

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMEDICAS**

**Identificación del polimorfismo Pro12Ala
de PPAR γ 2 en pacientes con nefropatía
diabética en la población mexicana**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(ORIENTACIÓN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A:

RAUL CARBALLO PEREA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARIA TERESA TUSIE LUNA

wt350790

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2005.



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo reespolonal.
NOMBRE: RAUL CARBALLO PEREA
FECHA: 22/11/2005
FIRMA: 

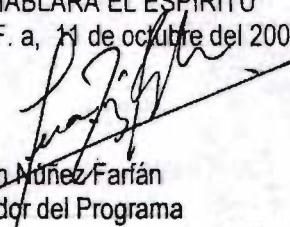
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 12 de septiembre del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) CARBALLO PEREA RAUL con número de cuenta 92593882 con la tesis titulada: **Identificación del polimorfismo Pro12Ala de PPARy2 en pacientes con nefropatía diabética en la población mexicana**, bajo la dirección del(a) Dra. María Teresa Tusie Luna.

Presidente:	Dra. Marcia Hiriart Urdanivia
Vocal:	Dra. Socorro C. Durán Vargas
Secretario:	Dra. María Teresa Tusie Luna
Suplente:	Dr. Luis Felipe Jiménez García
Suplente:	Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 11 de octubre del 2005


Dr. Juan Muñoz Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Comité tutorial:

Dra. Socorro Duran Vargas
Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta

Agradezco a CONACYT el apoyo financiero otorgado mediante una beca con número de registro 176973.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LA UNIDAD DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y MEDICINA GENÓMICA DEL INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. MARÍA TERESA TUSIE LUNA.

Agradecimientos.

Agradezco a Dios por darme el tiempo y las fuerzas necesarias para lograr a buen termino esta meta.

Agradezco en forma especial a Mis Padres Carlos Carballo Casanova y Xochitl Perea Gallegos por darme la vida y su vida generando el apoyo incondicional que me ha permitido la realización de ésta y cada una de mis metas en la vida.

Agradezco a Mis Hermanos por todo el apoyo y confianza que me brindaron haciendo posible la realización de esta tesis.

Agradezco a Mi tutor principal la Dra. María Teresa Tusie Luna por todo su tiempo, apoyo y asesoría que me brindo.

Agradezco a Mis Sinodales la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia, la Dra. Socorro Duran Vargas, la Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta y el Dr. Luis Felipe Jiménez García por sus valiosas observaciones y tiempo.

Agradezco a todo el personal de la unidad de biología molecular y medicina genómica , Dr. Samuel Canisales, Dr. Angel Milliar, Alvaro, Adriana, Laura, Salvador, Maribel, Lupita, Jesús, Claudia y a mis compañeros del posgrado y personas especiales como es Angeles, Ricardo, Rocio y Felipe; por todo su apoyo, comprensión, cariño y respeto.

	pagina
Índice general	i
Índice de figuras	ii
Índice de tablas.....	iii
1. RESUMEN	1
2. Abstract	3
3. INTRODUCCIÓN	5
3.1 La Diabetes Mellitus.....	5
a) Descripción	5
b) Criterios diagnósticos	6
c) Clasificación	7
3.2 Epidemiología de la Diabetes mellitus	8
3.3 Factores de riesgo para la Diabetes mellitus tipo 2	10
3.4 Genética de la Diabetes mellitus tipo 2	11
3.5 La Nefropatía Diabética	12
3.6 Genética de la Nefropatía Diabética	14
3.7 Gen PPAR γ	16
3.8 Regulación de la expresión de PPAR γ	17
3.9 Proteína PPAR γ	19
4. ANTECEDENTES	23
4.1 Papel de PPAR γ en la DMT2.....	23
4.2 Variantes de PPAR γ 2 asociadas al desarrollo de la DMT2 y otras patologías	24
4.3 Papel de PPAR γ en la nefropatía diabética.....	26
4.4 La variante PPAR γ 2 y la nefropatía diabética	29
4.5 Polimorfismos en secuencias Alu como marcadores poblacionales	30
5. JUSTIFICACION	32
6. HIPOTESIS	32
7. OBJETIVOS	32
7.1 Objetivo general.....	32
7.2 Objetivos particulares	32
8. MATERIAL Y METODO	33
8.1 Criterios de inclusión.....	33
8.2 Criterios de exclusión.....	33
8.3 Extracción de DNA.....	33
8.4 Amplificación de la región de interés del gen PPAR γ a través de PCR.....	34
8.5 Análisis de restricción para identificación del polimorfismo en forma homocigota o heterocigoto	34
8.6 Secuenciación automatizada	34
8.7 Genotipificación del marcador Alu Yc1RG68	35
9. RESULTADOS	36
10. DISCUSIÓN	46
11. CONCLUSIONES	50
12. REFERENCIAS	51
13. Lista de Abreviaturas	60

Índice de figuras

	pagina
Figura 1. Prevalencia de la diabetes mellitus	8
Figura 2. Muertes por diabetes mellitus en México, 1955-2001	9
Figura 3. En el desarrollo de la nefropatía diabética participan factores genéticos y ambientales.....	15
Figura 4. Organización del gen de PPAR γ	16
Figura 5. Factores reguladores de la expresión de PPAR γ	17
Figura 6. Reguladores de la actividad de los PPARs	21
Figura 7. Las fotografías A y B son corrimientos de muestras de producto de digestión de pacientes con nefropatía diabética en geles de acrilamida al 8%.....	36
Figura 8. Las fotografías A y B son corrimientos de muestras de producto de digestión de los individuos del grupo de controles normoglicémicos en geles de acrilamida al 8%.....	37
Figura 9. Las fotografías A y B son corrimientos de muestras de producto de digestión de individuos del grupo de controles nefropatas en geles de acrilamida al 8%.....	38
Figura 10. Electroferogramas de individuos genotipificados por RFLP	39
Figura 11. Las fotografías A y B son corrimientos de muestras de producto de amplificación del marcador en individuos del grupo de pacientes con nefropatía diabética en geles de agarosa al 2%	43
Figura 12. Las fotografías A y B son corrimientos de muestras de producto de amplificación del marcador en individuos del grupo de controles sanos en geles de agarosa al 2%.....	44

Índice de tablas

	pagina
Tabla 1. Diabetes MODY (Maturity onset diabetes of the young)	7
Tabla 2. Genes asociados a la presencia de daño renal en pacientes con DMT2	15
Tabla 3. Estudios de asociación del polimorfismo Pro12Ala con la presencia de DMT2 y Obesidad	25
Tabla 4. La frecuencia genotípica y alélica de los grupos en estudio por RFLP mediante la restricción de la enzima BstU-I	39
Tabla 5. Análisis comparativo de las frecuencias esperadas con las observadas (equilibrio de Hardy-Weinberg) del grupo de pacientes nefrópatas diabéticos	40
Tabla 6. Análisis comparativo de las frecuencias esperadas con las observadas (equilibrio de Hardy-Weinberg) del grupo control con nefropatía	40
Tabla 7. Análisis comparativo de las frecuencias esperadas con las observadas (equilibrio de Hardy-Weinberg) del grupo de pacientes diabéticos sin nefropatía.....	40
Tabla 8. Análisis de los Alelos Alanina y Prolina del gen de PPAR γ en el grupo de los pacientes con nefropatía diabética vs. grupo control normoglicémicos	41
Tabla 9. Análisis de los Alelos Alanina y Prolina del gen de PPAR γ en el grupo de los pacientes con nefropatía diabética vs. grupo control diabéticos.....	42
Tabla 10. Análisis de los Alelos de tamaños 488 pb y 166 pb del gen de Yc1RG68 en el grupo de los pacientes con nefropatía diabética vs. grupo normoglicémicos.....	45

1. RESUMEN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad heterogénea, que ha cobrado gran interés en todo el mundo debido a su alta prevalencia, y los grandes costos derivados de su diagnóstico y tratamiento. La DM es una enfermedad crónica degenerativa que se asocia al desarrollo de complicaciones como la retinopatía, la nefropatía y la neuropatía.

La nefropatía diabética (ND) reconocida como una de las complicaciones más frecuentes de la diabetes mellitus, es la principal causa de enfermedad renal terminal en muchos países, incluyendo México. El desarrollo de la ND depende de la interacción de diferentes factores genéticos y ambientales.

Distintos *loci* en los cromosomas 20, 4 y 3 se han relacionado al desarrollo de la ND. En el locus del cromosoma 3 se ubica el gen del receptor activado por el proliferador de peroxisomas γ (PPAR γ). La activación de este factor transcripcional desencadena respuestas coordinadas cuya finalidad es la depuración plasmática de los ácidos grasos mediante su almacenamiento en el tejido adiposo, además de aumentar la utilización de glucosa en los tejidos periféricos y participar en la respuesta contra procesos inflamatorios crónicos.

Existen dos isoformas para este receptor: PPAR γ 1 y PPAR γ 2, este último tiene 28 aminoácidos adicionales incluyendo el cambio funcional del aminoácido 12 (Pro12Ala). En la literatura se ha descrito la asociación de este polimorfismo con la disminución en la sensibilidad a la insulina, la obesidad y la diabetes tipo 2, y más recientemente se ha asociado con la ND en población caucásica (Alemanes) y Brasileña, para las cuales el alelo Ala12 se asocia con un efecto protector.

En este estudio se analizaron tres grupos de individuos mexicanos no relacionados: 1) 113 pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y nefropatía con niveles de glucosa > 126 mg/dL y creatinina en suero > 2 mg/dL, 2) 50 individuos diabéticos con 10 o más años de evolución sin evidencia de nefropatía y 3) 157 sujetos control normoglicémicos. La amplificación se hizo a partir de DNA genómico extraído de linfocitos de sangre periférica. La genotipificación de todos

los individuos se realizó mediante la estrategia de PCR mutagénico y RFLP (polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción).

A partir de la obtención de las frecuencias alélicas de toda la población en estudio, se analizaron los grupos casos y controles por separado mediante el equilibrio de Hardy-Weinberg para descartar errores de genotipificación. Posteriormente se realizó el estudio de asociación mediante la comparación de casos y controles a través de la prueba de Chi cuadrada; se determinó significancia con una $p < 0.05$.

Se encontró asociación (OR de 10.2, 95%; $p = 0.008$) entre la presencia del alelo alanina en forma homocigota y la presencia de la nefropatía en los pacientes con DMT2. La homocigocidad para el alelo Ala12 no se encontró en ninguno de los pacientes con DMT2 de larga evolución sin evidencia de nefropatía, así mismo no se encontró en ninguno de los sujetos normoglicémicos.

Estos resultados sugieren que la presencia del alelo Ala12 de forma homocigota confiere un riesgo importante para el desarrollo de DMT2 y nefropatía en pacientes mexicanos. La homocigocidad para el alelo Ala12 se observó exclusivamente en el grupo de DMT2 y nefropatía, por lo que la asociación podría ser exclusiva a la presencia de nefropatía diabética. Se requiere sin embargo, de un número mayor de individuos con DMT2 de larga evolución sin el desarrollo de nefropatía, para confirmar este hallazgo.

2. ABSTRACT

The diabetes mellitus (DM) is a heterogeneous illness that has charged great interest in the entire world due to its high prevalence, and the big derived costs of its diagnosis and treatment.

The DM is a degenerative chronic illness; this is associated to the development of complications like the retinopathy, the nephropathy and the neuropathy.

The grateful diabetic nephropathy (ND) as one of the most frequent complications in the diabetes mellitus, is the main cause of illness renal terminal in many countries, including Mexico. The development of the ND depends on the interaction of different genetic and environmental factors.

Different loci in the chromosomes 20, 4 and 3 have been related to the development of the ND. In the locus of the chromosome 3 is located the gene of the peroxisome proliferators activated receptor γ (PPAR γ). This nuclear receiver is involved in the metabolism of the glucose and of the lipids as well as in the differentiation of the adipocytes.

Two isoforms exists for this receptor: PPAR 1 and PPAR 2, this last one has 28 additional amino acids including the functional change of the amino acid 12 (Pro12Ala). In the literature the association of this polymorphism has been described with the decrease in the sensibility to the insulin, the obesity and the diabetes type 2, and more recently it has been associated with the ND in Caucasian population (German) and Brazilian, for those which the allele Ala12 is associated with a protective effect.

In this study three groups of Mexican people were not related: 1) 113 patients with diabetes mellitus type 2 (DMT2) and nephropathy with levels of glucose > 126 mg/dL and serum creatinine > 2 mg/dL, 2) 50 diabetic individuals with 10 or more years of evolution without nephropathy evidence and 3) 157 subject control non diabetics. The amplification was made starting from genomic DNA isolated from leukocytes of outlying blood. The screened of all the individuals was carried out by

means of the strategy of PCR and RFLP (restriction fragment length polymorphism).

Starting from the obtaining of the frequencies of alleles of the whole population in study, the groups cases and controls were analyzed for separate by means of the balance of Hardy-Weinberg to discard screened errors. Later on this was carried out the association study by means of the comparison of cases and controls through the test of square Chi; the significance was determined with a $p < 0.05$.

This was association (OR 10.2, 95%; $p=0.008$) among the presence of the allele alanine in form homozygote and the presence of the nephropathy in the patients with DMT2. The allele Ala12 in form homozygote was not in none of the patients with DMT2 of long evolution without nephropathy evidence, likewise it was not in none of the subject non diabetics.

These results suggest that the presence of the allele Ala12 in way homozygote it confers an important risk for the development of DMT2 and nephropathy in Mexican patients. The allele Ala12 in form homozygote was observed exclusively in the group of DMT2 and nephropathy, for what the association could be exclusive to the presence of diabetic nephropathy. It is required however, of a number bigger than individuals with DMT2 of long evolution without the nephropathy development, to confirm this discovery.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 La Diabetes Mellitus

a) Descripción

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica degenerativa, de etiología múltiple caracterizada por la elevación plasmática de glucosa y el desarrollo de distintas complicaciones agudas y/o crónicas. La diabetes mellitus conjunta un grupo de enfermedades caracterizadas por alteraciones en la secreción de insulina y la sensibilidad a la insulina en grados variables.

El páncreas humano produce una hormona llamada insulina, esta hormona se secreta al torrente sanguíneo para mantener los niveles normales de glucosa al facilitar la entrada de la glucosa a las células del músculo, tejido graso e hígado. En la DM disminuye el paso de la glucosa sistémica a las células blanco, debido a diversas condiciones como es a la cantidad insuficiente de insulina, o la falla en la función o señalización de los receptores de insulina en las células blanco, entre otras. Cuando la concentración de la glucosa en sangre es alrededor de 180 mg/dL, la capacidad de los conductos renales para reabsorber la glucosa se excede (umbral renal), la glucosa es eliminada por la orina (glucosuria); debido a que la glucosa es un diurético osmótico, se excretan sales y agua en grandes cantidades (poliuria), generando deshidratación celular.

De forma clínica esto se traduce en un aumento en la sed (polidipsia), con pérdida de peso debido a la utilización de la reserva de grasas como fuente de energía, un aumento del apetito (polifagia) y fatiga. Un paciente diabético sin tratamiento se produce un aumento de los cuerpos cetónicos en la sangre debido a la utilización de las reserva de grasa; deshidratación, desequilibrio de electrolitos y acidosis, desencadenando coma diabético e incluso la muerte.

b) Criterios Diagnósticos

La DM es un grupo heterogéneo de trastornos que presentan características muy variadas que comprende desde pacientes con un comienzo agudo, hasta pacientes asintomáticos que son diagnosticados a través de pruebas de laboratorio como un hallazgo azaroso.

