. El amoníaco generado reacciona en medio alcalino con el hipoclorito y el salicilato sódico en presencia de nitroprusiato, agente precursor de un cromóforo verde cuya intensidad es proporcional a la concentración de urea en la muestra.³⁸

Se basa en la siguiente reacción:



VALORES DE REFERENCIA

Suero, plasma

Adultos (12-60 años) 15 - 40 mg/dL (2,5 - 6,6 mmol/L)

El impacto negativo de la DT2 es bien reconocido, según un estudio reciente, los adultos con diabetes recién diagnosticada parecen estar en mayor riesgo de enfermedad hepática avanzada, también conocida como la hepatopatía diabética. Es por esto, que también se realizaron las mediciones de la transaminasa glutámico pirúvica (TGP) y transaminasa glutámico oxalacética (TGO).

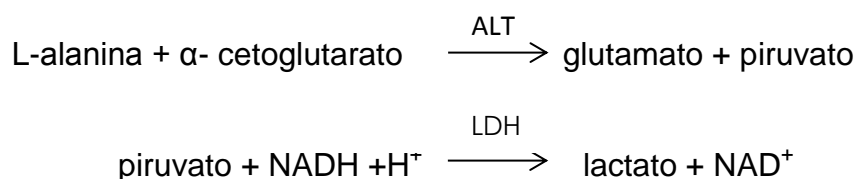
❖ **TRANSAMINASA GLUTÁMICO PIRÚVICA (TGP)**

Los niveles séricos de TGP se manifiestan considerablemente elevados en las lesiones agudas del hepatocito. Es una enzima intracelular que se encuentra principalmente en las células del hígado y el riñón.³⁹

FUNDAMENTO

La enzima TGP cataliza la transferencia reversible de un grupo amino de la alanina al α -cetoglutarato con formación de glutamato y piruvato. El piruvato producido es reducido a lactato en presencia de lactato deshidrogenasa (LDH) y NADH. La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinado fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de TGP en la muestra.

Se basa en la siguiente reacción:



VALORES DE REFERENCIA

Suero, plasma: 5 - 36 U/L

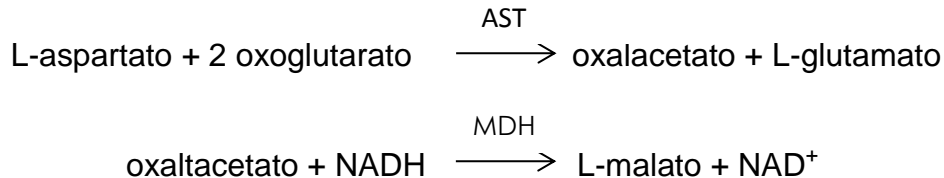
❖ **TRANSAMINASA OXALACÉTICO GLUTÁMICA (TGO)**

Las cifras séricas de la TGO aumentan considerablemente en lesiones agudas tanto del corazón como del hepatocito. Cuando se emplean en conjunción con la TGP ayuda en el diagnóstico de infartos de miocardio, ya que el valor de la TGP se mantiene dentro de los límites normales y aumenta en los niveles de TGO.⁴⁰

FUNDAMENTO

La enzima (TGO) cataliza la transferencia reversible de un grupo amino del aspartato al α -cetoglutarato con formación de glutamato y oxalacetato. El oxalacetato producido es reducido a malato en presencia de malato deshidrogenasa (MDH) y NADH:

Se basa en la siguiente reacción:



VALORES DE REFERENCIA

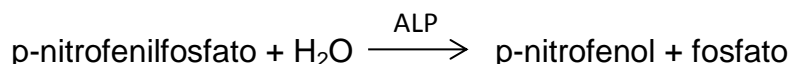
Suero, plasma: 5 - 34 U/L

❖ FOSFATASAS ALCALINAS

Los niveles de fosfatasa alcalina sérica son de interés en el diagnóstico de desórdenes hepatobiliares y óseos asociados con incremento en la actividad osteoblástica.⁴¹

FUNDAMENTO

La fosfatasa alcalina cataliza la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato (pNPP) a pH 10,4 liberando p-nitrofenol y fosfato, según la siguiente reacción:



La velocidad de formación del p-Nitrofenol, determinado fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de fosfatasa alcalina en la muestra.

VALORES DE REFERENCIA

Suero, plasma: 45 - 120 U/L

Pruebas moleculares

PCR

PCR son las siglas en inglés de Polymerase chain reaction o Reacción en cadena de la polimerasa. La idea básica de la técnica es sintetizar muchas veces un fragmento de ADN utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive a altas temperaturas (79 °C a 85 °C).

Para la síntesis son necesarios *Taq* polimerasa, dinucleótidos (dNTPs), ADN molde, agua, oligonucleótidos (llamados también primers, iniciadores, cebadores, “oligos”, etc.) y las condiciones para que la enzima trabaje adecuadamente (cierto pH, determinadas cantidades de MgCl₂, KCl). La reacción se coloca en un termociclador a diferentes temperaturas que se repiten, llamados ciclos de reacción; la primera es la desnaturalización a 95 °C, durante la cual las dobles cadenas del ADN se abren o desnaturalizan, quedando en forma de cadenas sencillas. Después el termociclador ajusta la temperatura en un intervalo entre 40 °C y 60 °C (llamada de alineamiento), a esta temperatura se forman y se rompen constantemente los puentes de hidrógeno entre los oligonucleótidos y el ADN, formando uniones complementarias haciendo una pequeña región de doble cadena. La polimerasa se une a este pequeño pedazo de ADN de doble cadena y comienza a sintetizar la cadena en sentido 5' a 3'.

La extensión se lleva a cabo a 72 °C, temperatura a la cual la polimerasa alcanza su máxima actividad, y continúa la síntesis de los fragmentos de ADN a partir de los oligonucleótidos que ya se habían alineado. Los ciclos se repiten consecutivamente, de tal forma que las copias de los fragmentos de ADN aumentarán con cada ciclo. Antes y después de estos ciclos se programan dos pasos, uno de 95 °C durante algunos segundos (aproximadamente 30 seg) para iniciar con desnaturalización, y al final de los ciclos, un paso último de extensión a 72°C para permitir que la *Taq* termine de sintetizar todos los fragmentos que pueden haber quedado incompletos.⁴²

Se realizaron dos protocolos diferentes para esta técnica, tomando en cuenta la temperatura de alineamiento de los primers para cada gen estudiado, y las características óptimas para generar los fragmentos deseados.

Las condiciones específicas requeridas para el gen HNF-4 α fueron:

1. 95°C/3 min
2. 95°C/30 seg
3. 68°C/30 seg
4. 72°C/30 seg
5. 72°C/ 10 min

Las condiciones específicas requeridas para el gen Pax-4 fueron:

1. 95°C/3 min
2. 95°C/30 seg
3. 58°C/30 seg
4. 72°C/30 seg
5. 72°C/ 10 min

RFLP

“Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción” del término RFLP del inglés (Restriction fragment length polymorphism) se refiere a secuencias específicas de nucleótidos en el ADN que son reconocidas y cortadas por las enzimas de restricción (también llamadas endonucleasas) y que varían entre individuos. Si dos individuos difieren en la distancia entre los sitios de escisión de las endonucleasas, estos se observan al correr las muestras en un gel de electroforesis. Las enzimas de restricción escinden moléculas de ADN en nucleótidos específicos, dependiendo de la enzima particular usada. Los sitios de reconocimiento de estas enzimas son generalmente 4 a 6 pares de bases de longitud. Generalmente, cuanto más corta la secuencia de reconocimiento, mayor es el número de fragmentos generados

Los fragmentos de restricción tienen carga negativa y pueden ser separados por una técnica llamada electroforesis en gel, que separa los fragmentos de ADN con base en su tamaño. Las muestras de ADN que han sido tratadas con enzimas de restricción se colocan en el gel de agarosa a través del cual se hace pasar un campo eléctrico. Los fragmentos migran hacia el electrodo positivo, los más pequeños migran más rápido que los más grandes, separando así las muestras de ADN en bandas distintas.⁴³

Las enzimas de restricción utilizadas fueron la *SfuI* y *Hsp92II*, respectivamente para los genes *HNF-4 α* y *Pax-4*. *SfuI* reconoce la secuencia TT/CGAA y genera fragmentos terminales 5'. Esta enzima es estable en un rango de temperatura de -15 °C a -25 °C, y una vez activada se deja incubando a 37 °C en un buffer a pH 7.5 que contenga 500 mM de Tris, 1 M de NaCl, 100 mM de MgCl₂, 10 mM de ditioeritriol (DTT) durante 24 horas.⁵⁷

La temperatura de incubación para la endonucleasa *Hsp92II* también es de 37 °C, 24 horas, utilizando un buffer de incubación a pH 7.3, que contiene 10 mM de Tris-HCl, 300 mM de KCl, 0.1 mM de EDTA, 1 mM de DTT, 0.5 mg/mL BSA y 50% glicerol. La secuencia específica de reconocimiento es CATG. Esta enzima proviene del microorganismo *Haemophilus species 92*.⁵⁸

Los protocolos para la técnica de RFLP se realizaron de acuerdo a las características óptimas de cada variante polimórfica. (ANEXO 3)

Análisis estadístico

Las pruebas estadísticas fueron realizadas mediante el uso del paquete estadístico SPSS (*Statistical package for the social sciences*) versión 13.0 para Windows. Considerándose una significancia mínima preestablecida de $p \leq 0.05$ con un intervalo de confianza de 95% para cada una de las mediciones que se han considerado en esta investigación.