En distintos estudios se ha demostrado que un número considerable de pacientes son diagnosticados hasta el momento en que presentan alguna de las complicaciones asociadas, lo que sugiere que la fase asintomática puede ser tan larga como 10 años (Harris MI y col., 1994). Esto determina la gran importancia que tiene la detección oportuna de la DM; la cual depende en gran medida tanto de la eficacia de la prueba como de la determinación adecuada de los criterios de diagnóstico.

Con estos antecedentes, La Asociación Latinoamericana de Diabetes de acuerdo con la OMS y la Asociación Americana de Diabetes acordó aceptar como criterios de diagnóstico de diabetes:

- a) una glucemia plasmática en muestras tomadas al azar (en cualquier momento del día, e independiente de su relación con las comidas) igual o mayor a 200 mg/dL (11.1 mmol/L) por una ocasión, más la presencia concomitante de síntomas y signos sugestivos de hiperglucemia.
- b) glucemias plasmáticas en muestras tomadas al azar que sean iguales o mayores a 200 mg/dL (11.1 mmol/L) por dos ocasiones en ausencia de síntomas.
- c) glucemias plasmáticas en ayunas (de 8-12 horas) iguales o mayores a 126 mg/dL (7.0 mmol/L), por dos ocasiones y d) glucemias plasmáticas iguales o mayores a 200 mg/dL (11.1 mmol/L) en muestras tomadas a las dos horas de una curva de tolerancia oral a la glucosa (CTOG), después de la administración vía oral de 75g de glucosa administrada según las normas de la OMS.

c) Clasificación

Está establecido claramente que la DM es una enfermedad heterogénea desde el punto de vista clínico y etiológico. De acuerdo a los conocimientos actuales, se diseñó un esquema de clasificación como una estrategia para agrupar a los diferentes fenotipos y facilitar el estudio de manera que se obtengan resultados comparables. En 1997, la ADA (American Diabetes Association) reportó la clasificación más reciente de la diabetes mellitus basado en los resultados obtenidos de las investigaciones de los últimos 20 años; la DM se clasifica en:

a) La diabetes tipo 1 (DMT1) antes conocida como diabetes juvenil, se caracteriza por la destrucción de las células β del páncreas, en la mayoría de los casos, se presenta como resultado de un proceso autoinmune y los pacientes requieren del suministro exógeno de insulina de manera permanente.

b) La diabetes gestacional se caracteriza por la presencia de niveles de glucosa sérica elevados durante el embarazo después de la administración de una carga oral de glucosa, y se postula que es resultado de resistencia a la insulina.

c) Otros tipos específicos de diabetes donde se incluye la diabetes tipo MODY (Maturity onset diabetes of the young) diabetes monogénica, de herencia autosómica dominante y de aparición usualmente antes de los 25 años. Este subtipo constituye un grupo de fenotipos con causas heterogéneas (Tabla 1).

d) La diabetes tipo 2 (DMT2) también conocida como diabetes del adulto (ADA, 1997). Esta es la forma más común ya que representa entre el 90% y el 95% de todos los casos diagnosticados de diabetes. La DMT2 se presenta con más frecuencia en la etapa adulta, sin embargo, actualmente existe un incremento de esta enfermedad en niños, jóvenes y adultos jóvenes (García-García E. y col., 2002).

	Locus genético	Proteína	Porcentajes en familias MODY	Edad de diagnóstico	Defecto primario	Severidad	Complicaciones
MODY1	20q	HNF-4 α	Rara	Postpubertad	Páncreas/hígado	Severa	Frecuentes
MODY2	7p	Glucocinasa	10 a 65	Niñez	Páncreas/hígado	Media	Raras
MODY3	12q	HNF-1 α	20 a 75	Postpubertad	Páncreas/riñón	Severa	Frecuentes
MODY4	13q	IPF-1	Rara	Adulto temprano	Páncreas/riñón y otros	Media	Raras
MODY5	17cen-q21.3	HNF-1 β	Rara	Postpubertad	Páncreas/riñón y otros	Media	Raras
MODYx		desconocido	10 a 20	heterogenea	Páncreas/heterogeneo	Media	Desconocidas

(Roguel Velho, 1999)

Tabla 1. Diabetes MODY (Maturity onset diabetes of the young).

3.2 Epidemiología de la Diabetes Mellitus

La DM constituye un problema de salud pública, debido a que es una de las enfermedades con mayor impacto socioeconómico, no solamente por su elevada prevalencia (figura 1), sino, también, por las consecuencias de las complicaciones crónicas como la nefropatía diabética que se ha estimado afecta a más de ocho millones personas en el mundo (Jean Marx, 2002; King H y col., 1998). La DM se consideraba una enfermedad con poco impacto en la mortalidad en el mundo. Sin embargo, la mortalidad por diabetes ha mostrado un incremento sostenido durante las últimas décadas y actualmente ocupa el primer lugar dentro de la mortalidad general (King H y col., 1998; Zimmet P, 2000; Amos A y col., 1997).

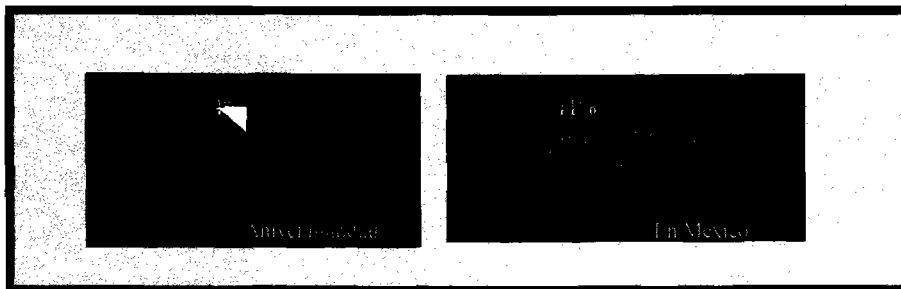


Figura 1. Prevalencia de la diabetes mellitus.

En México, la prevalencia de la diabetes se estimó en 1993 (ENEC) de 8.2% en individuos de 20 a 69 años y para el año 2000 (ENSA) ascendió a 11.2%, representando una de las más altas en el mundo.

La mortalidad por DM en el período de 1990 a 1999 se incrementó de manera constante con alrededor de 1,250 muertes en 1990, 5,805 muertes en 1998 y más de 3,800 muertes en 1999 (INEGI y SSA) (Tabla 1). Desde 1999, la DM ocupa la primera causa de mortalidad en nuestro país (ENSA 2000).

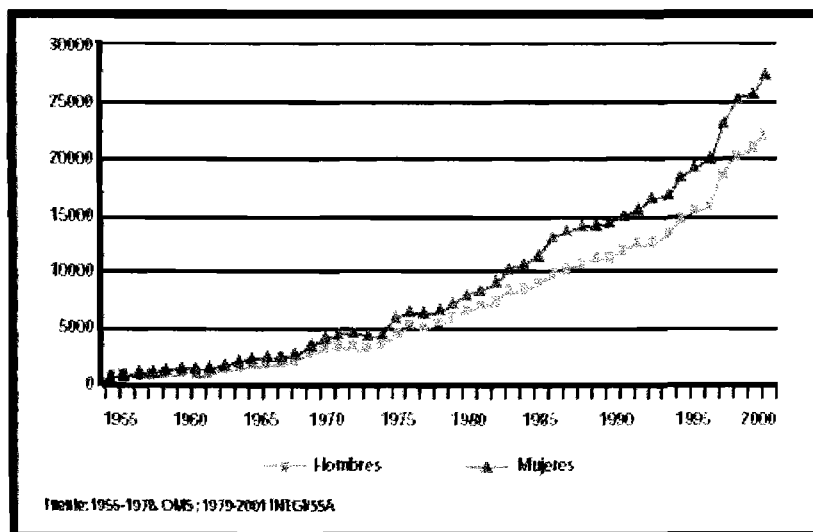


Figura 2. Muertes por diabetes mellitus en México, 1955-2001.

3.3 Factores de riesgo para la Diabetes Mellitus tipo 2

El cambio marcado de hábitos alimenticios y de actividad física como consecuencia de la urbanización de las poblaciones ha generado que la prevalencia de la DMT2 y otras enfermedades crónicas degenerativas como la obesidad estén en constante aumento.

Los factores de riesgo para la DMT2 incluyen: el envejecimiento, la historia familiar de diabetes, historia previa de diabetes durante el embarazo, la intolerancia a la glucosa, la inactividad física, el origen racial/étnico y la obesidad.

A pesar que la diabetes depende en gran parte de la carga genética, hay factores ambientales que propician su aparición. Existe un aumento de la prevalencia mundial de DMT2 principalmente en países en vías de desarrollo, que se observa acompañado de obesidad; sin embargo, no todos los individuos obesos desarrollan diabetes, y aunque no todos los diabéticos son obesos, existe una gran proporción que sí lo son. Factores como la presencia de sobrepeso, obesidad y la resistencia a la insulina participan en el desarrollo de la DMT2.

3.4 Genética de la Diabetes Mellitus tipo 2

Distintas líneas de evidencia muestran la participación del componente genético en la etiología de la DMT2: a) la agregación familiar b) estudios en gemelos idénticos los cuales han reportado concordancia desde 63% hasta el 90% para la DMT2 (Poulsen P y col., 1999) c) la alta prevalencia de DM que se presenta en algunas poblaciones como son los Naruanos y los Indios Pima. d) la existencia de formas mendelianas de DMT2 como la diabetes tipo MODY y e) la inactivación selectiva de algunos genes resulta en el desarrollo de diabetes en modelos animales.

A la fecha se han reportado más de 40 genes distintos asociados con DMT2 o con algunos de sus componentes como niveles elevados de insulina, pero sólo en muy pocos casos, su asociación se ha demostrado en distintas poblaciones. Algunos de los genes que han mostrado asociación significativa a DMT2 son PPAR γ , ABCC8, GGGR, GCK, KCNJ11, SCL2 (Altshuler D y col., 2000; Hager J y col., 1995; Takekawa K y col., 1994; Gloyn AL y col., 2003; Tao T y col., 1995).

En términos generales se considera que la DMT2 es un padecimiento clínica y genéticamente heterogéneo, donde la mayoría de los genes y las variantes alélicas que participan aún no se conocen.

3.5 La Nefropatía Diabética

La nefropatía diabética (ND) es una de las complicaciones crónicas más frecuentes de la diabetes mellitus y es la principal causa de enfermedad renal terminal en muchos países (Brancati FL y col., 1997). Esta complicación se caracteriza por el incremento de la creatinina en suero y el incremento de la excreción de la creatinina urinaria así como de albúmina en orina (microalbuminuria) (Ritz E y col., 1999; Alzaid AA, 1996).

La clasificación más utilizada de la ND es la de Mogensen que se basa en las características clínicas y se divide en 5 etapas:

En la primera etapa hay un aumento de la excreción de albúmina basal después del ejercicio y mediante el control adecuado de la diabetes, esta se puede revertir.

En la segunda etapa hay un aumento del filtrado glomerular y la microalbuminuria se eleva en forma intermitente.

En la tercera etapa (nefropatía incipiente) la microalbuminuria se presenta en forma persistente.

La cuarta etapa corresponde a la nefropatía clínica con el síndrome clínico completo: macroproteinuria, con grados variables de insuficiencia renal e hipertensión arterial.

Por último, la quinta etapa corresponde a la insuficiencia renal avanzada con el cuadro clínico del síndrome urémico.

La ND comprende un conjunto de alteraciones morfológicas renales de cualquier tipo producidas por la diabetes. De esta forma la ND se ha clasificado mediante el tipo de alteración en:

- a) la glomerulopatía diabética, donde la principal alteración es a nivel glomerular, presentando un aumento en el tamaño del glomérulo con un aumento de la membrana basal, este engrosamiento esta dado principalmente por un aumento del colágeno tipo VI, con la posterior alteración iónica relacionada con la pérdida de albúmina por la orina (albuminuria o proteinuria).
- b) Después de aproximadamente 10 años aparece la glomeruloesclerosis difusa (glomérulos grandes con membrana basal engrosada y un aumento de la matriz mesangial).

c) Con tiempo de evolución de más de 10 años aparece la lesión conocida como glomeruloesclerosis nodular de Kimmelstiel y Wilson (el mesangio presenta forma segmentaria y focal, expansiones nodulares y lobulillares distales) típica de diabetes mellitus.

d) Otra alteración es la tubulopatía diabética, que se caracteriza por la infiltración de células de la pared recta del túbulo contorneado proximal y del asa de Henle, conocidas como células de Arman-Ebstein, la cual se presenta habitualmente en diabéticos descompensados.

También se presentan alteraciones inespecíficas en el intersticio como, fibrosis y células espumosas. Asimismo, existen lesiones vasculares, los vasos presentan arterioesclerosis y arterioloesclerosis.

Aproximadamente del 20-30% de los pacientes con DMT1 desarrollan evidencia de nefropatía, y en la DMT2, una porción considerablemente más pequeña, progresan al estado renal terminal. Sin embargo, debido a la mayor prevalencia de la DMT2, estos pacientes representan más de la mitad de los individuos que requieren diálisis.

3.6 Genética de la Nefropatía Diabética

En la nefropatía diabética participan un conjunto de genes de susceptibilidad (herencia multifactorial) así como factores ambientales que predisponen su presentación (Krolewski AS y col., 1985; Seaquist ER y col., 1989; Quinn M y col., 1996; Wagenknecht LE y col., 2001) (Figura 3).

Entre los factores de riesgo asociados al desarrollo de la nefropatía diabética está el tiempo de evolución de la diabetes mellitus, un pobre control de la glucemia y la presencia de hipertensión arterial. Sin embargo, estos factores no son suficientes para predecir cuales pacientes desarrollaran ND. De hecho, un paciente con pobre control de la glucemia y con presión sanguínea elevada podría no desarrollar nefropatía diabética incluso muchos años después del diagnóstico de DMT2.

Estas observaciones sugieren que sólo un subconjunto de individuos con DMT2 está en riesgo de desarrollar ND, y que su expresión depende en gran parte de la presencia de alelos de susceptibilidad.

En este sentido, Pettitt DJ y colaboradores en 1990 estudiaron un grupo de Indios Pima donde la presencia de diabetes mellitus ocurre a edades más tempranas y encontraron que la proteinuria se manifiesta en el 14% de la descendencia de padres diabéticos cuando ningún padre tiene proteinuria, y es mas frecuente cuando uno o ambos padres tienen proteinuria (23 y 46% de la descendencia respectivamente).

Por otro lado, la hipertensión paterna incrementa el riesgo de proteinuria en la DMT1 (Rudberg S y col., 1998; Roglic G y col., 1998) y DMT2 (Canini LH y col., 1998). Por lo tanto, existe evidencia que sustenta que la susceptibilidad a desarrollar ND esta condicionada de forma genética.

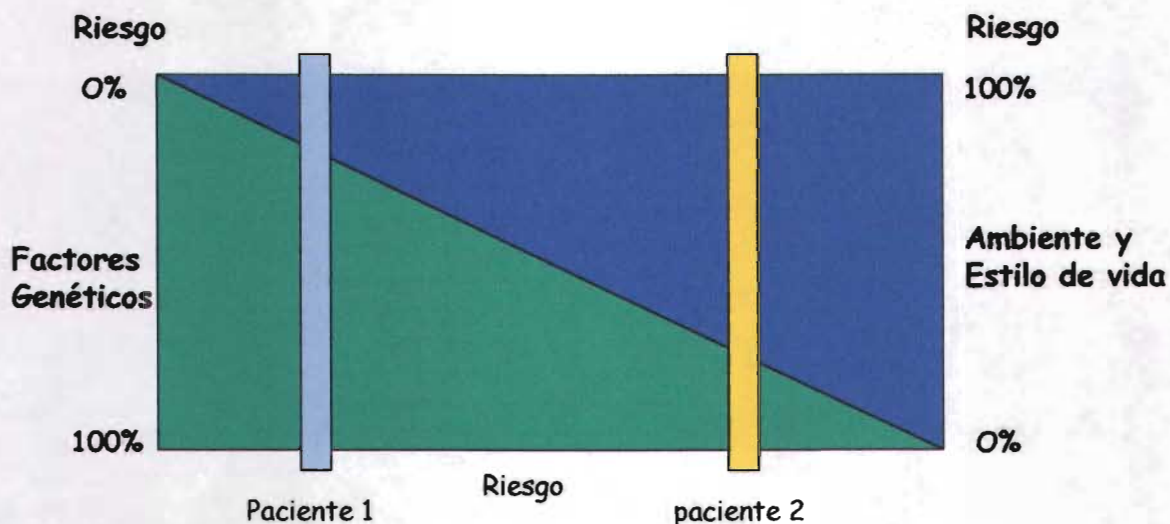


Figura 3. En el desarrollo de la nefropatía diabética participan factores genéticos y ambientales.

En la búsqueda de posibles genes asociados de la ND se han encontrado distintos loci relacionados a la presencia de esta complicación en los cromosomas 20, 4 y 3. En el locus del cromosoma 3 se ubica el gen del receptor activado por el proliferador de peroxisomas γ (PPAR γ) (Bowden DW y col., 1997; Imperatore G y col., 1998). En los dos loci restantes no existen genes candidatos obvios asociados con esta complicación crónica.

La ND es una complicación de la diabetes mellitus que se caracteriza por ser genéticamente heterogénea, ya que un solo gen asociado no puede explicar de forma completa la presencia de la nefropatía diabética, lo que sugiere que es el resultado de la participación de varios genes. En la tabla 2 se muestran algunos genes asociados a la susceptibilidad al desarrollo de ND.

GEN	Símbolo	Tipo de Diabetes	Autor
Enzima convertidora de la angiotensina II	DCPI	DMT2	Wong TY y col., 2001.
Angiotensinogeno	AGT	DMT2	Oue T y col., 1999.
Receptor I de la angiotensina II	AGTR I	DMT2	Tomino Y y col., 1999.
Apolipoproteína E	APOE	DMT2	Eto M y col., 2002.
Antagonista del receptor de interleucina I	IL 1 RN	DMT2	Blakemore AI y col., 1996.
Péptido atrial natriurético	PAN	DMT2	Nannipieri M y col., 2001.
Sintasa no endotelial	EcNOS	DMT2	Neugebauer S y col., 2000.

Tabla 2. Genes asociados a la presencia de daño renal en pacientes con DMT2.

3.7 Gen de PPAR γ .

El gen PPAR γ codifica para la proteína del mismo nombre, un receptor nuclear que induce la transcripción de genes involucrados en la sensibilidad a la insulina, la diferenciación de los adipocitos y la inflamación (Kliwer SA y col., 1998; Ribon V y col., 1998). Este gen en el humano abarca alrededor de 100 kb y está compuesto de 9 exones. La transcripción del gen da lugar a tres RNAs mensajeros: PPAR γ 1, PPAR γ 2 y PPAR γ 3 mediante el uso de promotores diferentes y procesamiento alternativo (splicing) en el extremo 5' del gen.

Los RNAs mensajeros PPAR γ 1 y PPAR γ 3 dan lugar a la misma proteína. Los RNAs mensajeros de PPAR γ 1 y PPAR γ 2 son codificados por 8 y 7 exones, respectivamente. La región 5' del RNAm de PPAR γ 1 es codificada por dos exones, el cual en analogía a la nomenclatura usada para el gen de ratón, es llamado exón A1 y exón A2. La región codificante de PPAR γ 1 contiene los siguientes 6 exones (1-6). Los exones 1-6 también codifican los RNAs mensajeros de PPAR γ 2. Existen 28 aminoácidos adicionales de PPAR γ 2 así como el UTR-5' que son codificados por el exón B, el cual está localizado entre los exones A1 y A2 (Beamer BA y col., 1997; Zhu Y y col., 1995; Fajas L y col., 1997; Fajas L y col., 1998).

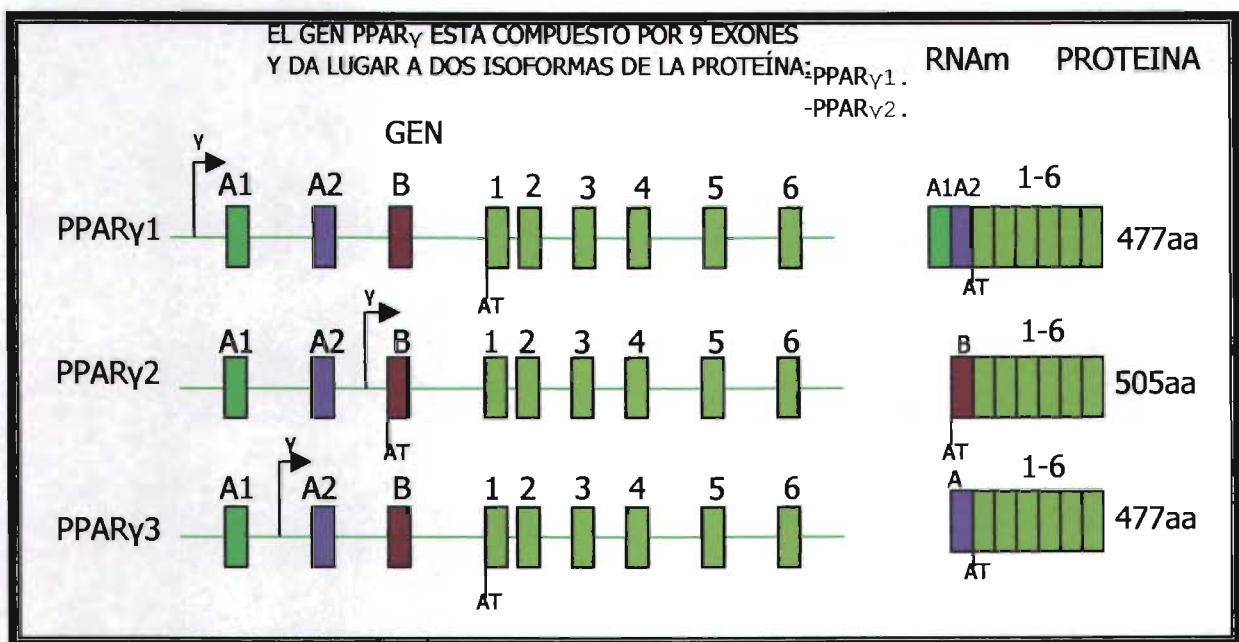


Figura 4. Organización del gen de PPAR γ .

3.8 Regulación de la expresión de PPAR γ

En el estudio de la regulación de este gen se ha encontrado que los factores reguladores C/EBP- β y - δ y ADD1/SREBP1 inducen la expresión de PPAR γ activando el proceso adipogénico por transactivación de genes adipocito-específicos involucrados en el metabolismo de lípidos, así como aP2 (proteínas de unión a ácidos grasos), PEPCK (fosfoenolpiruvato carboxinasa), AOX (acyl-CoA oxidasa) y LPL (liproteína lipasa) (Figura 4) (Tontonoz P y col., 1994; Tontonoz P y col., 1995).

Como se mencionó, mediante el uso del promotor y splicing alternativo se generan diferentes isoformas de RNAm, así como de proteínas: PPAR γ 1 se expresa en músculo, hígado y riñón, PPAR γ 2 se expresa en el tejido adiposo blanco y pardo, y en menor grado en riñón y músculo esquelético (en ratones y humanos) y PPAR γ 3 se expresa en el tejido adiposo blanco, en el colón y en macrófagos (Braissant O y col., 1996; Fajas L y col., 1998).

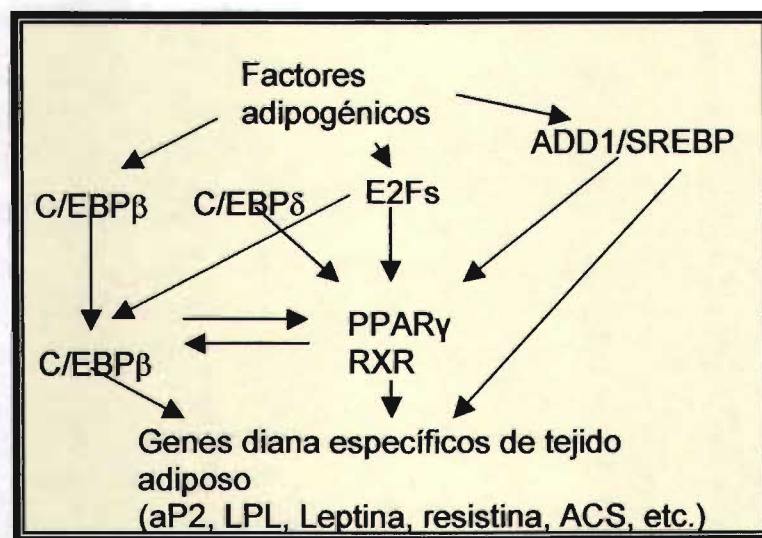


Figura 5. Factores reguladores de la expresión de PPAR γ .

Se han generado ratones J1 de la línea ES knockout para PPAR γ y se encontró que el homocigoto -/- de PPAR γ es letal, mientras que el ratón heterocigoto +/- tiene un buen control de la glucosa y del peso corporal aún en condiciones de dieta rica en carbohidratos y lípidos, en comparación con los ratones silvestres. A diferencia de los animales con inactivación de uno de los alelos de PPAR γ , los animales silvestres desarrollan obesidad y presentan resistencia periférica a la insulina con dietas ricas en carbohidratos (Schoonjans K y col., 2000).

Debido a que dentro de los ligandos naturales para PPAR γ se incluyen los ácidos grasos, Jian'an y colaboradores estudiaron la posible asociación entre una variante común (Pro12Ala) de este gen y el tipo de grasa consumida en una población caucásica. Estos investigadores encontraron una asociación entre el patrón dietético y el efecto de esta variante común (interacción entre el gen y el ambiente). Encontraron que en el grupo de individuos con dieta rica en ácidos grasos saturados; los que portan el alelo Ala12 presentaron un índice de masa corporal mayor que los individuos homocigotos Pro12. Sin embargo, dentro del grupo de individuos con dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados se encontró que los individuos que portan el alelo Ala12 presentaron un índice de masa corporal menor en comparación con los homocigotos Pro12 (Jian'an y col., 2001). Estos resultados sugieren que los efectos de esta variante en el fenotipo puede ser modificado en gran medida debido al tipo de dieta que consuma el individuo, y probablemente la inconsistencias de los resultados en distintos de estudios en relación a la asociación de este polimorfismo con fenotipos específicos, puedan deberse en parte a ésta interacción.

3.9 Proteína PPAR γ .

De manera general, los receptores nucleares tienen una estructura modular común con diferentes dominios funcionales que incluye un dominio amino terminal menos conservado, un dominio central de unión a DNA (DBD), y un dominio de unión a ligando (LBD) en el carboxilo terminal (Gearing KL y col., 1994; Laudet V y col., 1992).

En la mayoría de los receptores nucleares existen dos formas de activar la función, una independiente de ligando, localizado en el dominio amino terminal (AF-1) y una forma de activación dependiente de ligando llamado AF-2, ubicado en el dominio de unión a ligando. Cuando los receptores nucleares no se encuentran unidos a un ligando están formando complejos con correpresores, así como NcoR y SMRT (Horwitz KB y col., 1996; Zamir I y col., 1997). La unión de un ligando da como resultado un cambio conformacional en AF-2 que es seguido de la disociación de correpresores permitiendo el reclutamiento de complejos coactivadores facilitando la transcripción de genes blancos (DiRenzo J, y col., 1997).

La especificidad de los complejos correguladores depende de varios factores como la naturaleza del ligando, la región promotora, además del ambiente celular, esta especificidad es responsable de la respuesta fisiológica a la interacción particular receptor-ligando (Nolte RT, 1998; Glass CK, 2000).

Los PPARs como otros receptores nucleares son activados primero mediante la formación de un heterodímero con el receptor de ácido 9-cis retinoico (RXR), este complejo heterodimérico puede ser activado sinérgicamente por agonistas por ejemplo de PPAR γ como las tiazolidinadionas utilizados en el tratamiento de la DMT2, y ligandos específicos de RXR (Mukherjee R y col., 1997) que posteriormente se une a los elementos de respuesta para PPARs (PPRE), los cuales presentan la secuencia consenso AGGTCA localizada en la región promotora de los genes blanco.

Después que se recluta el complejo de coactivadores, como el SRC-1 (Coactivador del receptor de esteroides-1), PGC-1 α (Coactivador de PPAR γ 1 α , TIF-2 (factor transcripcional intermediario -2), y el SRC-3 (Coactivador del receptor de esteroides-3), estos dan la especificidad de la respuesta.

Hay tres tipos de PPARs; PPAR-alfa (PPAR α), PPAR-delta (PPAR δ) y PPAR-gamma (PPAR γ). En 1990 Isseman y Green identificaron el primer PPAR, el PPAR α , los ligandos de esta isoforma causan proliferación de los peroxisomas celulares en roedores y aunque esto no se ve en humanos, el nombre del gen permanece. PPAR α ha mostrado activar un número de genes que controlan la oxidación de los ácidos grasos (Isseman and Green,1990). Los PPAR β/δ y PPAR γ fueron clonados e identificados como reguladores de la expresión de otros genes (Dreyer y col., 1992; Schmidt y col., 1992). Ibrahimi y col en 1994 encontraron evidencia de que PPAR γ actúa como receptor de las drogas TZDs (Saltiel AR y col., 1996; Spiegelman BM., 1998).

A diferencia de los receptores nucleares con ligandos conocidos, existe un grupo de receptores considerados como "receptores huérfanos" ya que no se ha identificado el ligando endógeno (Giguere V, 1999). Para varios de estos receptores huérfanos, como los PPARs se han diseñado ligandos sintéticos.

PPAR γ es la isoforma de PPAR que se ha estudiado más intensamente (Laudet y col., 2002). Se ha sugerido la participación de este receptor en varias enfermedades de gran interés como, la diabetes tipo 2, la aterosclerosis, el cáncer y la obesidad.