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 o alelo mayor, lo que en nomenclatura genética suele nombrarse como “C”. El alelo menor es el menos frecuente y es el considerado la variante “T”. Sin embargo, esto puede diferir de una población a otra, dependiendo de las frecuencias de estos alelos.¹⁹

Para evaluar la asociación de un polimorfismo con la enfermedad se construye una tabla de contingencia y se contrasta con la hipótesis de asociación mediante una prueba de χ^2 . También se puede calcular la *Odds ratio (OR)* de cada genotipo, que es una medida estadística usada en estudios epidemiológicos que se define como la posibilidad de que una condición de salud o enfermedad se presente en un grupo de población frente al riesgo que se presente en otro.

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:

$$\text{Log [p / (1-p)]} = \alpha + \beta \mathbf{G} + \gamma \mathbf{Z}$$

Donde α , β y γ son parámetros estimados; **p** es la probabilidad de ser caso; **G** es el polimorfismo (que codifica para diferentes genotipos CC, CT y TT) y **Z** es una o más variables por las cuales se desea ajustar el modelo.

Ya que el polimorfismo G es un SNP en el que el alelo variante T modifica el riesgo de la enfermedad de interés y que cada individuo posee una pareja de alelos, el riesgo asociado con cada genotipo puede depender del número de copias de T, lo que permite definir varios modelos de herencia posibles cuya verosimilitud se puede explorar mediante una adecuada codificación de los genotipos, como se muestra en la figura 15.¹⁹

	Codominante		Dominante	Recesivo	Aditivo
Genotipo ^a	He	Va	Do	Re	Ad
TT	0	0	0	0	0
TC	1	0	1	0	1
CC	0	1	1	1	2

^aGenotipos posibles para un polimorfismo en un locus bialélico T > C

Fig 15. Codificación de variables indicadoras para evaluar diferentes modelos de herencia. Tomado de *Análisis estadístico de polimorfismo genéticos en estudios epidemiológicos*. 2005.

En este estudio se analizaron los datos bajo el modelo dominante que supone que una única copia de T es suficiente para modificar el riesgo y que ser portador de 2 copias lo modifica en igual magnitud; es decir, heterocigotos TC y homocigotos TT tienen el mismo riesgo.

VI. RESULTADOS

La muestra total de la población Maya de Quintana Roo fue de 255 individuos, acudieron a la toma de muestra más personas del género femenino (n=240) que del masculino (n=15).

Resultados antropométricos y bioquímicos

En la tabla 2 se muestran las características generales de la población seleccionada en la región de Sabán, divididos por género; los datos son la media \pm desviación estándar.

TABLA 2. Características generales de la población Maya estudiada

	MASCULINO	FEMENINO
	MEDIA \pm D.E	MEDIA \pm D.E
EDAD	43.60 \pm 11.65	40.57 \pm 14.81
PESO (Kg)	61.21 \pm 10.78	61.24 \pm 10.80
TALLA (cm)	1.51 \pm 0.09	1.43 \pm 0.07
ICC	0.91 \pm 0.07	0.93 \pm .10
IMC (kg/m ²)	29.89 \pm 5.17	30.05 \pm 6.25
GLUCOSA (mg/dL)	92.47 \pm 9.79	111.25 \pm 57.31
TRIGLICÉRIDOS (mg/dL)	208.73 \pm 125.46	199.94 \pm 106.76
COLESTEROL (mg/dL)	156.67 \pm 27.60	175.58 \pm 40.25
HDL (mg/dL)	40.27 \pm 8.07	37.60 \pm 10.00
LDL (mg/dL)	107.93 \pm 27.79	112.50 \pm 31.96
INSULINA (U/L)	35.81 \pm 39.47	35.52 \pm 34.66
UREA (mg/dL)	19.67 \pm 6.10	20.19 \pm 5.69
CREATININA (mg/dL)	0.91 \pm 0.15	0.91 \pm 0.12
ÁCIDO ÚRICO (mg/dL)	4.08 \pm 0.76	4.35 \pm 0.90
TGP (U/L)	0.91 \pm 0.15	30.26 \pm 16.34
TGO (U/L)	27.67 \pm 11.41	30.43 \pm 12.17
FOSFATASA ALCALINA (U/L)	118.73 \pm 40.19	119.74 \pm 46.45

Los datos son la media \pm desviación estándar IMC índice de masa corporal, ICC índice cintura cadera, HDL colesterol de alta densidad, LDL colesterol de baja densidad, TGO transaminasa glutámico oxalacética, TGP transaminasa glutámico pirúvica

La OMS clasifica el Índice de Masa Corporal (IMC), dando las siguientes pautas:

>8.5 Bajo peso

18.5 a 25 Peso Normal

25 a 30 Sobrepeso

30 a 35 Obesidad I

35 a 40 Obesidad II

>40 Obesidad III

Tomando en cuenta estos criterios, 0.8% de los individuos presentaron bajo peso al momento del estudio, el 13.7% de los individuos cursó con peso normal, el 42.0% presentó sobrepeso, el 25.1% se encuentra entre los límites de obesidad tipo I, 13.3% cursan con obesidad tipo II y 3.9% presentaron un cuadro de obesidad mórbida u obesidad tipo III.

De igual manera, para el Índice Cintura Cadera (ICC), la OMS clasifica en base a los siguientes criterios:

Normal para mujeres < 0.85

Normal para hombres < 1.00

De acuerdo a estos criterios el género femenino presentó en el ICC una media de 0.94 ± 0.10 . El 94.0% de las mujeres presentaron un aumento en este parámetro. El 86.7% del género masculino, sobrepasa lo especificado por la OMS.

El 15.7% de los indígenas presento más de 126 mg/dL de glucosa llegando a valores de hasta 595 mg/dL en un individuo. El 73.7% de esta población muestra un incremento en el colesterol total. En las fracciones lipoprotéicas, el 67.1% presenta niveles de HDLc disminuidos y el 61.2% más de 100 mg/dL de LDLc. Los triglicéridos que constituyen un importante elemento del perfil lipídico en una revisión médica periódica, presentaron un incremento del 62.0% de la población general.

También, el 54.5% de los indígenas presentan una elevación en la concentración de insulina. La insulinemia basal ofrece información acerca de la sensibilidad y la resistencia de la insulina.

Los perfiles bioquímicos como la urea, creatinina, ácido úrico, TGP, TGO y fosfatasa alcalina permiten tener una perspectiva más amplia acerca de la salud en general de la población, así, tomamos en cuenta que tres personas

presentaron niveles anormales de creatinina y una persona se encuentra fuera de los valores de referencia al medir la urea al momento del estudio.

En lo referente a las enzimas localizadas en el hígado, el 25.9% muestra niveles elevados de TGP, el 28.6% niveles elevados de TGO y el 39.6% un incremento en la fosfatasa alcalina.

En la tabla 3 la población fue dividida según los parámetros de la OMS para el IMC, según esta clasificación se muestra un promedio de los valores de los datos bioquímicos medidos en esta investigación. Es importante notar que aún en los individuos clasificados en normopeso, los valores bioquímicos que son considerados fuera de los límites de referencia de las HDL, LDL y la insulina son altos, incluso parecidos a los de las personas consideradas con sobrepeso y obesidad, lo que indica un grave problema de salud.

Para las concentraciones de glucosa, aumentan conforme el IMC de las personas analizadas, llegando a niveles referidos a alteraciones de glucosa en aquellas personas con obesidad mórbida.

Estudio de asociación

Para realizar estudio de asociación se dividió a la población indígena Maya en dos grupos, el grupo “diabéticos” que agrupó a los individuos con valores de glucemia iguales o mayores a 126 mg/dL y el “grupo control” con concentraciones de glucosa sanguínea menores que 126 mg/dL, es decir, que no padecen diabetes.

En la tabla 4 se muestran las características generales y los datos bioquímicos realizados a la población de Sabán, de los grupos diabéticos y grupo control.

TABLA 3. Características generales de la población Maya, divididos según la clasificación de IMC establecida por la OMS.

Clasificación de IMC según la OMS	Porcentaje de individuos (%) divididos según IMC		ICC Mujeres < 0.85 Hombres < 1.00		Glucosa 70-100 mg/dL	Colesterol < 200 mg/dL	Triglicéridos < 150 mg/dL	HDL 40-60 mg/dL	LDL < 100 mg/dL	Insulina 2-20 U/L	Urea 15-40 mg/dL	TGP 5-36 U/L	TGO 5-34 U/L	Fosfatasa alcalina 45-120 U/L	Creatinina Hombres: 0.70-1.20 mg/dL Mujeres: 0.50-0.90 mg/dL		Ác. Úrico Hombres: 3.5-7.2 mg/dL Mujeres: 2.6-6.0 mg/dL	
	M	F	M	F	M/F	M/F	M/F	M/F	M/F	M/F	M/F	M/F	M/F	M/F	M	F	M	F
Bajo peso < 18.5 Kg/m²	6.7	0.4	0.8	0.8	88	150	57	44	71	9.9	12	19.5	27	105.5	1.1	0.8	3.4	3.7
Normopeso 18.5 a 25.0 Kg/m²	20	13.3	0.9	0.8	99	167	199	38	100	33.2	20	27.7	30.3	119.1	1.0	0.8	4.0	4.3
Sobrepeso 25.0 a 30 Kg/m².0	66.7	40.4	1.0	0.9	110	174	199	36	112	35.3	20	28.7	28.6	119.5	1.0	0.9	4.4	4.3
Obesidad I 30.0 a 35.0 Kg/m²	6.7	26.2	1.0	0.9	150	173	200	38	113	35.5	20	30.8	30.1	119.9	1.2	0.9	4.6	4.3
Obesidad II 35.0 a 40.0 Kg/m²	0	14.7	--	0.9	168	182	215	40	121	35.2	20	33.7	32.7	119.5	--	0.9	--	4.3
Obesidad III ≥ 40.0 Kg/m²	0	4.2	--	0.9	181	200	225	38	128	35.6	20	34.9	33.8	125.9	--	0.9	--	4.3

M masculino, F femenino IMC índice de masa corporal, ICC índice cintura cadera, HDL colesterol de alta densidad, LDL colesterol de baja densidad, TGO transaminasa glutámico oxalacética, TGP transaminasa glutámico pirúvica

TABLA 4. Características generales de los grupos de estudio.