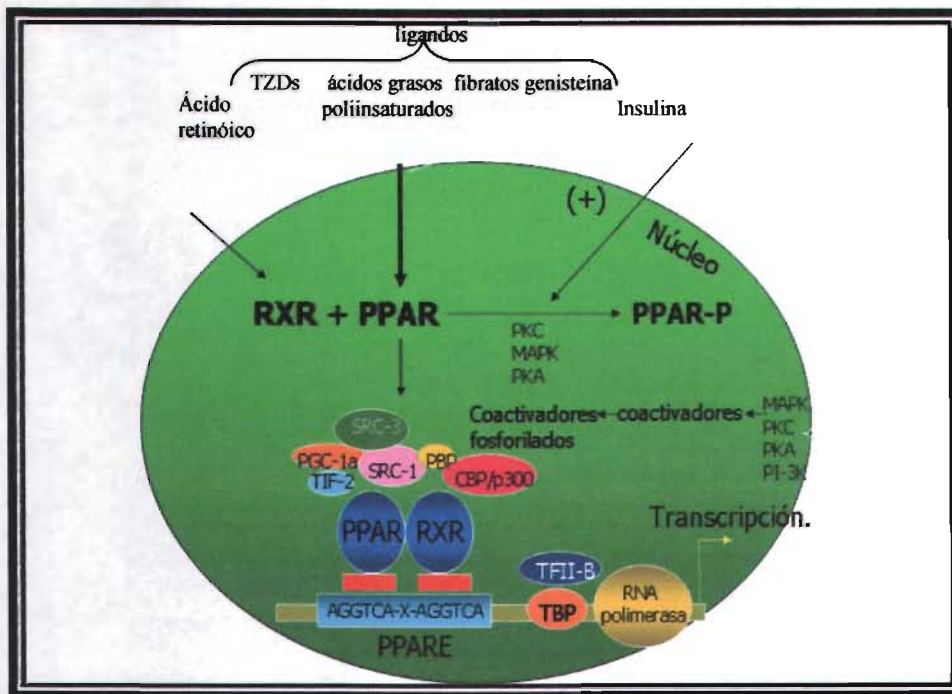


Figura 6. Reguladores de la actividad de los PPARs.

De manera similar a otros receptores nucleares la estructura de la proteína PPAR γ consiste de un dominio central de unión a DNA, un dominio de activación en el amino terminal, y un dominio de unión a ligando en el extremo carboxilo terminal (Kroslewski AS y col., 1986; Auwerx J y col., 1999). Esta proteína está involucrada en el metabolismo de la glucosa y los lípidos, el transporte de los ácidos grasos, y la diferenciación celular (Scott L y col., 2000). El PPAR γ se expresa en los tejidos diana de la insulina y su activación regula el metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos (Olefsky JM y col., 2000).

En el humano, existen dos isoformas de proteínas PPAR γ ; PPAR γ 1 y PPAR γ 2. La isoforma PPAR γ 2 contiene 28 aminoácidos adicionales en el extremo NH₂ comparado con PPAR γ 1 (Tontonoz P y col., 1994; Spiegelman BM y col., 1998; Elbrecht A y col., 1996). Muchos tejidos expresan niveles bajos de PPAR γ 1, mientras que PPAR γ 2 se expresa predominantemente en tejido adiposo, donde sus niveles de expresión son elevados. Ambas isoformas (PPAR- γ 1 y PPAR- γ 2) son expresados en el tejido adiposo. (Spiegelman BM y col., 1998; Vidal-Puig AJ y col., 1997; Auboeuf D y col., 1997; Lefebvre A y col., 1998) En este tejido, no

parece haber ninguna diferencia en las capacidad transcripcional de las dos isoformas en la expresión de genes blancos inducidos por ligandos o en la diferenciación del adipocito inducido por ligando (Werman A y col., 1997).

Se ha demostrado que PPAR γ es capaz de activar la transcripción en forma no dependiente del ligando y que la insulina potencia esta actividad (Werman A y col., 1997). Además, que para esta actividad, la isoforma γ 2 es mucho más potente que la isoforma γ 1, haciendo pensar en un posible papel distinto para PPAR- γ 2 en la obesidad, la resistencia a la insulina, y la diabetes (Werman A y col., 1997).

Con el objetivo de disminuir la resistencia a la insulina se desarrollaron ligandos artificiales de PPAR γ como son las tiazolidinadionas (TZDs), utilizados para el tratamiento en la DMT2 (Lehmann JM y col., 1995; Saltiel AR y col., 1996). La troglitazona fue el primero de estos fármacos, aunque resultó muy tóxico en humanos. Posteriormente se desarrollaron dos ligandos análogos la rosiglitazona y la pioglitazona.

4. ANTECEDENTES

4.1 Papel de PPAR γ en la DMT2

La evidencia de asociación de PPAR γ con la diabetes mellitus está enfocada a la acción de la insulina en las células blanco, ya que primeramente se descubrió que las TZDs tienen acción en la sensibilidad a la insulina, en modelos roedores y después fue confirmado este hecho en humanos.

Posteriormente se reportó que las TZDs funcionan como ligandos selectivos con alta afinidad de PPAR γ (Lehmann y col., 1995). Asimismo, se encontró que la potencia de activación in vitro del receptor está relacionada directamente con la actividad para disminuir los niveles de glucosa sanguínea in vivo.

Los resultados de un estudio en ratones, han sugerido que tanto los alelos Pro12 como Ala12, actúan de manera diferente para favorecer la disminución de la resistencia a la insulina. Se observó que cuando hay un estímulo de TZDs con la presencia del alelo Pro12 se incrementa el número de adipocitos y asimismo la captura de triacilglicerol por los nuevos adipocitos, reduciendo con esto los niveles de triacilglicerol en el hígado y el músculo; disminuyendo así la resistencia a la insulina. Por otro lado, se encontró que con la presencia del alelo Ala12 se disminuyó el contenido de triglicéridos en el tejido adiposo, el músculo esquelético e hígado, mostrándose una reducción de la resistencia a la insulina (Yamauchi y col., 2001^a; Watkins y col., 1998).

4.2 Variantes de PPAR γ 2 asociadas al desarrollo de la DMT2 y otras patologías

Distintos estudios reportan asociación de variantes raras del gen de PPAR γ con fenotipos como la resistencia a la insulina, la diabetes y la obesidad. Se ha encontrado que la variante P115Q se asocia con obesidad en población alemana (Ristow y col., 1998), mientras que las variantes V290M y P467L se han asociados con resistencia severa a la insulina y el desarrollo de diabetes en la población caucásica (Barroso y col., 1999).

Potencialmente más importante es el papel del polimorfismo común Pro12Ala de PPAR γ , antes mencionado, identificado por primera vez por Yen y colaboradores en 1997. Este SNP (polimorfismo de un solo nucleótido) predice la sustitución del amino ácido 12 de prolina por el de alanina, secuencia presente en el gen humano y del ratón y específicamente en la isoforma PPAR γ 2 (Yen C-J y col., 1997). Este aminoácido está dentro del dominio de PPAR- γ 2 involucrada en la activación independiente de ligando (Werman A y col., 1997).

La frecuencia alélica del alelo Ala12 es muy variable en distintos grupos étnicos: en Caucásicos es del 12%, en Americanos nativos 10%, en Samoanos 8%, en Japoneses 4%, en Africoamericanos 3% y en Chinos de 1% (Vigouroux C y col., 1998, Mori H y col., 2001). Auwerx y colaboradores demostraron que este polimorfismo tiene un efecto funcional, reduciendo la actividad transcripcional de la proteína, (Ribon V y col., 1998). Estudios in vitro muestran que el alelo Ala12 de PPAR γ tiene disminuida la afinidad de unión al elemento promotor de PPAR y por ende, la capacidad de transactivación in vitro (Deeb SS y col., 1998). El alelo Ala12 se ha asociado también con la reducción de la adipogénesis inducida por TZD (Masugi J y col., 2000). El PPAR γ mejora la señalización de la insulina por las tiazolidinadonas (TZD) que actúan como ligandos (Ribon V y col., 1998), por lo tanto se sugiere que los portadores del alelo Ala12 tienen una respuesta disminuida a la acción de estas drogas.

La asociación de este polimorfismo (Pro12Ala) con fallas metabólicas como la resistencia a la insulina, la obesidad y DMT2 ha sido controversial, los resultados obtenidos de las distintas poblaciones donde se han llevado a cabo estos estudios

no han sido reproducibles en todos los casos (Deeb SS y col., 1998; Altshuler D y col., 2000; Hegele RA y col., 2000; Lei HH y col., 2000; Li WD y col., 2000).

Alelo	Tipo de alelo	Fenotipo	Población	Referencia
Pro12	Riesgo	DMT2	Japonesa	Deeb S S y col., 1998
Pro12	Riesgo	DMT2	Caucásica	Altshuler D y col., 2000
Ala12	Protección	Obesidad	Indios Pima	Muller y col., 2003
Ala12	Riesgo	DMT2	Caucásica	Hegele y col., 2000
Ala12	Riesgo	Obesidad	Taiwanesa	Lei HH y col., 2000
Ala12	Riesgo	Obesidad	Japonesa	Li WD y col., 2000
Ala12	Riesgo	Obesidad	Caucásica	Hasstedt y col., 2001
Ala12	Riesgo	Obesidad	Japonesa	Mori y col., 1998
Ala12	Riesgo	Obesidad	Caucásica	Ek y col., 1999

Tabla 3. Estudios de asociación del polimorfismo Pro12Ala con la presencia de DMT2 y Obesidad.

En un estudio realizado en la población japonesa y la finlandesa se encontró al alelo Pro12 asociado con la disminución de la sensibilidad a la insulina, la obesidad y la DMT2 (Deeb SS y col., 1998).

En un estudio en la población Caucásica el alelo Pro12 se asoció significativamente con el riesgo al desarrollo de DMT2 (Altshuler D y col., 2000).

Por otro lado, en un estudio realizado en Indios Pima (985 individuos) se encontró que el polimorfismo Pro12Ala y un SNP particular (C-2821T) que se encuentra en la región reguladora en un sitio de unión a δ EF1 cerca del sitio de inicio transcripcional del gen de PPAR γ 2, no se asociaron con diabetes, sin embargo si se demostró asociación con un menor índice de masa corporal. El SNP de la región reguladora tiene diferente frecuencia alélica comparado con la variante Pro12Ala (0.56 y 0.93 respectivamente). Sin embargo, en Indios Pima, los dos SNPs se encuentran en desequilibrio de ligamiento y por consiguiente es difícil saber si uno o ambos participan en el desarrollo del fenotipo con un efecto aditivo o independiente. Se propone que el SNP Pro12Ala altera la actividad de transactivación y el SNP C-2821T podría alterar la transcripción del gen (Muller YL y col., 2003).

Existen estudios en donde no se encontró asociación del alelo Ala12 con la obesidad (Mori Y y col.,1998; Ek J y col., 1999; Koch M y col.,1999; Evans D y col., 2000; Pihlajamaki J y col., 2000; Swarbrick MM y col.,2001) ni con la DMT2 en población caucásica (Beamer BA y col., 1998; Mancini FP y col., 1999).

Más interesante aún, existen estudios donde se reporta al alelo Ala12 como alelo de riesgo a la obesidad y DMT2. Por ejemplo, en un estudio realizado en la población Oji-Cree el polimorfismo Ala12 de PPAR γ fue asociado con una edad mas temprana de inicio de la DMT2 (Hegele RA y col., 2000). Por su parte, la presencia del alelo Ala12 de PPAR γ se encontró asociado a obesidad en algunos estudios (Lei HH y col., 2000; Li WD y col., 2000; Hasstedt SJ y col., 2001; Mori Y y col.,1998; Ek J y col., 1999).

4.3 Papel de PPAR γ en la nefropatía diabética

Las tres isoformas de los receptores nucleares PPARs son expresadas en el riñón de varias especies estudiadas (rata, conejo) incluyendo el humano (Guan Y y col., 1997; Yang T y col., 1999; Braissant O y col., 1998).

Los hallazgos sugieren que PPAR α se expresa de forma predominante en el túbulo proximal (Ouani F y col., 1998), PPAR β se expresa escasamente en todos los segmentos de la nefrona, mientras que PPAR γ se limita a túbulos colectores (Guan Y y col., 1997; Kimura H y col., 1999).

En otro estudio se realizó la búsqueda de la expresión de PPAR γ en el riñón (de conejo) tratado con troglitazona (TZD), donde se demostró la expresión de PPAR γ en células glomerulares mediante la técnica de hibridación in situ. Se observó que el tratamiento con troglitazona mediante el receptor nuclear PPAR γ , aumentó la expresión de A-FABP (conocido como aP2) en adipocitos prerrenales, parénquima renal. En la corteza renal se encontró RNAm de A-FABP sólo en el glomérulo (Guan Y y col., 2001).

La proteína A-FABP pertenece a una familia de proteínas llamadas proteínas de unión a lípidos intracelular (iLBPs) y su función está asociado al transporte y al almacenamiento de los ácidos grasos (Reese WA y col., 1999; Storch J y col., 2000). Se ha observado que estas proteínas de unión a ácidos grasos actúan como factores de diferenciación en células epiteliales de músculo y mama (Rump R y col., 1996; Specht B y col., 1996; Yang Y y col., 1994). La troglitazona en bajas concentraciones induce la expresión de A-FABP que corresponde a la inhibición del crecimiento del cultivo mesangial; por lo cual se sugiere que existe actividad constitutiva de PPAR γ en glomérulo renal (Guan Y y col., 2001).

Por otro lado, cuando las células mesangiales del riñón de pacientes con DMT2 son estimuladas con concentración alta de glucosa, estas células pueden sufrir un proceso de activación desde un fenotipo inmóvil a un fenotipo proliferativo de miofibroblastos, caracterizado por un incremento de la expresión de actina α de músculo liso y citocinas proinflamatorias, así como el favorecimiento de la

producción de las proteínas de la matriz extracelular (Makino y col., 1995; Jonson RJ y col., 1991). Sin embargo, en un estudio se observó que al ser activado PPAR γ se disminuye la expresión de α actina de músculo liso en cultivo de células mesangiales de ratas (Asano T y col., 2000).

En un estudio reportado en 1998 se encontró que las TZDs mejoran la microalbuminuria en pacientes con ND temprana (Imano E y col., 1998). En otro estudio se encontró que las TZDs inhiben la expresión del inhibidor I del activador del plasminógeno inducido por la angiotensina II, los cuales participan en el desarrollo de la ND (Nicholas SB y col., 2001).

En modelos animales (ratas) con diabetes se ha observado que los ligandos de PPAR γ troglitazona, pioglitazona y la rosiglitazona, disminuyen la proteinuria y detienen la progresión mesangial, reduciendo la expresión de proteínas de la matriz extracelular (fibronectina y colágeno tipo IV) y TGF- β 1 en glomérulo y túbulos renales (Yoshimoto T y col., 1997; Fujii M y col., 1997; Imano E y col., 1998; McCarthy KJ y col., 2000; Buckingham RE y col., 1998). Además, Se ha sugerido que PPAR γ podría estar desempeñando un papel importante en la inflamación renal ya que se ha observado que junto con PPAR α tienen un efecto antiinflamatorio en macrófagos (Ricote M y col., 1998; Jiang C y col., 1998).

4.4 La variante PPAR γ 2 y la nefropatía diabética

El primer trabajo donde se estudio el posible papel del polimorfismo Pro12Ala de PPAR γ 2 en la ND se basó en una estrategia caso-control en pacientes japoneses con DMT2 donde no se encontró asociación. Posteriormente en agosto del 2002 Herrman y colaboradores reportaron un estudio de asociación entre este polimorfismo y la presencia de nefropatía diabética en la población caucásica. Estos investigadores encontraron que los pacientes que portan el alelo Ala12 tenían un valor significativamente más bajo de microalbuminuria, por lo que sugirieron que probablemente existía un efecto de protección del alelo Ala12 en relación con la nefropatía diabética.

Más recientemente, se reportó un estudio realizado en población brasileña (Caramori y col., 2003). Este grupo estudió 212 pacientes diabéticos con nefropatía diabética y 104 pacientes diabéticos con tiempo de evolución ≥ 10 años sin presencia de nefropatía y encontraron que los pacientes con DMT2 portadores del alelo Ala12 tienen un menor riesgo de desarrollar nefropatía diabética con un OR de 0.465 (95% CI 0.229-0.945; $p=0.034$).

4.5 Secuencias Alu y su aplicación como marcadores poblacionales

Existen secuencias repetidas en el genoma humano que pueden ser utilizadas como marcadores poblacionales. Los elementos repetitivos pueden ser divididos en elementos fijos (por ejemplo, microsatélites, minisatélites) o elementos dispersos (elementos móviles y pseudogenes procesados).

Los elementos dispersos pueden ser subdivididos en base a su tamaño, los elementos cortos (short interspersed elements, SINEs) son de menos de 500 pb de longitud (Okada N y col., 1991; Schmid CW y col., 1996; Smit AF y col., 1999). Los elementos móviles en general son muy abundantes y representan alrededor del 45% del genoma humano. Todos los genomas eucariontes contienen elementos móviles.

Los elementos Alu tienen en promedio de 300 pb y son los más abundantes de los SINEs y por lo tanto los elementos dispersos más abundantes en el genoma humano (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001).

El nombre de Alu se debe a que estos elementos contienen un sitio de corte para la enzima de restricción Alu1 (Houck CM y col., 1979). El origen y la amplificación de estos elementos son eventos que ocurrieron hace aproximadamente 65 millones de años. El análisis de secuencia sugiere que los elementos Alu derivan del gen 7SL RNA, que forma parte del complejo ribosomal (Ullu E y col., 1984).

Los elementos Alu son polimórficos (existen alelos de distintas longitudes), esta característica es de gran utilidad para el estudio de genética poblacional y genómica comparativa de primates, debido a que son marcadores genéticos capaces de identificar la descendencia ancestral.

En un estudio de la respuesta a drogas antiepilépticas publicado en el 2003, se emplearon 9 marcadores Alu, considerando su heterocigocidad y su localización en el genoma, para evaluar la posible estratificación de las poblaciones en estudio (Asra S. y col., 2003).

La estratificación poblacional se refiere a diferencias significativas en la frecuencia alélica entre los casos y controles en un estudio de asociación debido a la diferencia en la composición étnica de los grupos comparados y no a una asociación real de un determinado gen con la enfermedad, dando lugar a un resultado falso positivo.

Por lo anterior, el evaluar la presencia de estratificación poblacional en un estudio entre el grupo caso y el grupo control es fundamental, particularmente en poblaciones étnicamente heterogéneas como es la población mexicana.

5. JUSTIFICACION

La incidencia de la falla renal terminal como consecuencia de la nefropatía diabética se está incrementando rápidamente en todo el mundo, por consiguiente, es importante identificar los factores de riesgo que contribuyen no sólo al desarrollo de la DMT2 sino a las complicaciones relacionadas. La identificación de estos factores puede contribuir al diseño de mejores medidas de prevención, diagnóstico y tratamiento.

6. HIPOTESIS

El polimorfismo de Pro12Ala en el gen PPAR γ está relacionado al desarrollo de nefropatía en pacientes con diabetes mellitus de la población mexicana.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

- Determinar si el polimorfismo Pro12Ala de PPAR γ 2 participa en el desarrollo de la nefropatía en pacientes con DMT2 en una muestra de la población mexicana.

7.2 Objetivos particulares

- Identificar y captar la población de estudio bajo los criterios establecidos.
- Tipificar el polimorfismo Pro12Ala de PPAR γ 2 en los distintos grupos de estudio.
- Determinar si las frecuencias alélicas se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg en los distintos grupos de estudio.
- Determinar si existe asociación entre la presencia de este polimorfismo y la nefropatía diabética.
- Determinar mediante la tipificación de un marcador Alu si existe estratificación entre los grupos estudiados.

8. MATERIALES Y METODO

8.1 Criterios de inclusión

Se captaron tres distintos grupos de estudio:

- a) 113 pacientes con DMT2 y valores de creatinina sérica ≥ 2 mg/dL.
- b) 157 individuos normoglicémicos no relacionados.
- c) 50 pacientes con DMT2 con 10 años o más de evolución y sin evidencia de daño renal.

8.2 Criterios de exclusión

- Pacientes que no aceptaron participar en el estudio.
- Pacientes con antecedentes de lesiones en el aparato urológico provocadas por traumatismos o procesos infecciosos.

8.3 Extracción de DNA

El aislamiento del DNA se realizó por medio de lisis hipotónica de eritrocitos a partir de sangre total por digestión del botón linfocitario con proteinasa K, seguido por extracción con fenol-cloroformo. Para ello, se homogenizó por 30 segundos y se centrifugó a 12, 000 rpm durante 2 min. Se obtuvo la fase acuosa en un nuevo tubo y se le adicionó etanol frío al 100%. Se incubó a -20°C toda la noche y se centrifugó a 12,000 rpm durante 2min.

Se decantó todo el sobrenadante y al pellet se le agregó $180\mu\text{l}$ de buffer TE y se incubó a 55°C por 10 min, se adicionaron $20\mu\text{l}$ de NaCl 5M y se mezcló vigorosamente antes de agregar 1 ml de etanol absoluto frío. Se mezcló y centrifugó por 1 min a 12,000 rpm, se decantó el sobrenadante y el pellet se lavó con 1 ml de etanol al 80%, se centrifugó a 12,000 rpm durante 1min. Se decantó el sobrenadante y el paquete de DNA se secó en un aparato de speedvac por 20 min.

Finalmente el pellet se resuspendió en $200\mu\text{l}$ de buffer TE y se incubó a 55°C toda la noche agitándose periódicamente para disolver el DNA. Para determinar la concentración de DNA se realizó una dilución 1:250 que se leyó en un espectrofotómetro a una absorbencia de 260 nm.

8.4 Amplificación de la región de interés del gen PPAR γ a través de PCR.

Se amplificó a partir de DNA genómico un fragmento de 270 pb del gen PPAR γ 2 abarcando el sitio del polimorfismo mediante PCR usando el primer (upstream) 5' -GCCAATTCAAGCCCAGTC-3' y el primer (downstream) 5'-GATATGTTTGCAGACAGTGTATCAGTGAAGGAATCGCTTTCCG-3' el cual introduce un sitio de restricción (CGIICG) para la enzima BstU-I cuando esta presente la sustitución de citosina por guanina en el nucleótido 34. La reacción se llevo a cabo en presencia de 1.5mM de cloruro de Magnesio, y con una temperatura de alineamiento de 60°C (Yen y col., 1997).

8.5 Análisis de restricción para la identificación del polimorfismo en forma homocigota o heterocigota

Se digirieron cinco μ L del producto de PCR con 1 unidad de enzima BstU-I (0.5 μ L), dos microlitros de buffer de enzima al 1X, 5, y agua para completar 20 μ L (13.5 μ L) de mezcla de reacción, y se incubó durante 2 h a 37°C. El producto de la digestión se corrió en electroforesis en un gel de acrilamida al 8% teñido con bromuro de etidio, y posteriormente se observó con luz ultravioleta. Los pesos de los productos esperados después de la digestión con BstU-I fueron: 1) 270 pb del homocigoto normal, 2) 227 pb y de 43 pb del homocigoto Pro12Ala, y 3) de 270 pb, de 227 pb y de 43 pb de los heterocigotos.

8.6 Secuenciación automatizada

Para confirmar la genotipificación, se secuenciaron al azar distintos productos de PCR asignados con distintos genotipos por RFLP, utilizando el kit de secuenciación Big Dye (Perkin Elmer) y un secuenciador automatizado ABI PRISM 3100.

8.7 Genotipificación del marcador Alu Yc1RG68

A partir de DNA genómico se amplificó el marcador Alu Yc1RG68. Este es un marcador bialélico donde sus productos de amplificación tienen los siguientes tamaños; 166pb y 488pb. El corrimiento de los productos de amplificación se realizó en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio, y la asignación de alelos se hizo directamente exponiendo el gel a un transiluminador de luz UV.

9. RESULTADOS

GENOTIPIFICACIÓN DE Pro12Ala EN LOS PACIENTES CON NEFROPATÍA DIABÉTICA

Se realizó la genotipificación del polimorfismo Pro12Ala en 113 pacientes diabéticos con nefropatía, amplificando la región de interés (Exón B). Las fotografías representativas de los geles se muestran en la figura 6.

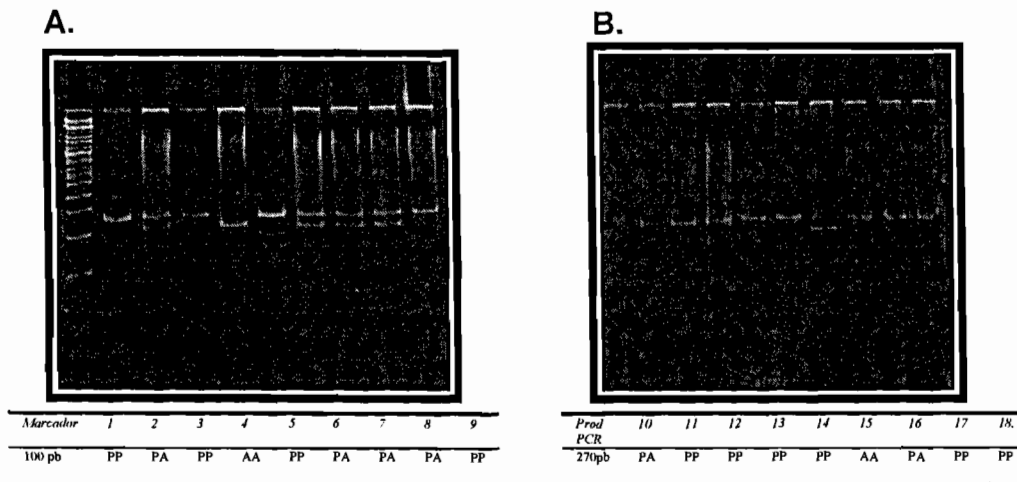


Figura 7. Las fotografías A y B son corrimientos de muestras de producto de digestión de pacientes con nefropatía diabética en geles de acrilamida al 8%.

GENOTIPIFICACIÓN DE Pro12Ala EN LOS INDIVIDUOS NORMOGLICEMICOS

Asimismo se genotificaron 157 individuos normoglicémicos que conformaron el grupo de control sanos.

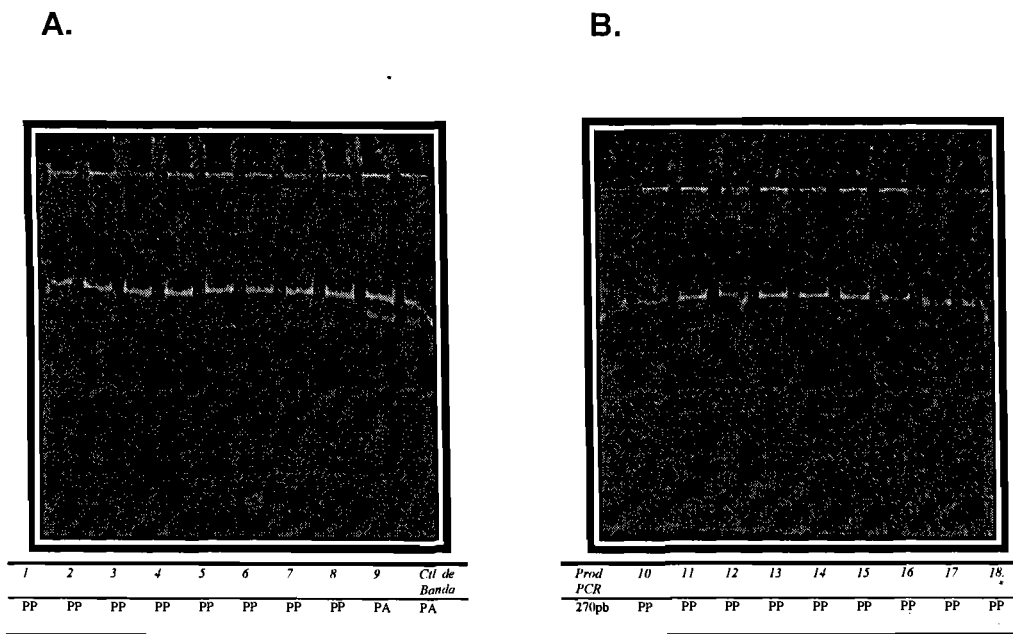
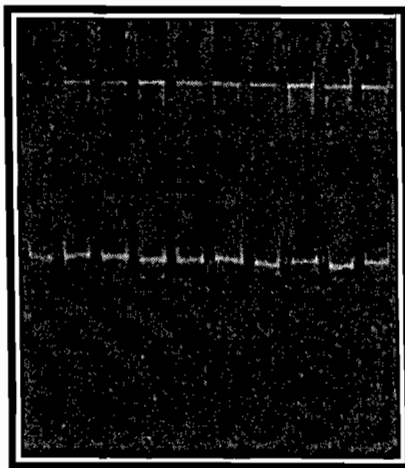


Figura 8. Las fotografías A y B son corrimientos de muestras de producto de digestión de los individuos del grupo de controles normoglicémicos en geles de acrilamida al 8%.

GENOTIPIFICACIÓN DE Pro12Ala EN LOS PACIENTES DIABÉTICOS SIN EVIDENCIA DE NEFROPATIA

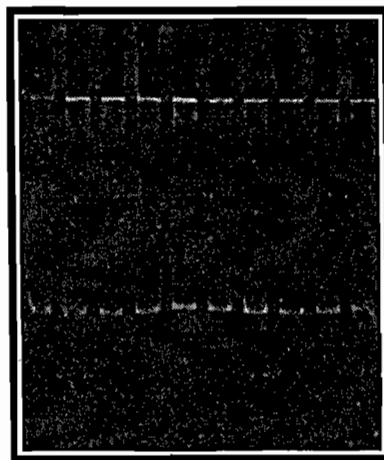
Posteriormente se genotipificaron 50 individuos con diagnóstico de DMT2, con más de 10 años de evolución y sin daño renal.

E.



Prod PCR	2	3	4	5	6	7	8	9	10.
270pb	PP	PP	PA	PP	PP	PP	PP	PP	PA

F.



Prod PCR	2	3	4	5	6	7	8	9	10
270pb	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP

Figura 9. Las fotografías A y B son corrimientos de muestras de producto de digestión de individuos del grupo de controles nefropatas en geles de acrilamida al 8%.

GENOTIPIFICACIÓN DE LOS INDIVIDUOS EN ESTUDIO

La tabla 4, muestra la frecuencia genotípica y alélica obtenida en los distintos grupos de estudio.

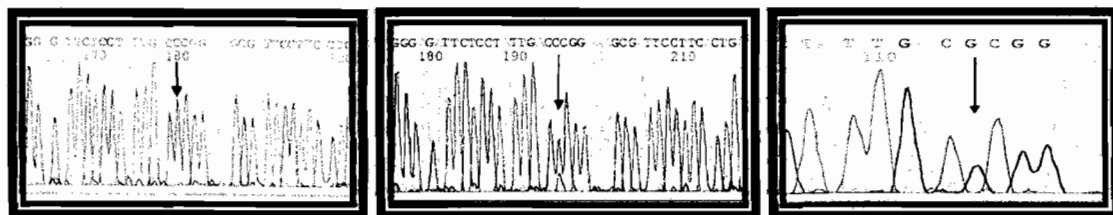
	Casos ND (n=113)	Ctl Normoglicémicos (n=157)	Ctl Diabéticos (n=50)
P12	195 (86.3%)	283 (90.1%)	91 (91.0%)
A12	31 (13.7%)	31 (9.9%)	9 (9.0%)
PP	88 (77.9%)	126 (80.3%)	41 (82.0%)
PA	19 (16.8%)	31 (19.7%)	9 (18.0%)
AA	6 (5.3%)	0 (0 %)	0 (0 %)

Tabla 4. La frecuencia genotípica y alélica de los grupos en estudio por RFLP mediante la restricción de la enzima BstU-I.