	INDIVIDUOS CON DIABETES TIPO 2	GRUPO CONTROL	P	VALORES DE REFERENCIA
N	40	215		
Edad (años)	48.6 ± 16.8	39.3 ± 13.7		>45 años
IMC (Kg/m ²)	31.6 ± 8.5	29.8 ± 5.6	0.083	Sobrepeso: 25.5-30 Obesidad > 30
ICC	Hombres: 0.98 ± 0.01 Mujeres: 0.95 ± 0.1	Hombres: 0.95 ± 0.05 Mujeres: 0.93 ± 0.01	0.138 0.055	Mujeres < 0.84 Hombres < 0.93
GLUCOSA (mg/dL)	196.9 ± 58.8	94.0 ± 12.0	7.82 x 10⁻³⁵	70-100 mg/dL
COLESTEROL (mg/dL)	169.6 ± 41.3	175.4 ± 39.6	0.401	< 200 mg/dL
TRIGLICERIDOS (mg/dL)	258.4 ± 135.7	189.7 ± 98.3	1.79 x 10⁻⁴	< 150 mg/dL
HDL (mg/dL)	36.7 ± 8.1	38.0 ± 10.2	0.476	40-60 mg/dL
LDL (mg/dL)	107.2 ± 34.6	113.2 ± 31.1	0.277	< 100 mg/dL
INSULINA (U/L)	39.1 ± 40.4	34.9 ± 33.8	0.491	2-20 U/L
UREA (mg/dL)	20.9 ± 5.9	20.0 ± 5.7	0.354	15-40 mg/dL
CREATININA (mg/dL)	Hombres: 1.1 ± 0.1 Mujeres: 0.96 ± 0.1	Hombres: 1.1 ± 0.2 Mujeres: 0.89 ± 0.1	0.905 6 x 10⁻⁴	Hombres: 0.70-1.20 mg/dL Mujeres: 0.50-0.90 mg/dL
ÁCIDO ÚRICO (mg/dL)	Hombres: 4.4 ± 0.4 Mujeres: 4.3 ± 0.8	Hombres: 5.5 ± 1.2 Mujeres: 3.9 ± 0.8	0.315 0.027	Hombres: 3.5-7.2 mg/dL Mujeres: 2.6-6.0 mg/dL
TGP (U/L)	29.2 ± 15.3	30.2 ± 16.7	0.717	5-36 U/L
TGO (U/L)	29.3 ± 12.7	30.4 ± 12.0	0.574	5-34 U/L
FOSFATASA ALCALINA (U/L)	113.2 ± 51.3	120.8 ± 45.1	0.360	45-120U/L

Los datos son la media ± desviación estándar

IMC índice de masa corporal, ICC índice cintura cadera, HDL colesterol de alta densidad, LDL colesterol de baja densidad, TGO transaminasa glutámico oxalacética, TGP transaminasa glutámico pirúvica

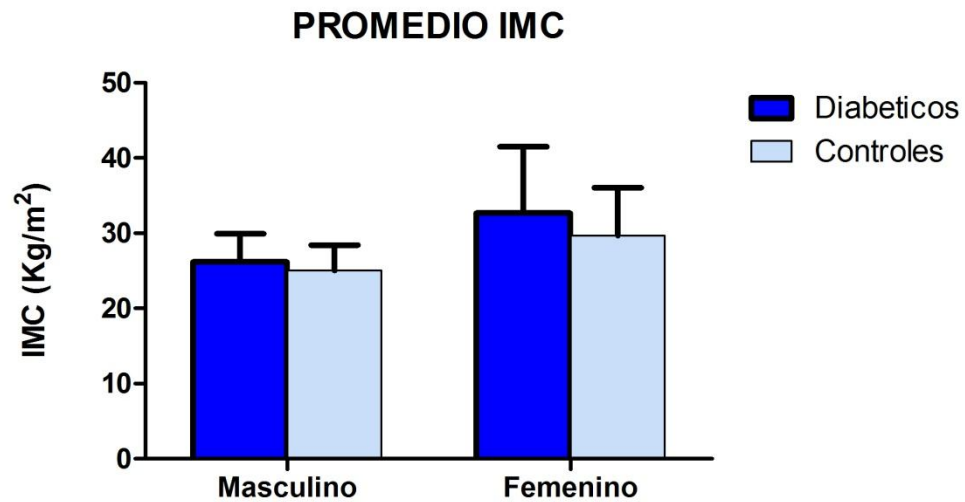
P=indica la significancia general del análisis de prueba *t* de student. Se marcan en negritas los valores significativamente diferentes.

Es claro que existe una diferencia significativa en los niveles séricos de glucosa para estos grupos. Sin embargo, también se muestra una diferencia entre los niveles de triglicéridos en la población en general y en creatinina y ácido úrico en las mujeres del estudio, en donde el grupo de individuos con DT2, presenta un incremento en estos parámetros.

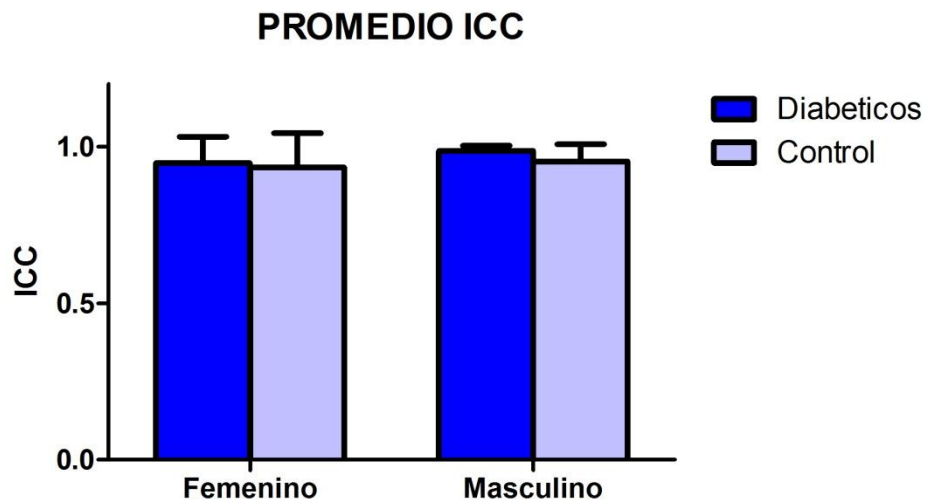
En la figura 16 se muestran los valores del ICC e IMC de los grupos diabéticos y control, agrupándolos por género. Aunque existe una tendencia a incrementarse en los individuos diabéticos no se encontró una diferencia significativa.

Fig 16. A. Promedio del IMC de los grupos de estudio, divididos por género.
B. ICC de los grupos de estudio, divididos por género.

A)



B)



Resultados moleculares

Las siguientes fotografías muestran la verificación de la talla del amplicón (Fig.14) y los RFLP's (Fig.15) realizadas a las muestras de estudio de los genes propuestos.

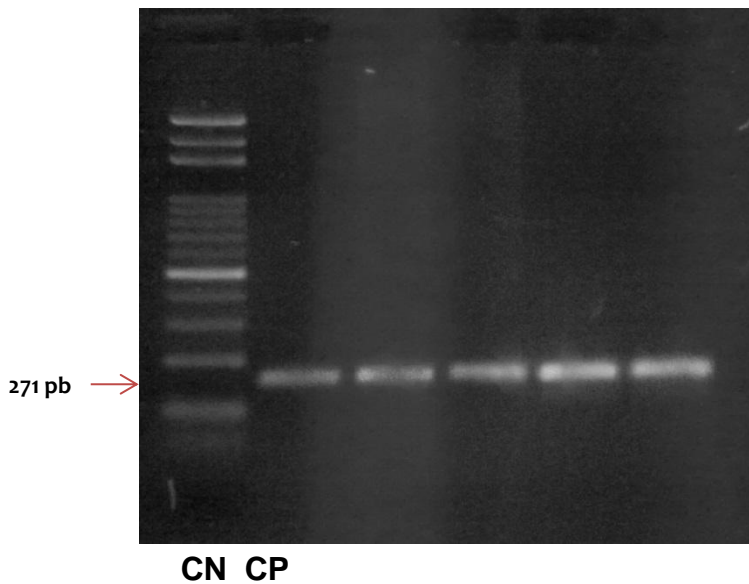


Fig 17. Fotografía de un gel de agarosa al 3% en TBE 1x teñido con bromuro de etidio. Voltaje: 80 V. Tiempo de corrimiento: 45 minutos. Marcador molecular: 100 pares de bases (pb). Exón 4 gen HNF-4 α (271 pb)