CONFIRMACIÓN DE LA GENOTIPIFICACIÓN POR RESTRICCIÓN CON LA ENZIMA BstU-I

La genotipificación obtenida por el análisis de RLFP se confirmó por secuenciación directa en los seis individuos homocigotos para el alelo Ala12, en dos individuos homocigotos Pro12 y dos individuos heterocigotos. Los electroferogramas representativos se muestran en la figura 9.

La frecuencia del alelo Pro12 identificada en los individuos normoglicémicos no relacionados de la población mexicana (90%) es una de las más altas reportadas hasta ahora en la literatura (Vigouroux C y col., 1998, Mori H y col., 2001).



A. Individuo homocigoto CC (Pro12Pro).

B. Individuo heterocigoto CG (Pro12Ala).

C. Individuo homocigoto GG (Ala12Ala).

Figura 10. Electroferogramas de individuos genotipificados por PCR y RFLP.

ANÁLISIS DEL EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG DEL GRUPO DE PACIENTES NEFRÓPATAS DIABÉTICOS

Se obtuvieron las frecuencias alélicas y se realizó el análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg, en los grupos de estudio.

<i>Frec. Alélicas</i>	<i>PP</i>	<i>PA</i>	<i>AA</i>	<i>P</i>
Esperado	0.731	0.248	0.021	
Observado	0.772	0.167	0.061	0.00206*

*= Valor de p menor a 0.05.

Tabla 5. Análisis comparativo de las frecuencias esperadas con las observadas (equilibrio de Hardy-Weinberg) del grupo de pacientes nefrópatas diabéticos.

El grupo de los 113 pacientes con ND están en desequilibrio de Hardy-Weinberg, ya que hay un menor número de individuos heterocigotos y un mayor número de individuos homocigotos Ala/Ala observados en comparación con lo esperado (Tabla 5).

ANÁLISIS DEL EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG DEL GRUPO DE CONTROLES NORMOGLICÉMICOS

Los dos grupos control están en equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 6 y 7).

<i>Frec. Alélica</i>	<i>PP</i>	<i>PA</i>	<i>AA</i>	<i>P</i>
Esperado	0.802	0.187	0.011	
Observado	0.797	0.196	0.006	0.5111

*= Valor de p menor a 0.05.

Tabla 6. Análisis comparativo de las frecuencias esperadas con las observadas (equilibrio de Hardy-Weinberg) del grupo control con nefropatía.

ANÁLISIS DEL EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG DEL GRUPO DE CONTROLES DIABÉTICOS

<i>Frec. Alélica</i>	<i>PP</i>	<i>PA</i>	<i>AA</i>	<i>P</i>
Esperado	0.795	0.192	0.012	
Observado	0.804	0.175	0.020	0.5811

*= Valor de p menor a 0.05.

Tabla 7. Análisis comparativo de las frecuencias esperadas con las observadas (equilibrio de Hardy-Weinberg) del grupo de pacientes diabéticos sin nefropatía.

Estudio de asociación del polimorfismo Pro12Ala del gen de PPAR γ del grupo de pacientes nefrópatas diabéticos en comparación con el grupo de individuos normoglicémicos

Para determinar si este polimorfismo participa en el desarrollo de la nefropatía diabética; se analizó la asociación de la presencia de prolina y alanina en forma homocigota y heterocigota en pacientes con nefropatía diabética con respecto a los grupos controles por separados.

	ND T2DM (n=113)	Control normoglicémicos (n=157)	OR	P
PP	88 (77.9%)	126 (80.3%)	0.87	0.634
PA	19 (16.8%)	31 (19.7%)	0.82	0.541
AA	6 (5.3%)	0 (0%)	10.27	0.008*
PP+PA	107(94.7%)	157 (100%)	0.09	0.008*
PA+AA	25 (22.1%)	31 (19.7%)	1.15	0.634

OR= odd ratio *= Valor de p menor a 0.05.

Tabla 8. Análisis de los Alelos Alanina y Prolina del gen de PPAR γ en el grupo de los pacientes con nefropatía diabética vs. grupo control normoglicémicos.

En el análisis de asociación del grupo de pacientes con nefropatía diabética, comparado con el grupo de controles normoglicémicos, los resultados muestran que el grupo de pacientes con el alelo Pro12 de forma homocigota y heterocigota (PP y PA) muestran protección contra el desarrollo de nefropatía diabética; mientras que el alelo Ala12 en forma homocigota parece conferir riesgo (genotipo AA).

Estudio de asociación del polimorfismo Pro12Ala del gen de PPAR γ del grupo de pacientes nefrópatas diabéticos en comparación con el grupo de diabétes sin nefropatía

Si se compara el grupo de diabetes y nefropatía con el grupo pacientes con diabetes sin nefropatía, los resultados no muestran significancia estadística debido a que el segundo grupo tiene un número muy pequeño de individuos (50) (Tabla 9). Sin embargo es interesante que en el grupo de pacientes con diabetes sin desarrollo de nefropatía no se identificó ningún individuo homocigoto para el alelo Ala12.

	DMT2 ND (n=113)	Controles Diabéticos (n=50)	OR	p
PP	88 (77.9%)	41 (82.0%)	0.77	0.550
PA	19 (16.8%)	9 (18.0%)	0.92	0.853
AA	6 (5.3%)	0 (0%)	3.27	0.248
PP+PA	107(94.7%)	50 (100%)	0.30	0.248
PA+AA	25 (22.1%)	9 (18.0%)	1.29	0.550

OR= odd ratio * = Valor de p menor a 0.05.

Tabla 9. Análisis de los Alelos Alanina y Prolina del gen de PPAR γ en el grupo de los pacientes con nefropatía diabética vs. grupo control diabéticos.

GENOTIPIFICACIÓN DEL Alu Yc1RG68

Ya que la asociación encontrada entre el genotipo homocigoto Ala12 y la nefropatía diabética pudiera deberse a la estratificación poblacional entre los grupos estudiados se analizaron las frecuencias alélicas y genotípicas del marcador Alu Yc1RG68 localizado en el cromosoma 7. al grupo de individuos sanos no relacionados.

GENOTIPIFICACIÓN DEL Alu Yc1RG68 EN LOS PACIENTES CON NEFROPATIA DIABÉTICA

Se genotipificó el marcador Alu en 108 pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y nefropatía (Figura 11).

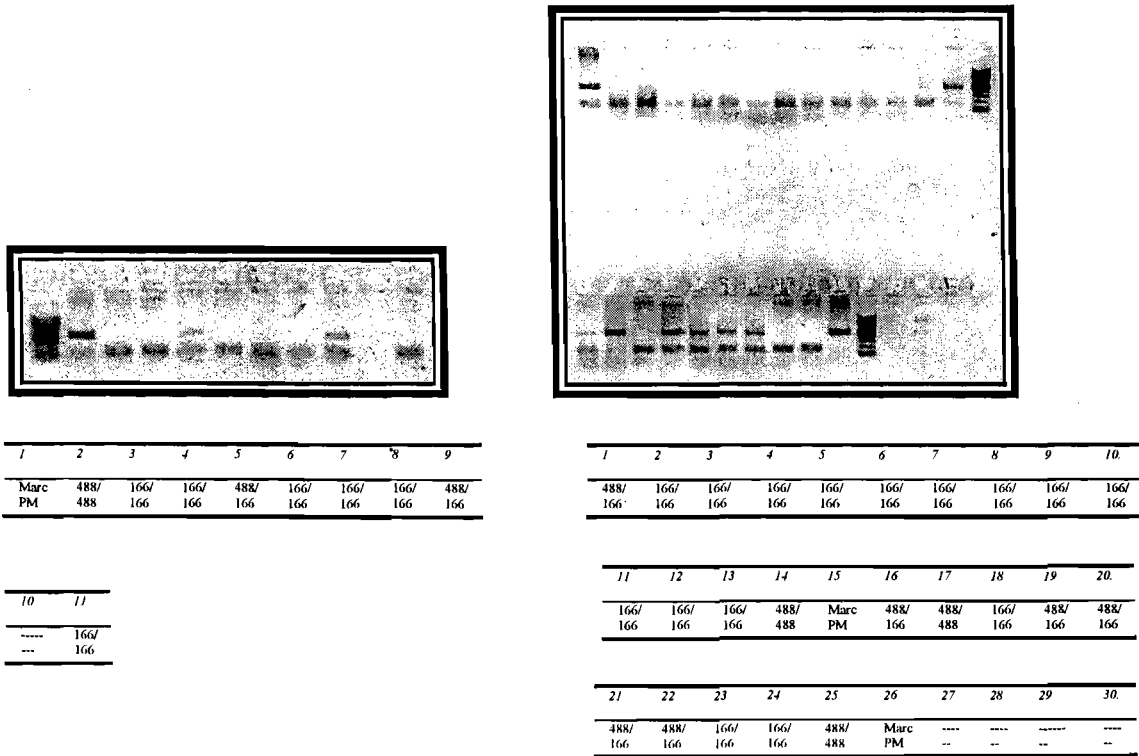


Figura 11. Las fotografías A y B son corrimientos de muestras de producto de amplificación del marcador en individuos del grupo de pacientes con nefropatía diabética en geles de agar

GENOTIPIFICACIÓN DEL Alu Yc1RG68 EN CONTROLES SANOS

La genotipificación de este marcador bialélico se realizó a 110 sujetos del grupo de normoglicémicos (Figura 12).

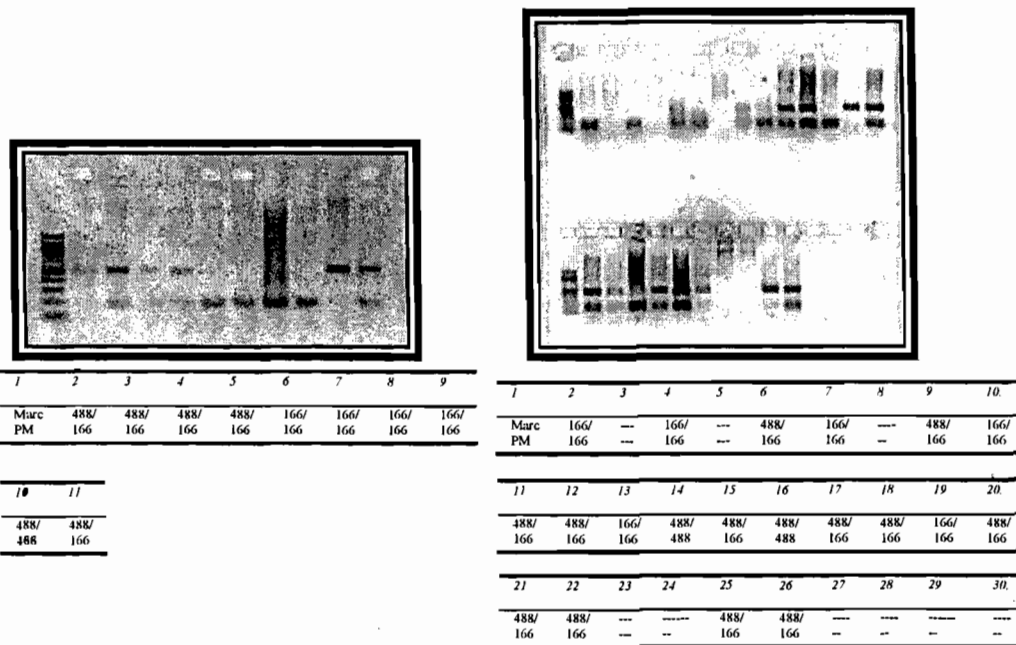


Figura 12. Las fotografías A y B son corrimientos de muestras de producto de amplificación del marcador en individuos del grupo de controles sanos en geles de agarosa al 2%.

Estudio de las frecuencias alélicas y genotípicas del marcador Yc1RG68 genotipificado en el grupo de pacientes nefrópatas diabéticos en comparación con el grupo control sanos

En el análisis de la frecuencia alélica (488pb y 166pb) y genotípica de este marcador en los pacientes con nefropatía diabética y en el grupo de individuos normoglicémicos; no se identificaron diferencias significativas entre ambos grupos (Tabla 10).

	DMT2 ND (n=108)	Sujetos normoglicémicos (n=110)	P
Alelo 488 pb	83 (38.4%)	81 (36.8%)	0.728
Alelo 166 pb	133 (61.6%)	139 (63.2%)	0.728
488/488 pb	16 (14.8%)	11 (10%)	0.280
488/166 pb	51 (47.2%)	59 (53.6%)	0.343
166/166 pb	41 (38%)	40 (36.4%)	0.806

*= Valor de p menor a 0.05.

Tabla 10. Análisis de los Alelos de tamaños 488 pb y 166 pb del gen de Yc1RG68 en el grupo de los pacientes con nefropatía diabética vs. grupo normoglicémicos.

Por lo tanto concluimos que la diferencia encontrada para el genotipo homocigoto Ala12 en el grupo de pacientes con nefropatía diabética no está relacionada a diferencias en la composición étnica entre ambos grupos.

10. DISCUSIÓN

La DMT2 representa actualmente la primera causa de morbilidad y mortalidad en México (Aguilar Salinas AJM). A pesar de que no hay datos de la prevalencia de la nefropatía diabética (ND) en nuestro país, en Estados Unidos la ND es la primera causa de enfermedad renal terminal (ADA 2002).

Si bien la ND es una de las complicaciones más frecuentes asociadas a la DM y existe la evidencia del componente genético de susceptibilidad que acompaña el desarrollo de esta complicación crónica, la mayoría de los genes y las variantes alélicas involucradas aún se desconocen.

Distintas líneas de experimentación han mostrado el papel de PPAR γ como un gen de susceptibilidad para el desarrollo de la diabetes tipo 2 y de la obesidad. Estas incluyen: a) la asociación de variantes de secuencia específicas en este gen y la presencia de diabetes, la resistencia a la insulina y la obesidad en distintas poblaciones a través de estudios de asociación caso y control (Deeb SS y col., 1998; Altshuler D y col., 2000; Muller y col., 2003; Hegele y col., 2000; Lei HH y col., 2000; Li WD y col., 2000; Hasstedt y col., 2001; Mori y col., 1998; Ek y col., 1999) b) la generación de modelos animales con la inactivación específica del gen PPAR γ (Schoonjans K y col., 2000), y c) estudios de mapeo genético donde vinculan el locus 3p25 en el cromosoma 3 asociado al desarrollo de nefropatía diabética (Borden DW y col., 1997; Imperatore G y col., 1998).

En particular el polimorfismo común Pro12Ala del gen PPAR γ ha sido asociado a riesgo para el desarrollo de DMT2 en un estudio reciente que incluyó 728 pacientes de la población caucásica (Hegele y col., 2000). Adicionalmente este polimorfismo se ha vinculado también a protección para el desarrollo de nefropatía diabética en pacientes de la población brasileña y alemana (Herrman y col., 2002; Caramori y col., 2003).

En este trabajo estudiamos la posible asociación del polimorfismo Pro12Ala en el desarrollo de DMT2 y la nefropatía en pacientes de la población mexicana.

A pesar de la frecuencia tan elevada del alelo Pro12 en nuestra población (88.8%) no encontramos evidencia de asociación de este alelo con el riesgo a manifestar

diabetes. Por el contrario encontramos que el grupo de pacientes portadores de este alelo en forma homocigota y heterocigota (PP +PA) se asoció con protección contra el desarrollo de diabetes y nefropatía. En las dos poblaciones donde este polimorfismo se ha estudiado en pacientes con DMT2 y nefropatía la presencia del alelo Ala se asoció a valores menores de microalbuminuria y a protección al desarrollo de nefropatía diabética respectivamente (Yen CJ y col., 1997; Herrman y col., 2002).

Este trabajo es el primero en donde se evalúa el papel de este polimorfismo en el riesgo a desarrollar diabetes y nefropatía en una población de origen mestizo, así como la primera documentación del genotipo AA asociado al riesgo a desarrollar DMT2 y nefropatía con un valor y significancia tan alta como la reportada en este estudio. Los individuos homocigotos para el alelo Ala12 tienen un riesgo incrementado para el desarrollo de nefropatía diabética con un O.R. de 10.2, (con un intervalo de confianza al 95% de 1.24-84.70 y una $p= 0.008$) (Tabla 8). Congruente con este hallazgo, la presencia del alelo Pro12 en forma homocigota o heterocigota se asoció a protección para el desarrollo de nefropatía diabética (O.R. 0.09, CI= 0.01-0.82 $p= 0.008$).

Ya que este estudio se realizó en una población étnicamente heterogénea como lo es la población mexicana, así como con un número relativamente pequeño de individuos para los estudios de asociación de caso y control, era importante descartar que las diferencias encontradas no se debieran a estratificación poblacional entre los grupos estudiados. Para ello se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas de un marcador Alu Yc1RG68 y no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos (pacientes con nefropatía diabética e individuos normoglicémicos) (tabla 10).

No se contó con historia clínica completa de todos los individuos con DMT2 y ND, debido a que una porción grande de los casos el diagnóstico de DMT2 se realizó cuando ya existía nefropatía o insuficiencia renal crónica, lo que confirma una vez más la presencia en gran medida de DMT2 en forma asintomática, ya que la mayoría de los pacientes no refieren síntomas consistentes de DMT2. Debido a lo anterior, no fue posible valorar la asociación entre la presencia del alelo Ala12 y la

obesidad como se ha reportado previamente (Lei y col., 2000; Hasstelt y col., 2001; Ek y col., 1999).

Del mismo modo, el diseño del estudio no permitió distinguir si la asociación esta relacionada a la diabetes o al desarrollo de nefropatía de manera aislada. En este momento se cuenta con una población de 50 pacientes con diabetes de larga evolución (mayor a 10 años) sin evidencia de nefropatía. Es interesante que en este último grupo no se identificó ningún individuo homocigoto para el alelo Ala12, lo que sugiere que esta asociación es particular al desarrollo de nefropatía diabética. Sin embargo, esta observación requiere el análisis de un número mayor de sujetos.

Ya que el riesgo de desarrollar diabetes y nefropatía se observa únicamente en individuos homocigotos para el alelo Ala12 y esta tendencia no es evidente en los portadores heterocigotos de este alelo, el efecto sobre el desarrollo de nefropatía diabética es semejante al de una mutación recesiva, es decir el efecto se observa con la sustitución de prolina por alanina en ambos alelos.

Los TZDs son ligandos de PPAR γ . Este receptor nuclear activa la expresión de A-FABP (Guan Y y col., 2001), inhibe la expresión del inhibidor I del activador del plasminógeno (Nicholas SB y col., 2001), disminuye la expresión de α actina de músculo liso (Asano T y col., 2000), reduce la expresión de proteínas de la matriz extracelular (fibronectina y colágeno tipo IV) y TGF- β 1 (Yoshimoto T y col., 1997; Fujii M y col., 1997; Imano E y col., 1998; McCarthy KJ y col., 2000; Buckingham RE y col., 1998). Todos estos hallazgos sugieren que la activación de PPAR γ mediante los ligandos TZDs, protegen la función glomerular. Se ha reportado que PPAR γ se expresa en riñón humano (Guan Y y col., 1997). Estos datos sugieren que la expresión disminuída de PPAR- γ podría estar relacionada al desarrollo de nefropatía.

Se ha reportado que el cambio de aminoácido que se presenta en la proteína debido a este polimorfismo resulta en una disminución de la capacidad de transactivación de la proteína, por lo tanto se sugiere que el efecto de doble dosis en los pacientes homocigotos AA se traduciría en una disminución importante de

la función de la proteína resultando en una mayor susceptibilidad al daño renal en los pacientes con diabetes.

Establecer la participación de PPAR γ en el riñón es de gran importancia para determinar el mecanismo mediante el cual la homocigocidad del alelo Ala12 del gen PPAR γ se relaciona el desarrollo de nefropatía diabética. Esto tendrá un impacto importante en el tratamiento y la posible prevención de esta complicación crónica frecuente en pacientes mexicanos con DMT2.

Con todo lo anterior se determina que la hipótesis establecida en esta tesis se confirma verdadera, debido a que los resultados obtenidos sugieren una asociación entre la presencia del polimorfismo y la nefropatía diabética.

Respondiendo a las necesidades expresadas en el fundamento que justifica este trabajo de investigación, de conocer los factores de riesgo que contribuyen no sólo al desarrollo de la DMT2 sino a las complicaciones relacionadas como es el caso de la ND: Este trabajo se une a la identificación de los marcadores de riesgo genéticos y no genéticos; para lograr en un futuro identificar qué diabéticos tendrán mayor riesgo de desarrollar ND, así como poder pronosticar el grado de severidad, logrando con todo esto una medicina predictiva: una herramienta importante para realizar medidas preventivas efectivas.

11. CONCLUSIONES

1. Los pacientes mexicanos con diabetes tipo 2 homocigotos para el alelo Ala12 tienen un riesgo incrementado para el desarrollo de nefropatía con un OR de 10.2 (CI=1.24-84.70, $p=0.008$).
2. Por el contrario, los pacientes mexicanos con diabetes tipo 2 portadores del alelo Pro12 en forma homocigota o heterocigota muestran protección al desarrollo de nefropatía con un OR de 0.09 (CI=0.01-0.82, $p=0.008$).
3. Esta asociación no parece ser resultado de estratificación poblacional entre los grupos estudiados.
4. La presencia de homocigocidad del alelo Ala12 parece estar asociado específicamente al desarrollo de la nefropatía diabética, sin embargo es necesario incrementar el número de pacientes con diabetes tipo 2 sin nefropatía para confirmar este hallazgo.

12. REFERENCIAS

- Aguilar-Salinas CA, Velázquez Monroy O, Gómez- Pérez FJ, Gonzalez-Chávez A, Lara-Esqueda A, Molina-Cuevas V, Rull-Rodrigo J, Tapia-Conyer R for the ENSA 2000 Group Characteristics of the patients with type 2 diabetes in Mexico: results from a large population-based, nation wide survey. *Diabetes Care* 26: 2021-2026, 2003
- Amos A. McCarty D & Zimmet P. The risen global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diabetic. Med.* 1997, 14: S1-S85.
- American Diabetes Association Expert Committee. Report of the Expert committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus. *Diabetes Care*: 1997; 20:1183.
- American Diabetes Association Clinical Practice Recommendations 2002. Diabetic nephropathy. *Diabetes Care*: 25:s85-s9, 2002
- Alzaid AA. Microalbuminuria in patients with NIDDM: an overview. *Diabetes Care*. 1996, 19:79-89.
- Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M et al. The common PPAR γ Pro12Ala Polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*, 2000, 26: 76-80.
- Asano T, Wakisaka M, Yoshinari M, Lino K, Soroki K, Iwase M and Fujishima M. Peroxisoma proliferator-activated receptor gamma1 (PPAR γ 1) expresses in rat mesangial cells and PPAR γ agonists modulate its differentiation. *Biochim Biophys Acta* 2000 1497: 148-154.
- Asra Siddiqui, Reinhold Kerb, Michael E. Weale, Ulrich Brinkmann, Alice Smith, David B. Goldstein, Nicholas W. Wood, and Sanjay M. Sisodiya. Association of Multidrug Resistance in Epilepsy with a Polymorphism in the Drug-Transporter Gene *ABCB1*. *N Engl J Med* 2003 15: 1442-1448.
- Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP, Staels B, Auwerx J, Laville M, Vidal H: Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* 1997 46:1319–1327.
- Auwerx J. PPAR γ , the ultimate thrifty gene. *Diabetología* 1999, 42:1033-1049.(1)
- Barnett AH, Eff C, Leslie RD, Pyke DA. Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia* 1981 20:87-93.
- Barroso, I, Gurnell M., Crowley VEF, Agostini M, Schwabe JW, Soos MA, Maslen G Li, Williams T D M, Lewis H, Schafer AJ, Chatterjee VKK, O`Rahilly S. Dominant negative mutations in human PPAR γ associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 1999 402 : 880 – 883.
- Beamer BA, Negri C, Yen CJ, Gavriloova O, Rumberger JM, Durcan MJ, Yarnall DP, Hawkins AL, Griffin CA, Burns DK, Roth J, Reitman M, Shuldiner AR. Chromosomal localization and partial genomic structure of the human peroxisome proliferator activated receptor- γ (hPPAR γ) gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 233 : 756-759.
- Beamer BA, Yen CJ, Andersen RE et al. Association of the pro12ala variant in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-2 gene with obesity in two Caucasian populations. *Diabetes* 1998, 47:1806-1808.

- Fujii M, Takemura R, Yamaguchi M. Troglitazone (CS-045) ameliorates albuminuria in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metabolism* 1997 46:981-983.
- García-García E, Aguilar-Salinas CA, Tusié-Luna T, Rull-Rodrigo JA. Early-onset type 2 diabetes in México. *IMAJ* 2002, 4:4444-448.
- Gearing KL, Crickmore A, Gustafsson J-A. Structure of the mouse peroxisome proliferator activated receptor α gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994, 199: 255-263.
- Giguere V. Orphan Nuclear Receptors: From Gene to Function. *Endocrine* 1999 5: 689–725.
- Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes & Development* 2000, 14:121–141.
- Gloyn AL, Weedon MN, Owen KR, Turner MJ, Knight BA. Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic in genes encoding the pancreatic (beta)-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003, 52:568-572.
- Guan Y, Zhang Y, Schneider A, Davis L, Breyer RM, Breyer MD. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity is associated with renal microvasculature. *Am J Physiol* 2001, 281: F1036-F1046.
- Guan Y, Zhang Y, Davis L, Breyer MD: Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in urinary tract of rabbits and human. *Am. J. Physiol.* 1997 273:F1013-F1022.
- Guan Y, Breyer MD. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): novel therapeutic targets in renal disease. *Kidney Int* 2001, 60: 14-30.
- Hager J, Hansen L, Vaisse C, Vionnet N, Philippi A. A missense mutation in the glucagon receptor gene is associated with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature Genetic* 1995, 9: 299-304.
- Harris MI, Modan M. Screening for NIDDM: why is there no national program? *Diabetes Care* 1994, 17; 440.
- Hasstedt SJ, Ren QF, Teng K, Elbein SC. Effect of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 pro(12)ala variant on obesity, glucose homeostasis, and blood pressure in members of familial type 2 diabetic kindreds. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 2001, 86: 536-541.
- Hegele RA, Cao H, Harris SB, Zimman B, Hanley AJG, Anderson CM. Peroxisome proliferators-activated receptor-gamma2 P12A and type 2 diabetes in Canadian Oji-Cree. *J. Clin Endocrinol Metab* 2000, 85: 2014-2019.
- Herrmann SM, Ringel J, Wang JG, Staessen JA, Brand E. Berlin Diabetes Mellitus (BeDiaM) Study Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 polymorphism Pro12Ala is associated with nephropathy in type 2 diabetes: The Berlin Diabetes Mellitus (BeDiaM) Study. *Diabetes* 2002 51:2653-7.
- Horwitz KB, Jackson TA, Bain DL, Richer JK, Takimoto GS, Tung L. Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol Endocrinol* 1996, 10: 1167 – 1177.
- Houck CM, Rinehart FP & Schmid CW. A ubiquitous family of repeated DNA sequences in the human genome. *J Mol Biol.* 1979, 132: 289-306.

Imano E, Kanda T, Nakatani Y, Nishida T, Arai K, Motomura M, Kajimoto Y, Yamasaki Y, Hori M: Effect of troglitazone on microalbuminuria in patients with incipient diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 1998, 21:2135-2139.

Imperatore G, Hanson RL, Pettitt DJ, Kobes S, Bennett PH, Knowler WC. Sib-pair linkage analysis for susceptibility genes for microvascular complications among Pima Indians with type 2 diabetes. *Diabetes* 1998, 47:821-830.

Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990, 347:645-650.

Jean Marx. Unraveling the Causes of Diabetes. *Science*. 2002, 296: 686-689.

Jian'an Luan, Paul O. Browne, Anne-Helen Harding, David J. Halsall, Stephen O'rahilly, V.K. Krishna Chatterjee, and Nicholas J. Wareham. Evidence for Gene-Nutrient Interaction at the PPAR γ Locus. *Diabetes*, 2001, 50: 686-689.

Jiang C, Ting AT, Seed B: PPAR γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998 391: 82-86.

Johnson RJ, Lida H, Alpers CE: Expression of smooth muscle cell phenotype by rat mesangial cells in immune complex nephritis. Alpha-smooth muscle actin is a marker of mesangial cell proliferation. *J. Clin. Invest* 1991 87: 847-858.

Kimura H, Fujii H, Suzuki S, Ono T, Arakawa M and Gejyo F. Lipid-binding proteins in rat and human kidney. *Kidney Int Suppl* 1999 71:S159-S162.

King H, Aubert R. & Herman W. Global burden of diabetes. 1995-2025. Prevalence, numerical estimates and projections. *Diabetes Care*. 1998, 21: 1414-1431.

Krolewski AS, Warram JH, Christlieb AR, Busick EJ, Kahn CR. The changing natural history of nephropathy in type 1 diabetes. *Am J Med* 1985, 78:785-794.

Krolewski AS, Warram JH, Rand LI, Christlieb AR, Busick EJ, Kahn CR. Risk of proliferative diabetic retinopathy in juvenile-onset type 1 diabetes: a 40-yr follow-up study. *Diabetes Care* 1986, 9:443-452.

Kliewer SA, Willson TM. The nuclear receptor PPAR gamma-bigger than fat. *Curr Opin Genet Dev*. 1998. 8: 576-581.

Koch M, Rett K, Maerker E, Volk A, Deninger M, Renn W, Häring HU. The PPAR γ 2 amino acid polymorphism Pro 12 Ala is prevalent in offspring of Type II diabetic patients and is associated to increased insulin sensitivity in a subgroup of obese subjects. *Diabetologia*. 1999, 42: 758-762.

Laudet V, Hanni C, Coll J, Catzeflis F, Stehelin D. Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J*. 1992 11: 1003-1013.

Lefebvre A, Laville M, Vega N, Riou JP, van Gaal L, Auwerx J, Vidal H: Depot specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. *Diabetes* 1998 47:98-103.

Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA: An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* 1995, 270:12953-12956.