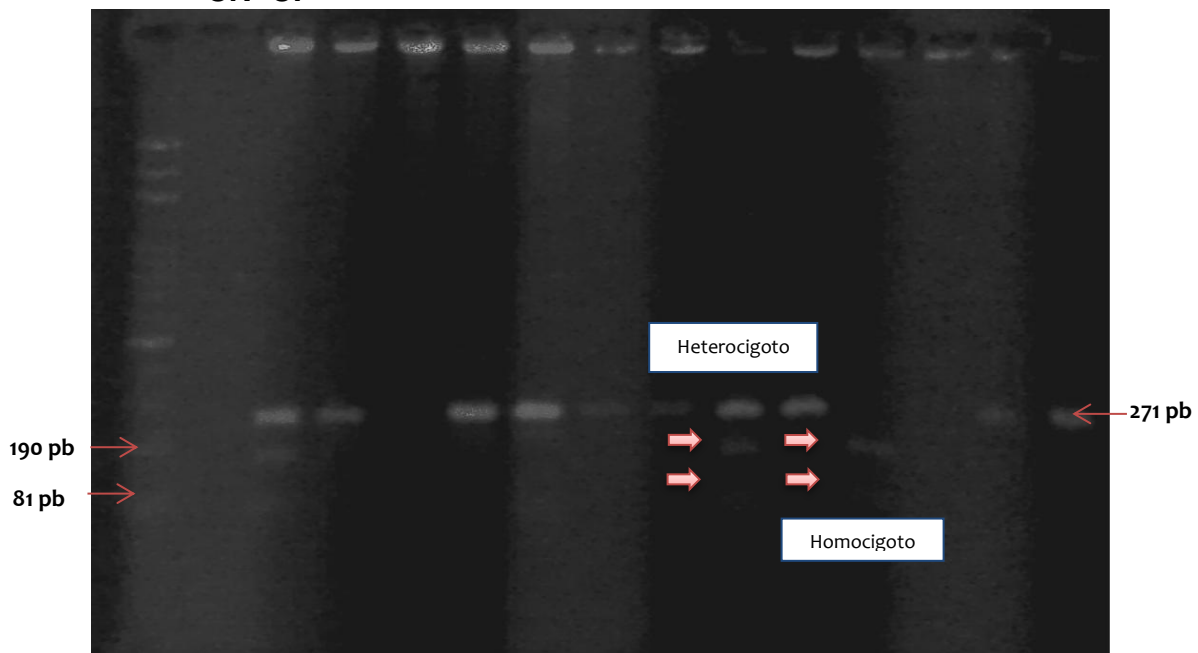


Fig 18. Foto de gel de agarosa al 3% utilizando bromuro de etidio como colorante, mostrando cortes realizados con la enzima de restricción *SfuI* específica para el SNP T130I del gen HNF-4 α . CN (control negativo) y CP (control positivo).

En los individuos heterocigotos se observan 3 bandas: una de 81pb, otra de 190 pb, y el amplicón no digerido (sin mutación) de una talla de 271pb. Los individuos homocigotos los alelos presentan fragmentos correspondientes al corte con la endonucleasa *Sful* (81 y 190 pb) (fig. 15).

Para comprobar la talla del amplicón del exón 3 del gen Pax-4 se realizó un PCR (Fig 17).

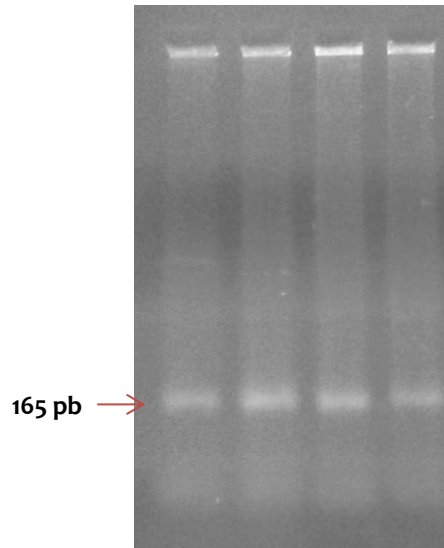


Fig 19. Fotografía de un gel de agarosa al 3% en TBE 1x teñido con bromuro de etidio. Voltaje: 80 V. Tiempo de corrimiento: 45 minutos. Exón 3 gen Pax 4 (165 pb)

Para la variante polimórfica R133W del gen Pax 4; en los individuos heterocigotos se observan 3 bandas: una de 109 pb, otra de 56 pb, y el amplicón no digerido (sin mutación) de una talla de 165 pb. En los individuos homocigotos los alelos presentan fragmentos correspondientes al corte con la endonucleasa *Hsp92II* (109 y 56 pb) (Fig 18).

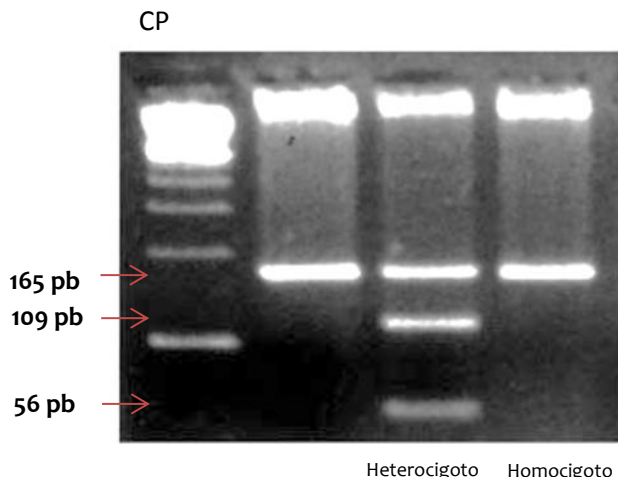


Fig 20. Fotografía de un gel de agarosa al 3% en TBE 1x teñido con bromuro de etidio. Mostrando cortes realizados con la enzima de restricción *Hsp92II* específica para el SNP R133W del gen Pax-4.

Tabla 5. Frecuencia genotípica y alélica de rs1800961 y rs148207752 en HNF-4 α y Pax-4 en una población adulta indígena Maya del estado de Quintana Roo.

Gen	Variante	SNP rs ID	Mayor/ Menor alelo	Frecuencia en Diabéticos		Frecuencia en Grupo Control		OR [95% CI]	P
				Genotípica (%)	Alélica (%)	Genotípica (%)	Alélica (%)		
HNF-4 α	T130I	rs1800961	C/T	CC (80.0)	C (88.7)	CC (83.7)	C (91.4)	0.78 [0.33-1.83]	0.565
				CT (17.5)	T (11.3)	CT (15.3)	T (8.6)		
				TT (2.5)	TT (0.9)	TT (0.9)	TT (0.9)		
Pax-4	R133W	rs2233578	C/T	CC (97.5)	C (98.7)	CC (99.1)	C (99.5)	2.73 [0.24- 30.85]	0.399
				CT (2.5)	T (0.3)	CT (0.9)	T (0.5)		
				TT (0)	TT (0)	TT (0)	TT (0)		

CC: Homocigoto Silvestre

CT: Heterocigoto

TT: Homocigoto Mutado

P=indica la significancia general del análisis de prueba < 0.05

En la tabla 5 se muestran los resultados de asociación de las dos variantes estudiadas, realizadas bajo el modelo dominante. Según el análisis de regresión logística, no se encontró asociación entre las variantes de riesgo de HNF-4 α y Pax-4 y con diabetes mellitus tipo 2 en esta población.

Se realizó un análisis multivariado entre los datos bioquímicos y los parámetros antropométricos con las variantes de los genes estudiados para observar si existe alguna asociación entre ellos. Los resultados se muestran en la tabla 6.

TABLA 6. Características bioquímicas de acuerdo al genotipo de los SNP's rs1800961 y rs148207752 en población adulta indígena Maya

SNP/Gen	Genotipo	IMC (Kg/m ²)	ICC	GLUCOSA (mg/dL)	COLESTEROL (mg/dL)	TRIGLICÉIDOS (mg/dL)	CREATININA (mg/dL)	INSULINA (U/L)
rs1800961	CT/TT	31.5±7.7	0.91±0.1	101.5±20.8	197.5±43.1	203.4±114.1	0.88±0.1	47.4±46.2
HNF-4a	CC	29.8±5.8	0.94±0.1	111.9±60.4	169.8±37.5	199.8±106.6	0.9±0.1	33.2±31.8
P		0.182	0.078	0.394	2.42x10⁻⁵	0.876	0.037	0.018
rs2233578	CT/TT	24.4±2.3	0.94±0.06	154.0±120.4	177.3±8.3	197.3±104.3	0.87±0.06	48.0±21.3
Pax 4	CC	30.1±6.2	0.94±0.1	109.6±54.9	174.4±40.1	200.5±107.9	0.92±0.1	35.4±35.0
P		0.085	0.871	0.229	0.901	0.929	0.524	0.613

SNP/Gen	Genotipo	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)	UREA (mg/dL)	ÁCIDO ÚRICO (mg/dL)	TGP (U/L)	TGO (U/L)	FOSFATASA ALCALINA (U/L)
rs1800961	CT/TT	38.0±11.3	123.0±35.7	19.3±4.8	4.4±0.9	32.8±20.4	30.49±11.9	124.8±40.9
HNF-4a	CC	37.7±9.6	110.0±30.4	20.3±5.8	4.3±0.9	29.5±15.6	30.2±12.2	118.7±46.9
P		0.948	0.014	0.390	0.716	0.295	0.821	0.327
Rs2233578	CT/TT	48.0±10.6	77.3±11.9	21.3±2.5	3.7±0.8	41.3±22.0	51.7±30.7	178.0±151.6
Pax 4	CC	37.6±9.8	112.6±31.6	20.1±5.7	4.3±0.9	29.9±16.4	30.0±11.6	119.0±43.7
P		0.077	0.055	0.568	0.213	0.247	0.013	0.247

Los datos son la media \pm desviación estándar. *P*=indica la significancia general del análisis de prueba ANCOVA < 0.05

En negritas se muestran los valores que presentan una diferencia significativa

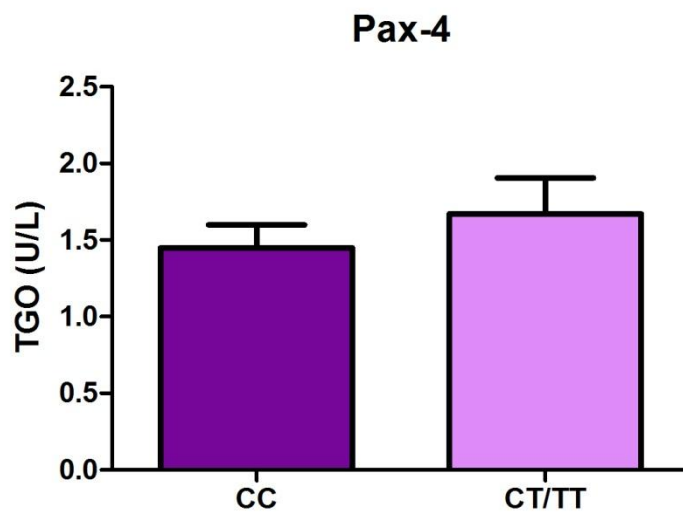
Para la variante T130I del gen HNF-4 α , se observa una diferencia significativa entre los parámetros colesterol, LDLc e insulina, siendo mayor en los individuos que presentaron la variante polimórfica. Para el caso de la creatinina, los niveles fueron más altos en aquellos que no presentaron la variante.

Para el gen Pax4 los individuos que presentaron la variante R133W mostraron niveles elevados de la enzima TGO. Se muestra una tendencia a presentar una diferencia significativa en aquellos individuos que tienen altos los niveles de LDLc, en las personas que no presentaron la variante (Tabla 6).

Al realizar un análisis de covarianza donde la edad, el género, el ICC y el IMC se incluyeron como covariables y el genotipo se estableció como un factor fijo, de las significancias observadas en negritas en la tabla 6 sólo las concentraciones de colesterol para el gen HNF-4 α y la transaminasa glutámico oxalacética para Pax-4 mantuvieron la significancia de $p>0.05$.

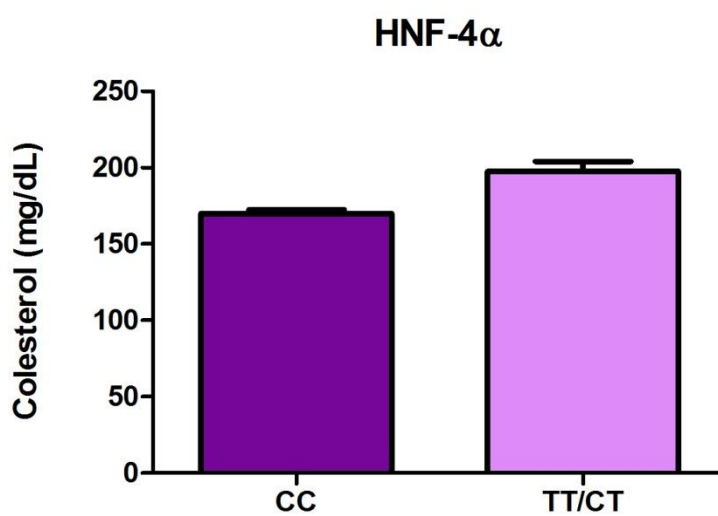
Existe un aumento en los niveles de la enzima TGO/AST en los individuos que presentaron la variante polimórfica R133W del gen Pax-4, como se puede observar en la figura 21.

Fig 21. Comparación de los niveles de TGO/AST alterados entre la población estudiada y genotipo de la variante polimórfica R133W del gen Pax-4.



En la figura 22 se muestra que existe un incremento en los niveles de colesterol en la población de Sabán que presentaron las variante polimórfica T130I.

Fig 22. Comparación de los niveles de Colesterol alterados entre la población estudiada y genotipo de la variante polimórfica T130I del gen HNF-4 α .



Grupo control

Debido a que la diabetes es una enfermedad multifactorial, el medio ambiente y el estilo de vida de las comunidades son factores que podrían ser desencadenantes al desarrollo de ésta, se realizó una comparación entre individuos sin DM2 del municipio de Sabán y del grupo de mestizos de la Ciudad de México.

En la tabla 7 se muestran los parámetros bioquímicos y antropométricos de los grupos control del Estado de Quintana Roo y del Hospital Juárez de México, en el Distrito Federal.

TABLA 7. Características generales de los grupos control.

	MESTIZOS MEXICANOS DEL DISTRITO FEDERAL	MAYAS DE LA REGIÓN DE SABÁN EN QUINTANA ROO	P	VALORES DE REFERENCIA
N	20	215		
Edad (años)	60.1 ± 8.1	39.3 ± 13.7		>45 años
IMC (Kg/m ²)	29.8 ± 5.6	26.3 ± 4.4	0.030	Sobrepeso: 25.5-30 Obesidad > 30
ICC	Mujeres: 0.91 ± 0.1 Hombres: 0.97 ± 0.05	Mujeres: 0.90 ± 0.1 Hombres: 0.95 ± 0.1	Mujeres: 0.932 Hombres: 0.973	Mujeres < 0.84 Hombres < 0.93
GLUCOSA (mg/dL)	92.8 ± 8.4	94.0 ± 12.0	0.662	70-100 mg/dL
COLESTEROL (mg/dL)	189.0 ± 27.5	175.4 ± 39.6	0.134	< 200 mg/dL
HDL (mg/dL)	38.0 ± 10.2	46.5 ± 8.1	3.24x10⁻⁴	40-60 mg/dL
LDL (mg/dL)	120.1 ± 31.9	113.2 ± 31.1	0.344	< 100 mg/dL

Los datos son la media \pm desviación estándar. P=indica la significancia general del análisis de prueba ANCOVA < 0.05

En negritas se muestran los valores que presentan una diferencia significativa

Se observa una diferencia significativa en los valores de IMC, mostrando una elevación de estos entre el grupo control de los mestizos mexicanos del Distrito Federal. Y una elevación en los valores de HDL en los Mayas de la región de Sabán, lo que indica un cambio en la alimentación de las poblaciones.

Las muestras de los mestizos mexicanos del Distrito Federal también se sometieron al análisis molecular PCR-RFLP dirigido a encontrar las variantes polimórficas T130I y R133W de los genes HNF-4 α y Pax-4 respectivamente, las cuales no presentaron (Fig. 23 y 24).

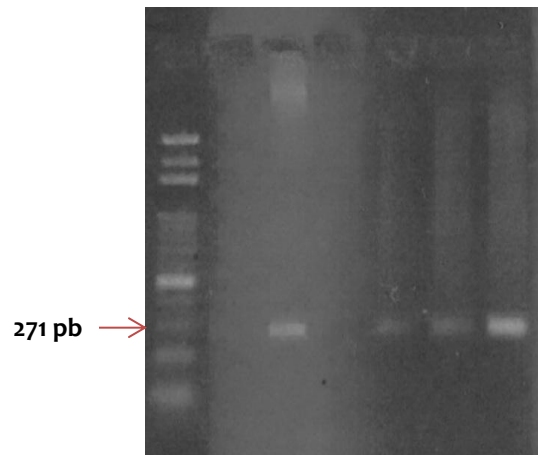


Fig 23. Fotografía de un gel de agarosa al 3% en TBE 1x teñido con bromuro de etidio. Marcador molecular: 100 pares de bases (pb). Exón 4 del gen HNF-4 α (271pb).

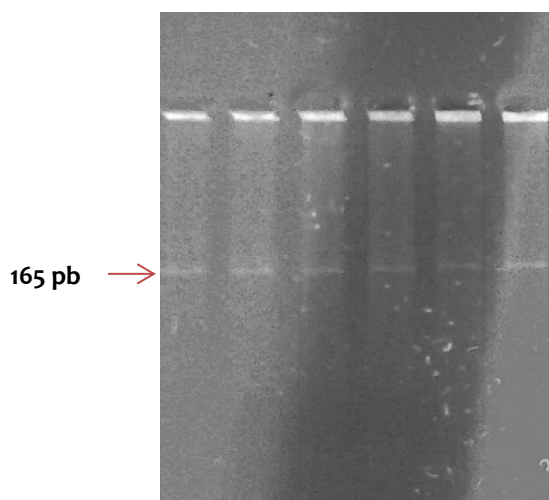


Fig 24. Fotografía de un gel de agarosa al 3% en TBE 1x teñido con bromuro de etidio. Voltaje: 80V. Tiempo de corrimiento. 45 minutos. Exón 3 gen Pax 4 (165 pb).