- Lei HH, Chen MH, Yang WS et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 Pro12Ala gene variant is strongly associated with larger body mass in the Taiwanese. *Metabolism* 2000, 49: 1267-1270.
- Li WD, Lee JH, Price RA. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 Pro12Ala mutation is associated with early onset extreme obesity and reduced fasting glucose. *Mol Genet Metab* 2000, 70:159-161.
- McCarthy KJ, Routh RE, Shaw W. Troglitazone halts diabetic glomerulosclerosis by blockade of mesangial expansion. *Kidney Int* 2000 58:2341-2350.
- Mukherjee R, Jow L, Croston GE, Paterniti JR. Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPAR γ 1 versus PPAR γ 2 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists. *J Biol Chem* 1997, 272: 8071-8076.
- Mukherjee R, et al. Sensitization of diabetic and obese mice to insulin by retinoid X receptor agonists. *Nature* 1997, 386: 407-410.
- Makino H, Kashihara N, Sugiyama H : Phenotypic modulation of the mesangium reflected by contractile protein in diabetes. *Diabetes* 1995 45: 488-495.
- Makino H, Kashihara N, Sugiyama H: Phenotypic changes of the mesangium in diabetic nephropathy. *J. Diabetes Compl* 1995 9: 282-284.
- Masugi J, Tamori Y, Mori H, Koike T, Kasuga M. Inhibitory effect of a proline-to-alanine substitution at codon 12 of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 on thiazolidinedione-induced adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 268:178-182.
- Mancini FP, Vaccaro O, Sabatino L et al. Pro12Ala substitution in the peroxisome proliferator-activated receptor is not associated with type 2 diabetes. *Diabetes*, 1999, 48: 1466-1468.
- Mori H, Ikegami H, Kawaguchi Y, Seino S, Yokoi N, Takeda J, Inoue I, Seino Y, Yasuda K, Hanafusa T, Yamagata K, Awata T, Kadowaki T, Hara K, Yamada N, Gotoda T, Iwasaki N, Iwamoto Y, Sanke T, Nanjo K, Oka Y, Matsutani A, Maeda E, Kasuga M. The Pro12 – Ala substitution in PPAR- γ is associated with resistance to development of diabetes in the general population: possible involvement in impairment of insulin secretion in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* 2001, 50: 891-894.
- Mori Y, Kim-Motoyama H, Katakura T et al. Effect of the Pro12Ala variant of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 gene on adiposity, fat distribution, and insulin sensitivity in Japanese men. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 251: 195-198.
- Muller YL, Clifton B, Brock A.B, Alan RS and Leslie JB. A functional variant in the peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 promoter is associated with predictors of obesity and type 2 diabetes in pima Indians. *Diabetes* 2003 52: 1864-1871.
- Nicholas SB, Kawano Y, Wakino S, Collins AR, Hsueh WA: Expression and function of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in mesangial cells. *Hypertension* 2001, 37:722-727.
- Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, Rosenfeldk MG, Willson TM, Glass CK, Milburn MV. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Nature* 1998 395:137-143.

Oue T, Namba M, Nakajima H, et al. Risk factors for the progression of microalbuminuria in Japanese type 2 diabetic patients –a 10 year follow-up study. *Diabetes Res Clin Pract* 1999, 46: 47-55.

Olefsky JM., Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator- activated receptor α agonists. *J. Clin Invest* 2000, 106: 467-472.

Okada, N. SINEs. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1991, 1:498-504.

Ouali F, Djouadi F, Merlet-Bénichou C, Bastin J: Dietary lipids regulate β -oxidación enzyme gene expression in the developing rat kidney. *Am. J. Physiol.* 1998 275:F777-784.

Pettitt DJ, Saad MF, Bennett PH. Familial predisposition to renal disease in two generations of Pima Indians with type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1990, 33: 438-443.

Pihlajamaki J, Miettinen R, Valve R et al. The Pro12Ala substitution in the peroxisome proliferator activated receptor gamma 2 is associated with an insulin-sensitive phenotype in families with familial combined hyperlipidemia and in nondiabetic elderly subjects with dyslipidemia. *Atherosclerosis* 2000, 151: 567-574.

Poulsen P, Kyvik KO, Vaag A, Beck-Nielsen H. Heritability of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance-a population-based twin study. *Diabetologia* 1999, 42: 139-145.

Quinn M, Angelico MC, Warram JH, Krolewski AS. Familial factors determine the development of diabetic nephropathy in patients with IDDM. *Diabetologia* 1996, 39:940-945.

Reese-Wagoner A, Thompson J, and Banaszak L. Structural properties of the adipocyte lipid binding protein. *Biochim Biophys Acta* 1999 1441:106-116.

Ribon V, Johnson JH, Camp HS, Saltiel AR. Thiazolidinediones and insulin resistance: Peroxisome proliferators activated receptor gamma activation stimulates expression of the CAP gen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95:14751-14756.

Ricote M, Li AC, Willson TM. The peroxisome proliferators-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998 391:79-82.

Ristow M, Müller- Wieland D, Pfeiffer A, Krone W, Kahn CR, Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation. *N. Engl. J. Med.* 1998, 339: 953-959.

Ritz E. Nephropathy in type 2 diabetes. *J. Intern Med.* 1999, 245: 111- 126.

Ritz E, Rychlik I, Locatelli F, Halimi S. End-stage renal failure in type 2 diabetes: a medical catastrophe of worldwide dimensions. *Am J. Kidney Dis* 1999 34: 795-808.

Roguel, Velho. Molecular genetics of maturity-onset diabetes of the young, *TEM* 1999, 10; 142 – 146.

Roglic G, Colhoun HM, Stevens LK. EURODIAB IDDM Complications Study Group. Parental history of hypertension and parental history of diabetes and microvascular complications in insulin-dependent diabetes mellitus: EURODIAB IDDM Complications Study. *Diabetes Med* 1998, 15: 418-426.

Rudberg S, Stattin EL, Dahlquist G. Familial and perinatal risk factors for micro- and macroalbuminuria in young IDDM patients. *Diabetes* 1998, 47:1121-1126.

Rump R, Buhlmann C, Borchers T and Spener F. Differentiation-dependent expression of heart type fatty acid-binding protein in C2C12 muscle cells. *Eur J. Cell. Biol.* 1996, 69:135-142.

Saltiel AR, Olefsky JM. Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes. *Diabetes* 1996, 45:1661-1669.

Schmid CW, Alu: structure, origin, evolution, significance and function of one-tenth of human DNA. *Prog Nucleic Acids Res Mol Biol* 1996, 53: 283-319.

Schmidt A, Endo N, Rutledge SJ, Vogel R, Shinar D, Rodan GA. Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids. 1992, 6: 1634- 1641.

Seaquist ER, Goetz FC, Rich S, Barbosa J. Familial clustering of diabetic kidney disease. Evidence of genetic susceptibility to diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 1989; 320: 1161–1165.

Smit AF, Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes. *Curr Opin Genet Dev* 1999, 9: 657-663.

Specht B, Bartetzko N, Hohoff C, Kuhl H, Franke R, Borchers T and Spener F. Mammary derived growth inhibitor is not a distinct protein but a mix of heart-type and adipocyte-type fatty acid-binding protein. *J. Biol. Chem.* 1996 271:19943-19949.

Spiegelman BM: PPAR- γ : adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 1998, 47:507–514.

Scott L, Rogus JJ. Using unaffected child trios to test for transmission distortion. *Genet Epidemiol* 2000, 19: 381-394.

Schoonjans K, Auwerx J. Thiazolidinediones: An update. *Lancet* 2000; 355: 1008-1010.

Stefan-Martin Herrmann, Jens Ringel, Ji-Guang Wang, Juan A. Staessen and Eva Brand. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ 2 Polymorphism Pro12Ala is Associated With Nephropathy in Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 2002, 51: 2653-2657.

Storch J and Thumser AE. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 2000 1486:28-44.

Swarbrick MM, Chapman CM, McQuillan BM, Hung J, Thompson PL, Beilby JP. A Pro12Ala polymorphism in the human peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 is associated with hyperlipidaemia in obesity. *Eur J. Endocrinol*, 2001, 144: 277-282.

Takekawa K, Ikegami H, Fukuda M, Ueda H, Kawaguchi Y. Early-onset type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus is associated with glucokinase locus, but not with adenosine deaminase locus, in the Japanese population. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 1994, 23: 141-146.

Tao T, Tanizawa Y, Matsutani A, Matsubara A, Kaneko T, Kaku K. HepG2/erythrocyte glucose transporter (GLU1) gene in NIDDM: a population association study and molecular scanning in Japanese subjects. *Diabetologia* 1995, 38:942-947.

Tomino Y, Makita Y, Shike T. Relationship between polymorphism in the angiotensinogen, angiotensin-converting enzyme or angiotensin II receptor and renal progression in Japanese NIDDM patients. *Nephron* 1999 82: 139-144.

- Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM: stimulation of adipogenesis in fibroblast by PPAR γ 2, a lipid activated transcriptional factors. *Cell* 1994 79: 1147-1156.
- Tontonoz P, Hu E, Graves R, Budavari A, Spiegelman B: mPPAR gamma 2: tissues-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* 1994 8: 1224-1234.
- Tontonoz P, Graves R, Budavari A, Erdjument-Bromage H, Lui M, Hu E, Temps P, Spiegelman B: Adipocyte-specific transcriptional factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR γ and RXR α . *Nucleic Acids Res* 1994 22: 5628-5634.
- Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale E, Spiegelman B: PPAR γ 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol* 1995 15: 351-357.
- Ullu E & Tsochudi, O. Alu sequences are processed 78L RNA genes. *Nature* 1984, 312: 171-172.
- Wagenknecht LE, Bowden DW, Carr JJ, Langefeld CD, Freedman BI, Rich SS. Familial aggregation of coronary artery calcium in families with type 2 diabetes. *Diabetes* 2001, 50:861-866.
- Watkins PB, Whitcomb RW. Hepatic dysfunction associated with troglitazone [letter; comment]. *New England Journal of Medy.* 1998 338: 916-917.
- Werman A, Hollenberg A, Solanes G, Bjorbaek C, Vidal-Puig AJ, Flier JS: Ligand-independent activation domain in the N-terminus of peroxisome proliferator-activated receptor : differential activity of PPA R -1 and -2 isoforms and influence of insulin. *J Biol Chem* 1997 272:20230–20235.
- Wong TY, Szeto CC, Chow KM. Contribution of gene polymorphisms in the renin-angiotensin system to macroangiopathy in patients with diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2001 38:9-17.
- Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Linan M, Werman A, Pories WJ, Caro JF, Flier JS: Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues: effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest* 1997 99:2416–2422.
- Vigouroux C, Fajas L, Khallouf E, Meier M, Gyapay G, Lascols O, Auwers J, Weissenbach J, Capeau J, Magre J. Human peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2: genetic mapping, identification of a variant in the coding sequence, and exclusion as the gene responsible for lipotrophic diabetes. *Diabetes* 1998 47:490-492.
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Murakami K, Motojima K, Komeda K, Ide T, Kubota N, Terauchi Y, Tobe k, Miki H, Tsuchida A, Akanuma Y, Nagai R, Kimura S, Kadowaki T. The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) deficiency and PPAR γ agonist improve insulin resistance. *Journal of Biological Chemistry* 2001a 276:41245-41254.
- Yang T, Michele DE, Park J: Expression of peroxisomal proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the kidney. *Am J. Physiol* 1999 277:F966-F973.
- Yang T, Spitzer E, Kenney N, Zschesche W, Li M, Kromminga A, Muller T, Spener F, Lezius A, Veerkamp JH, Smith GH, Salomon DS and Grosse R. Members of the fatty acid binding protein family are differentiation factors for the mammary gland. *J. Cell Biol.* 1994 127: 1097-1109.
- Yen C-J, Beamer BA, Negri C, Silver K, Brown KA, Yarnall DP, Burns DK, Roth J, Shuldiner AR: Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor (hPPAR γ) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR γ -2 missense mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 241:270–274.

Yoshimoto T, Naruse M, Nishikawa M: Antihypertensive and vasculo- and renoprotective effects of pioglitazone in genetically obese diabetic rats. Am. J. Physiol 1997 272:E989-E996.

Zamir I, Zhang J, Lazar M. Stoichiometric and steric principles governing repression by nuclear hormone receptors. Genes Dev 1997 11: 835-846.

Zhu Y, Qi C, Korenberg JR, Chen XN, Noya D, Rao MS, Reddy JK. Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor γ (mPPAR γ) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR γ isoforms. Proc Natl Acad Sci USA 1995, 92: 7921-7925.

Zimmet P. Globalization, coca-colonization and the chronic disease epidemic: can the doomsday scenario be averted? J. Intern Med. 2000, 247:301-310.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

LISTAS DE ABREVIATURAS

DM: diabetes mellitus

DMT2: diabetes mellitus tipo 2

DMT1: diabetes mellitus tipo 1

ND: nefropatía diabética

PPAR γ : receptor activado por el proliferador de peroxisomas gama

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

RFLP: polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción

Ala: alanina

Pro: prolina

Pro12Ala: Cambio del aminoácido 12 de prolina por alanina

OR: odd ratio

ADA: (American Diabetes Association) asociación americana de diabetes

MODY: (Maturity onset diabetes of the young) diabetes del adulto de inicio temprano.

HNF-4 α : (Hepatocyte Nuclear Factor-4 α) factor 4 α nuclear de hepatocito

HNF-1 α : (Hepatocyte Nuclear Factor-1 α) factor 1 α nuclear de hepatocito

HNF-1 β : (Hepatocyte Nuclear Factor-1 β) factor 1 β nuclear de hepatocito

IPF-1: (insulin promoter factor 1) factor 1 promotor de insulina

ABCC8: receptor de sulfonilurea

GGGR: receptor de glucagon

GCK: (Glucokinase) Glucocinasa

KCNJ11: (Potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 11) rectificador interior del canal de potasio subfamilia J miembro 11

SCL2: transportador de Glucosa Glu1

DCPI: enzima convertidora de la angiotensina II

AGT: angiotensinogeno

AGTRI: receptor I de la angiotensina II

APOE: apolipoproteína E

IL 1 RN: antagonista del receptor de interleucina I

PAN: péptido atrial natriurético.

EcNOS: sintasa no endotelial.

C/EBP- β : (CCAAT enhancer binding protein- β) proteína β de unión a sitio potencializador CCAAT.

C/EBP- δ : (CCAAT enhancer binding protein- δ) proteína δ de unión a sitio potencializador CCAAT.

ADD1/SREBP1: (the adipocyte determination and differentiation factor/ sterol regulatory element-binding proteins) factor de determinación y diferenciación de adipocito/proteína I de unión a elemento regulatorio de esterol.

PEPCK: (phosphoenol pyruvate carboxykinase) carboxinasa fosfoenol piruvato.

aP2: (fatty acid binding protein) proteína de unión a ácidos grasos.

AOX: (acyl-CoA oxidase) oxidasa acil coenzima A.

RXR: receptor del ácido 9-cis retinoico.

PPRE: elementos de respuesta para PPARs.

SRC-1: coactivador 1 del receptor de esteroides

PGC-1 α : coactivador 1 α de PPAR γ

TIF-2: factor intermediario de la transcripción 2

SRC-3: coactivador 3 del receptor de esteroides

NcoR: (nuclear receptor corepressor) corepresor de receptor nuclear.

SMRT: (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors) silenciador del mediador de receptores de hormonas retinoides y tiroideas.

TZD: tiazolidinadionas

SNP: polimorfismo de un solo nucleótido

A-FABP: (adipocyte fatty acid-binding protein) proteína de adipocitos de unión a ácidos grasos.

iLBP: proteínas de unión a lípido intracelular

TGF- β 1: Factor de transformación y crecimiento β -1

SINEs: (short interspersed elements) elementos dispersos cortos