VII. DISCUSIÓN

En los últimos años, la diabetes se ha situado, junto con las enfermedades cardiovasculares, entre las primeras causas de muerte en México. En la actualidad, el número de diabéticos aumenta en forma alarmante, no sólo entre personas mayores a 65 años, sino entre niños y adultos jóvenes.⁴⁴ Ante la importancia de esta enfermedad se han realizado diferentes estudios encaminados a evaluar algunos de los factores que pueden contribuir a una mayor susceptibilidad a padecer diabetes. Uno de ellos, son los estudios de asociación genética, pues buscan establecer la relación estadística entre variables genéticas poblacionales y un fenotipo determinado (ejemplo: rasgo, riesgo de enfermedad, etc.). Estos están siendo utilizados para descubrir el componente genético que subyace a las enfermedades comunes de alta prevalencia como la DT2, la enfermedad coronaria o la insuficiencia cardíaca.²⁰

Se sabe que al comparar el genoma de cualquier ser humano, se tiene solo una diferencia del 0.1%, que aunque parezca pequeña, esta cifra representa las características étnicas y poblacionales que nos hacen diferentes; estas variaciones se hacen visibles también al comprobar que algunas poblaciones de algunas regiones sean más susceptibles a ciertas enfermedades.

Al igual que otras poblaciones latinas, los mestizos mexicanos constituyen una población mestiza de reciente formación; conformada principalmente por orígenes ancestrales amerindio (51.2%), europeo (42.9%) y en menor proporción africano (5.9%).⁵⁹ El proceso del mestizaje en regiones geográficamente distantes se han visto afectado por diferentes condiciones demográficas e históricas que ha generado una heterogeneidad genética entre y al interior de las diferentes regiones en todo México.⁵⁹ Los alelos privados de los mestizos mexicanos tienen un origen amerindio y constituyen una representación conservadora de la variación genética que está ausente en otros grupos continentales.⁶³

El evaluar en la población indígena mexicana algunos genes que han sido identificados como posibles factores de riesgo para padecer DT2 en otras poblaciones se contribuye un poco a conocer en forma integral la variabilidad genética común y describir mejor la estructura genómica de los mexicanos.

La muestra total de la población Maya de Quintana Roo estudiada fue de 255 individuos, con una mayor participación del género femenino (n=240) contra solo 15 del género masculino. Aunque en general se tiene una ligera prevalencia de diabetes en las mujeres, la búsqueda por asistencia médica de forma sistemática y continúa por las mujeres ha sido sugerida como uno de los factores responsables por la predominancia del género femenino en los servicios de salud; por lo tanto, están más atentas a la sintomatología y buscan ayuda tempranamente.

La población seleccionada muestra el fenotipo característico de un individuo indígena, ya que los Mayas representan un grupo étnico distante de otros grupos amerindios con marcadas diferencias culturales, sociales e históricas. Según un estudio realizado por el INMEGEN para el proyecto HapMap mexicano, los mestizos de Yucatán constituyen el único grupo de la muestra estudiada cuya contribución amerindia es principalmente Maya.⁵⁹

Las características generales de la población en estudio muestran un peso promedio de 61.24 ± 10.80 Kg y una talla de 1.43 ± 0.07 cm. El sobrepeso y la obesidad son definidos como un índice de masa corporal (IMC) mayor a 25.5 y 30 respectivamente, y mayor a 40 para la llamada obesidad mórbida, un Índice Cintura Cadera (ICC) mayor de 0.84 para mujeres y 0.93 en hombres, dado que se correlaciona con el acúmulo de grasa en órganos no grasos como corazón, hígado, músculo, riñón y páncreas, situación que conlleva a un proceso de resistencia a la insulina con hiperinsulinemia compensatoria que finalmente se manifiesta con glicemias mayores a 130 mg/dl.⁴⁷ De la población en estudio, solo el 13.7% presentó peso normal al momento del estudio, el porcentaje restante que se divide en 42.0% con sobrepeso, el 25.1% se encuentra entre los límites de obesidad tipo I, 13.3% cursan con obesidad tipo II y 3.9% presentaron un cuadro de obesidad mórbida u obesidad tipo III, lo que indica una grave falta de atención a la dieta y a la falta de actividad física por parte de la población en general. De acuerdo con los puntos de corte de IMC (kg/m^2) propuestos por la OMS, la prevalencia de sobrepeso en México es de 38.8% y de obesidad es de 32.4%,⁴ siendo los de la población de Sabán, mayores a los estimados por la ENSANUT 2012. La obesidad y el sobrepeso son el principal problema de Salud Pública en México, pues nuestro país es el primer lugar mundial en niños y adultos con

obesidad y sobrepeso. México gasta 7% del presupuesto destinado a salud para atender la obesidad, sólo debajo de Estados Unidos que invierte el 9%. La mala alimentación, el sedentarismo, la falta de acceso a alimentos nutritivos, son factores determinantes del sobrepeso y la obesidad.⁴⁸ Este es el principal factor de riesgo modificable para el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles, como la diabetes mellitus y las enfermedades cardiovasculares. En la tabla 3, se presenta a la población dividida según la clasificación de la OMS para el IMC, mostrando los valores bioquímicos de cada grupo. Es importante mencionar que los parámetros como colesterol, triglicéridos, urea, HDL y LDL, presentan valores mayores a los límites de referencia, incluso en los individuos catalogados con peso normal, mostrando una similitud con aquellos con sobrepeso y obesidad.

Como parte del estudio de asociación se dividió a la población en dos grupos, el grupo diabéticos que presentaba al momento del estudio, valores de glucemia mayores o iguales a 126 mg/dL y el grupo control cuyos niveles de glucosa sanguínea eran menores que 126 mg/dL, es decir, que no padecen diabetes. Como se muestra en la figura 16, los diabéticos no solamente tienen un mayor peso, sino que presentaron un mayor índice promedio de masa corporal (IMC). Así mismo, se muestra que los individuos con un mayor índice cintura cadera (ICC) presentan niveles de glucosa mayores a 126 mg/dL, este valor de corte de la glucosa utilizado por la OMS y la ADA, se utiliza para establecer el diagnóstico de la diabetes.⁷ Investigaciones epidemiológicas han estimado que cerca del 80 y 90% de los individuos afectados por la DT2 son obesos, siendo que la presencia de obesidad en los pacientes diabéticos es tres veces mayor que en la población en general.⁵¹ Algunos estudios han demostrado que el control de peso, la dieta y el aumento de la actividad física disminuyen la resistencia a la insulina, disminuyendo así, por consiguiente, las posibilidades de desarrollar DT2.⁴⁹

En cuanto a los datos bioquímicos existe un aumento significativo en los valores de triglicéridos, creatinina y ácido úrico en el grupo diabético en comparación con el grupo control. Como ya se ha mencionado, las complicaciones que conlleva la DT2 es lo peligroso de la enfermedad, por ejemplo, la nefropatía diabética representa actualmente la principal causa de insuficiencia renal terminal, alrededor del 20% de los diabéticos desarrollan enfermedad renal después de más de 10

años con diabetes. La declinación funcional del riñón en los diabéticos debido a la nefropatía es previsible y progresiva; una vez instalada la nefropatía, la pérdida mensual de función renal varía de 0.5% a 1%. La lesión renal es caracterizada por afectar el filtro renal (glomeruloesclerosis) y con esto surge una pérdida renal de proteínas de grado variable a través de la orina, en un cierto plazo, ésta aumenta considerablemente y las señales de insuficiencia renal emergen con la elevación de ácido úrico y creatinina en la sangre.⁶³ Aunque los niveles de estos parámetros están apenas en el límite superior de los valores de referencia, se puede observar un incremento en el grupo de los diabéticos.

Según la Norma Oficial Mexicana 015 (nom-015) y OMS, los factores de riesgo para la DT2, son aquellos que aumentan la posibilidad para el desarrollo de la enfermedad⁴⁶ la naturaleza multifactorial de este padecimiento hace necesario evaluar algunos genes que tienen una relación con la enfermedad y que podrían ser factores de susceptibilidad para la DT2. Uno de ellos es la variante específica de PAX4 (Arg133Trp) resultante de la conversión de arginina (R) a triptófano (W) en la posición 133 (R133W), asociado con alteraciones funcionales *in vivo* e *in vitro*, que predispone a cetoacidosis diabética y representa un marcador de grave deficiencia de insulina en la población de origen africano occidental.²⁹ Un resultado interesante del presente estudio fue detectar pacientes con la variante R133W, la cual solamente se había encontrado en población africana. En el presente estudio se encontró la variante R133W del gen Pax-4 con una frecuencia del 0.3%, en el grupo control. Sin embargo, al realizar el análisis estadístico no se encuentra asociación con DT2 en esta población.

Por otro lado, se han realizado estudios moleculares del polimorfismo T130I del gen HNF-4 α en diferentes poblaciones; la variante ha sido asociada a la aparición de la diabetes en población japonesa y danesa con una frecuencia alélica del 4.7% y 1.75% respectivamente.²⁷ Entre los individuos mexicanos representa la más alta frecuencia (16%). Estas cifras sugieren una fuerte participación de esta variante funcional en el desarrollo de DT2 en mexicanos mestizos. La población estudiada en este trabajo representa sólo una panorámica más amplia acerca de la distribución de esta variante polimórfica en nuestro país, el presente estudio reveló una frecuencia alélica del 11.3% en el grupo considerado diabético y de

8.6% en los no diabéticos o grupo control, en la población de la región de Sabán. Sin embargo no se reveló ninguna asociación el polimorfismo T130I del gen HNF-4 α y la DT2. Podría ser necesario realizar el estudio con una muestra más amplia y realizar un análisis con sesgo de edad, género y otras variables que pueden influenciar los resultados.

La diabetes es una entidad clínica que cursa con alteraciones no sólo en el metabolismo de los carbohidratos y proteínas, sino también en el de los lípidos. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) al asociar la variante T130I con los factores bioquímicos y parámetros antropométricos se observan en la tabla 4, en donde el colesterol presenta una elevación significativa de los niveles en los individuos que presentan la variante polimórfica T130I y esta asociación se mantiene cuando las covariables edad, género, ICC e IMC permanecen fijas. Las dislipidemias constituyen una alteración común en la DT2, siendo la más común la llamada “dislipidemia aterogénica”, que se caracteriza por una hipertrigliceridemia (en ayuno y post-prandrial), reducción del HDL y niveles normales o moderadamente elevados de colesterol total con predominio de las partículas de LDL pequeñas y densas.⁵² La hipercolesterolemia en el diabético podría deberse a un incremento de la síntesis de colesterol independiente de insulina, por aumento de VLDL circulante que aporta el 20 % del colesterol total y por disminución del catabolismo de LDL.⁵³ Se propone que en la hiperlipidemia crónica, el incremento de las lipoproteínas plasmáticas, ofrece como resultado una lesión endotelial o el daño funcional de la pared arterial, lo que podría potenciar la aterogenicidad, pues la enfermedad coronaria y la enfermedad cerebrovascular ocurren en el diabético en una frecuencia de 2 a 3 veces mayor que en aquellas personas que no padecen esta enfermedad.⁵⁴

Por otro lado, uno de los principales riesgos de padecer DT2 son las complicaciones que ésta conlleva; se ha propuesto en diferentes estudios que contraer diabetes es un factor de riesgo para enfermedades hepáticas, desde la esteatohepatitis no alcohólica hasta la relación con virus de hepatitis C. En estos estudios se ha concluido que la erradicación de la infección que produce la hepatitis C, reduce significativamente la incidencia de desórdenes de la glucosa, tales como la diabetes. La explicación se ha centrado en la capacidad del virus de

la hepatitis C de fomentar un desarrollo anómalo de TNF a o IL 6, estas citoquinas inflamatorias facilitan un aumento de la resistencia a la insulina predisponiendo al paciente a sufrir un proceso similar al que se observa en pacientes con DT2.⁵⁵

La transaminasa oxalacética (TGO) está ampliamente difundida en el organismo, encontrándose en mayor concentración en hígado y corazón. Cualquier alteración de estos tejidos produce un aumento en los niveles de TGO circundante en forma proporcional al daño. En afecciones hepáticas se observan mayores elevaciones de esta enzima.⁵⁶ En la tabla 6 se visualiza una diferencia significativa al asociar la variante R133W del gen Pax-4 con los factores bioquímicos, específicamente con la TGO, que muestra valores elevados en los individuos que presentaron esta variante polimórfica.

Si bien no se presentó asociación entre los SNP's seleccionados y la susceptibilidad a padecer DT2, el conocimiento de éstos permite sentar las bases para el desarrollo de actividades preventivas y promotoras de la salud. Este estudio poblacional se incorpora a la consolidación de un banco de genes con información recaudada de diferentes etnias indígenas del territorio nacional. Aunque las implicaciones de los resultados de este tipo de estudios serán a largo plazo, es probable que permitan desarrollar métodos de prevención, pronóstico y tratamiento oportuno, así como diseñar modelos terapéuticos dirigidos a moléculas específicas.

VIII. CONCLUSIONES

- ★ Se encontró la variante T130I del gen HNF-4 α en la población Maya de Sabán del Estado de Quintana Roo, cuya frecuencia de 8.6%, es mayor a lo reportado en otras poblaciones, sugiriendo un fondo diabetogénico en la población mestiza mexicana de esa zona.
- ★ La variante R133W del gen Pax-4 se encuentra con una frecuencia de 9% en poblaciones africanas, sin embargo no se ha encontrado en otras poblaciones como la asiática y europea. Es relevante que en la población de estudio se encontró con una frecuencia del 0.5%.
- ★ No se encontró asociación entre los polimorfismos estudiados y la susceptibilidad para padecer DT2 en la población Maya de Sabán del Estado de Quintana Roo.
- ★ Aunque la existencia de asociación con la diabetes no se haya confirmado, se encontró asociación entre las variantes polimórficas T130I y R133W con las concentraciones de colesterol y transaminasa oxalacética, ambos factores involucrados en la patogénesis de la DT2.

IX. REFERENCIAS

1. Gómez O, Sesma S, Becerril V *et al.* Sistema de Salud de México, *Salud Pública de México*. Vol. 53, Suplemento 2, 2011.
2. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 87:4–14, 2010.
3. *México, principales causas de mortalidad desde 1938* [en línea]. Ing. Manuel Aguirre Botello. 2011 [Consulta: Mayo 2012]. Disponible en: <http://www.mexicomaxico.org/Voto/MortalidadCausas.htm>
4. ENSANUT 2012. Disponible en: <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>
5. *La diabetes ya es la primera causa de muerte* [en línea]. Periódico La Jornada. 2011 [Consulta: Mayo 2012]. Disponible en: <http://www.jornada.unam.mx/2011/11/11/sociedad/044n3soc>.
6. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444:840–46, 2006.
7. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *DIABETES CARE*, Vol. 35, Suplemento 1, 2012.
8. Moreno AL. Epidemiología y diabetes. *RevFacMedUNAM* Vol.44 No.1 Enero-Febrero, 2001.
9. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, *Diabetes Care*, Vol 35, Sup. 1, 2012.
10. Oviedo MA, Espinosa LF *et al.* Guía clínica para el diagnóstico y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. *RevMed IMSS*; 41 (Supl): S27-S46 S27, 2003.
11. *Fisiología del páncreas endocrino* [en línea] [Consulta: Diciembre 2012]. Disponible en: <http://escuela.med.puc.cl/paginas/cursos/tercero/integradotercero/apfisiopsist/nutricion/NutricionPDF/FisiologiaPancreas.pdf>
12. Jara AA. *Endocrinología*. España, Editorial Panamericana. Pag. 439-489, 2003.

13. Malgor LA, Valsecia ME. *Farmacología de la diabetes*. Farmacología médica. 2a ed. Corrientes: Ediciones Donato/FARM, vol 2: 174-191, 1995.
14. Poynten, Ann, Chisholm, Donald. INSULIN RESISTANCE: The link between diabetes and cardiovascular disease. *Diabetes Voice*, Vol 46, Num 2/2001
15. De la Torre LM. *Resistencia a la Insulina y Síndrome Metabólico*. *Endocrinología*. 9 (3): 240-252, 2003.
16. American Diabetes Association. *Todo sobre la Resistencia a la Insulina*. Enero 2012.
17. Acosta AM. Determinación del índice de resistencia insulínica mediante HOMA en una población de la Región Metropolitana de Chile. *Rev. méd. Chile* v.130 n.11 Santiago, 2002.
18. Bagwell A, Benito J *et al*. Genetic Analysis of HNF4- α Polimorfism in Caucasian-American Type 2 Diabetes. *Diabetes* Vol. 54: 1185-1190, 2005.
19. Iniesta, RG, Moreno E. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac Sanit*, 19 (4):333-4, 2005.
20. Sevilla SD. Metodología de los estudios de asociación genética. *Genética e Insuficiencia Cardíaca, Vol 2. N° 3, 2007*.
21. *Identificación de polimorfismos en un solo nucleótido en el gen cyp2d6 del citocromo P450, en población sana del Ecuador* [en línea]. Guadalupe Heras, 2010 [Consulta: Diciembre 2012]. Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/1128/1/T-ESPE-029615.pdf>
22. Cruz M, García J, López E, Valladares A *et al*. Genes candidatos como posibles marcadores de susceptibilidad a diabetes tipo 2. *Reb* 24 (3,4): 81-86, 2005.
23. Lozano T, Galindo C *et al*. *Bioquímica y Biología Molecular para Ciencias de la Salud*. 2da Edición, McGraw Hill Interamericana, 2000.
24. Barrio, R. Diabetes monogénicas: enfoque diagnóstico y tipos más frecuentes. *Avances en Diabetología*. 23(5): 333-340, 2007.
25. Sladek FM, *et al*. Identification of a binding motif specific to HNF4 by comparative analysis of multiple nuclear receptors. *Nucleic Acids Res*. Julio 40(12): 5343–5356, 2012.

26. Yuan X, Ta TC, Lin M, *et al.* Identification of an Endogenous Ligand Bound to a Native Orphan Nuclear Receptor. *PLoS ONE* 4(5), 2009.
27. Carl O. Pabo J, *et al.* Transcription Factors: Structural Families and Principles of DNA Recognition. *Annual Review of Biochemistry*, Vol. 61: 1053-1095, 2010.
28. Ortiz MG, Montúfar I, Menjívar M. Evaluación molecular del gen pax-4 en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 de inicio temprano. *2º Congreso Nacional de Química Médica*. 4 (8), 2006.
29. Mauvais F, Smith SB, *et al.* PAX4 gene variations predispose to ketosis-prone. *Diabetes, Human Molecular Genetics*, Vol. 13, No. 24 3151–3159, 2004.
30. *Diabetes e inmigración* [en línea]. Joan Barrot de la Puente 2009. [Consulta: Diciembre 2012]. Disponible en:
http://www.diabetespractica.com/pdf/num4/03_articulo_revision_D_practica_v.02_n.01_2011.pdf.
31. Berdasco GA. Evaluación del estado nutricional del adulto mediante la antropometría. *Revista Cubana Aliment Nutr*;16(2):146-52, 2002.
32. Glicemia Enzimática Liquicolor-STANBIO Lab. 2005
33. Colesterol Enzimático AA-STANBIO Lab. 2005
34. TG Liquicolor GPO/PAP- STANBIO Lab 2005
35. HDL Colesterol Monofase- STANBIO Lab 2005.
36. Friedewald WT, Levy JR, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoproteins cholesterol in plasma without the use of ultracentrifugation. *Clinical Chemistry* 18:449-502.
37. Creatinine-Linear Chemicals, S. L 2005
38. Urea Berthelot- Linear Chemicals, S.L 2005
39. GPT (ALT)- Spinreact 2004
40. AST (SGOT) BIALEX Laboratorios 2005
41. Fosfatasa Alcalina Liquicolor- STANBIO 2005
42. *Guía Práctica Sobre Técnica de PCR* [en línea]. Espinosa Laura 2000. [Consulta: Enero 2013]. Disponible en:
<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap17.pdf>

43. *RFLP* [en línea]. [Consulta: Febrero 2013]. Disponible en:
<http://www.nlm.nih.gov/visibleproofs/education/dna/rflp.pdf>
44. Menjivar M, Granados MA, *et al.* High frequency of T130I mutation of HNF4A gene in Mexican patients with early-onset type 2 diabetes. *Clinical Genetics*, 73: 185–187, 2008.
45. Diabetes Mellitus Tipo 1 [en línea]. Asociación de Pediatría. [Consulta: Febrero 2013]. Disponible en: <http://www.aeped.es>.
46. Bastarrachea R, López AJ, Bolado V, Téllez M, *et al.* Macrófagos inflamación, tejido adiposo, obesidad y resistencia a la insulina. *Gaceta médica mexicana*, 143(6): 505-12, 2007.
47. NOM 015 (1994). *Para la Prevención, tratamiento y Control de la diabetes mellitus en la Atención Primaria*.
48. Secretaría de Salud [Consulta: Abril 2013]. Disponible en:
<http://www.salud.df.gob.mx/>
49. Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, *et al.* Prevention of type 2 diabetes by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med*; 344:1343-50, 2011.
50. Castro SH, Escobedo de la Peña J. La prevalencia de la diabetes mellitus no dependiente de insulina y factores de riesgo asociados, en población mazateca del estado de Oaxaca, México. *Gaceta. médica*. 133 (6):527-34, 1997.
51. Regla CI, Molena CA, *et al.* Factores de riesgo en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. *Rev Latino-am Enfermagem*; 16(2), 2008.
52. Pollak F, Arteaga A, Serrano V. Dislipidemia y Diabetes Mellitus tipo 2. Asociación Latinoamericana de Diabetes. *Artículo de Revisión*. VOL. XV - Nº 1 - Año 2007
53. Nikkila EA. Are plasma lipoproteins responsible for the excess atherosclerosis in diabetes? *Acta Endocrinol* 1985;272 (1):27-9.
54. Illnait PJ. La dislipidemia en el paciente diabético. Parte I: Bioquímica patológica. *Rev Cubana Med Gen Integr* 1997;13(4):372-377

55. Demostrada la relación entre hepatitis C y diabetes [en línea]. Fundación para la diabetes 2013. [Consulta: Abril 2013]. Disponible en: <http://www.fundaciondiabetes.org/>
56. Bárcena JA. *Caracterización cinética de la fosfatasa alcalina*. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. 2008
57. *Enzima de restricción SfuI*. [en línea]. Portal Roche. [Consulta: Abril 2013]. Disponible en: <https://cssportal.roche.com/>
58. *Enzima de restricción Hsp92II*. [en línea]. Portal Promega. [Consulta: Abril 2013]. Disponible en: <http://www.promega.com/>
59. Silva I, Hidalgo A, et al. Análisis de la diversidad genómica en las poblaciones mestizas mexicanas para desarrollar medicina genómica en México. *PNAS Early Edition*, 2003.
60. Programa Universitario México Nación Multicultural-UNAM, 2004.
61. La población Indígena en México. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. (INEGI).
62. *Sabán* [en línea]. Pueblos de América [Consulta: Junio 2013]. Disponible en: <http://mexico.pueblosamerica.com/i/saban>
63. Cardona F, Rojo G, et al. El ácido úrico es un predictor de desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 en la población general. *Endocrinología y Nutrición*. 56(2):66-70, 2009.
64. Pueblo de Sabán [en línea]. H. Ayuntamiento José María Morelos 2011-2013 [Consulta: Julio 2013]. Disponible en: <http://www.josemariamorelos.gob.mx/>
65. Obesidad en el adulto [en línea]. Martha Kauffer 2013. [Consulta: Septiembre 2013]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/censenanza/spi/unidad2/obesidad.pdf>
66. Perez MM, Montaya ME. Técnicas para estudios de la resistencia insulínica. Una valoración crítica. *Av. Diabetol*, 17: 179-186, 2001.

ANEXO 1



Estudio de Diversidad Genómica en Poblaciones Nativas Mexicanas: Secuenciación Completa del Genoma como Recurso de Investigación para Estudios Evolutivos y Aplicados a la Salud



¿A quién le puedo llamar si tengo preguntas sobre este proyecto?

Si usted tiene preguntas acerca de la recolección de muestras, sus desechos o sobre el almacenamiento de las mismas, constate con la Comisión de Ética del Hospital Juárez de México. (0155557477684)

Por favor lea la siguiente información, medite su elección y firme si usted está de acuerdo:

Estoy de acuerdo:

- En donar una muestra de sangre:
- En que a partir de la muestra se me realicen exámenes bioquímicos como: glucosa, colesterol, triglicéridos, insulina, entre otros, cuyos resultados me serán entregados para evaluar el estado de mi salud.
- En que a partir de la muestra se haga la extracción de mi ADN para realizar estudios genómicos.
- En que a partir de la muestra se haga una línea celular que permitirá a los investigadores obtener una cantidad ilimitada de ADN y materiales biológicos durante mucho tiempo.
- En la línea celular y el ADN se utilicen tanto en el Estudios de Diversidad de Poblaciones Nativas Mexicanas como en otros estudios que se describen en esta forma de consentimiento.
- En que toda la información genética de la muestra sea depositada en bases de datos científicos de libre acceso (públicas) en Internet.
- En que una vez que la muestra haya sido estudiada, no podré retirar la información de mi muestra de las bases de datos científicas.
- He leído o escuchado toda la información, he hecho todas las preguntas que he tenido, y todas mis preguntas han sido respondidas satisfactoriamente. Soy consciente que dar una muestra es mi decisión.

Acepto que se me realice la toma de muestras de sangre periférica.

Lugar y fecha:

Nombre del participante:

Dirección:

Firma del Participante

¿Se le otorgó copia al participante?

Firma del Investigador:

Testigo (Firma)

ANEXO 2

EXTRACCIÓN DE ADN

1. En un tubo Falcon de 12 mL, agregar 5 mL de sangre y llevar a un volumen de 9.5 mL con Sacarosa Tritón 2X y después llevar a 12.5mL con H₂O
2. Mezclar perfectamente y dejar 15 min en hielo
3. Centrifugar a 2000rpm/ 15' a 4°C
4. Decantar sobrenadante
5. Lavar el botón con 2 mL de S/T 1x
6. Centrifugar 2000rpm/15' a 4°C
7. Decantar sobrenadante. Cuidado con el botón.
8. Agregar 1 ml de buffer de Lisis
9. Agregar 54 µL de SDS 20%
10. Agregar 25 µL de Proteinasa K
11. Disolver botón suave
12. Incubar a 37°C toda la noche en Baño María
13. Agregar 600 µL de NaCl saturado y agitar vigorosamente
14. Centrifugar 2000rpm/15'
15. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio
16. Dejar reposando 5min en hielo
17. Adicionar 2 volúmenes de Etanol (frio preferentemente)
18. Mezclar suave hasta ver el ADN
19. Recuperar el ADN con una pipeta Pasteur sellada y estéril
20. Lavar el DNA con EtOH 70%
21. Dejar secar el ADN (adherido a la pipeta pasteur)
22. Colocar el ADN en agua libre de RNAsas en tubos debidamente identificado

ANEXO 3

Protocolos de PCR-RFLP

PCR HNF-4 α

Fecha		Gen					
No	Muestra	DNA	H ₂ O	Master Mix	Taq Pol	Oligo 5'	Oligo 3'
1		0.8	10	10	0.5	0.5	0.5

RFLP HNF-4 α

Fecha		Gen				
No.	Muestra DNA	Enzima Sfu I	Buffer	Super Agua	Resultados	Observaciones
1		0.6	1	5.5		

PCR Pax-4

Fecha		Gen					
No	Muestra	DNA	H ₂ O	Master Mix	Taq Pol	Oligo 5'	Oligo 3'
1		1	10	12	0.5	0.5	0.5

RFLP Pax-4

Fecha		Gen				
No.	Muestra PCR	Enzima Hsp 92 II	Buffer K	SuperAgua	Resultados	Observaciones
1		0.8	2	12.5		