



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Evaluación del polimorfismo T130I del
gen HNF-4 α como factor de riesgo de
diabetes mellitus tipo 2 de inicio
temprano en alumnos de la Facultad
de Química de la UNAM**

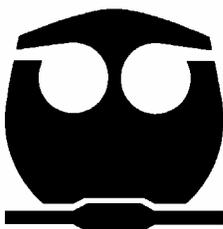
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

Adriana Rodríguez Trejo



MÉXICO, D.F.,

2006.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente Prof. Rogelio Rodríguez Sotres

Vocal Prof. José Pedraza Chavarri

Secretario Prof. Marta Alicia Menjívar Iraheta

1er. Suplente Prof. Ma. de los Ángeles Granados Silvestre

2º. Suplente Prof. María Guadalupe Ortiz López

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Facultad de Química, UNAM y Hospital Juárez de México

Nombre completo y firma del asesor del tema

Dra. Marta Alicia Menjívar Iraheta

Nombre completo y firma del supervisor técnico

Dra. María Guadalupe Ortiz López

Nombre completo y firma del sustentante

Adriana Rodríguez Trejo

*A mis padres
y a mi hermano*

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto se realizó gracias al apoyo del CONACyT (No. de proyecto 40518), del Hospital Juárez de México y de la Facultad de Química de la UNAM.

Agradezco a la Dra. Marta Menjívar Iraheta por su ayuda, apoyo y comprensión.

A la Dra. Guadalupe Ortiz López por su atención y asesoría en la realización de este trabajo.

A la M. en C. Ma. de los Ángeles Granados y a la EBC Isela Montufar por su valiosa ayuda y consejos.

Al H. Jurado por su gran ayuda, enseñanza y asesoramiento en la revisión y corrección del trabajo escrito.

A mis compañeros de laboratorio: Miriam, Luz, Miguel, Marina y Agustín por ayudarme y por la buena convivencia.

Al personal del Laboratorio 6 de Endocrinología Molecular del Hospital Juárez de México, Mary y Jesús, por su apoyo en la realización de los experimentos.

A mi familia: mis padres, mi hermano, mi abuela, mi tío Francisco y mi tía Laura, mis primos Héctor, Omar y Etienne por su fe, cariño y por estar siempre conmigo.

A mis amigos: Ruth, Azucena, Yahaira, Nassim, Carlos, Armando, Arlet, Edel, Irma, César, Juan Manuel, Jessica, Mauricio, Diego, Paco, Gustavo, Rafael, Abraham, Carmin, Mariana, Odette, Belén, Rodrigo, Edson, Peder (y los que me faltaron) por su paciencia, cariño y apoyo en todo momento.

ÍNDICE

I.	Introducción.....	6
II.	Objetivos.....	7
III.	Hipótesis.....	8
IV.	Antecedentes	
	1. Regulación hormonal del metabolismo de la glucosa.....	9
	2. Diabetes mellitus.....	9
	3. Clasificación de la diabetes mellitus.....	10
	4. Diabetes mellitus tipo 2.....	11
	4.1 Factores de riesgo.....	12
	4.2 Genética de la diabetes mellitus tipo 2.....	13
	5. Diabetes mellitus tipo MODY.....	13
	5.1 Factores de transcripción.....	15
	5.2 Factor nuclear de hepatocito 4 α (MODY1).....	16
V.	Material y métodos.....	21
VI.	Resultados.....	34
VII.	Discusión.....	48
VIII.	Conclusiones.....	54
IX.	Bibliografía.....	55
X.	Apéndice.....	60

I. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus representa uno de los principales problemas de salud pública en el mundo. Se estima que afecta a 151 millones de personas y que en el año 2025 habrá 324 millones de diabéticos [1]. En México, la gran mayoría de los pacientes afectados presentan diabetes mellitus tipo 2 (90–95%). La incidencia de esta forma de diabetes es alta y está considerada como la primera causa de muerte. Según la Encuesta Nacional de Salud [2], en el año 2000 la prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 en adultos mayores de 20 años de edad era del 7.5% a nivel nacional, siendo el Distrito Federal una de las entidades federativas con mayor porcentaje de diabéticos (8.5%). Es probable que en el año 2025 existan aproximadamente 12 millones de enfermos en nuestro país (12.3%) [3].

La diabetes mellitus tipo 2 ha sido caracterizada históricamente como diabetes de aparición en adultos. Sin embargo, recientemente se ha observado un aumento en la prevalencia de dicho padecimiento en jóvenes. Alrededor del 30% de los casos de diabetes se presentan en la segunda década de la vida [4,5] y, en México, aproximadamente el 15% de los pacientes diabéticos tipo 2 son diagnosticados entre los 20 y 40 años de edad [6].

La predisposición genética constituye uno de los principales factores de riesgo asociados a diabetes mellitus tipo 2. A través de la evaluación de un subtipo monogénico de diabetes denominado MODY (Maturity-onset diabetes of the young) se han identificado variantes polimórficas de distintos genes que contribuyen a la susceptibilidad de desarrollar diabetes mellitus tipo 2, las cuales difieren entre las diversas poblaciones del mundo [7].

Varios estudios han proporcionado evidencia que demuestra la relación entre la diabetes mellitus tipo 2 y el brazo largo del cromosoma 20 en caucásicos y asiáticos, sugiriendo que uno o más loci de susceptibilidad de diabetes tipo 2 se encuentran en el cromosoma 20q. El gen HNF-4 α es uno de los candidatos dentro de esta región debido a que las mutaciones en éste han sido implicadas en el subtipo de diabetes MODY1 y en la diabetes mellitus tipo 2 de inicio temprano [8,9].

En Japón se encontró que el polimorfismo T130I del gen HNF-4 α (MODY1) está asociado con la diabetes mellitus tipo 2 debido a que se presentó con mayor frecuencia en pacientes diabéticos (3.5%) que en sujetos control (0.8%) [10]. En un estudio danés también se demostró una asociación significativa ya que la frecuencia alélica de este polimorfismo en pacientes diabéticos fue del 8% y la determinada en sujetos control fue del 6%. Los resultados en ambos estudios fueron consistentes, lo cual llevó a proponer que el polimorfismo T130I incrementa el riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 [11]. En la población mexicana hay una alta prevalencia de esta variante en adultos con diabetes mellitus tipo 2 (16%) en comparación con la que se presenta en sujetos control (5.4%), por lo que su determinación en jóvenes puede considerarse como un factor de riesgo para el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 de inicio temprano [12].

II. OBJETIVOS

-  Determinar la frecuencia con la cual se presenta el polimorfismo T130I del gen HNF-4 α en una población de 100 estudiantes de la Facultad de Química de la UNAM.
-  Evaluar el perfil bioquímico y hormonal, así como la genética molecular de la población, para establecer la relación que existe entre el fenotipo y el genotipo de ésta.

III. HIPÓTESIS

1. Debido a que en el gen HNF-4 α existen polimorfismos que son comunes en distintas poblaciones, así como variantes alélicas características de cada una de ellas, es probable que la población mexicana comparta algunos de estos polimorfismos y que además posea variantes propias.

2. Se ha encontrado que la prevalencia del polimorfismo T130I gen HNF-4 α en pacientes diabéticos tipo 2 mexicanos es alta (16/100), en contraste con la que se presenta en sujetos control (5.4%). Por lo tanto, en la población de jóvenes estudiada existe la posibilidad de encontrar esta variante con una frecuencia génica igual o mayor a la de los sujetos control mexicanos y menor a la de los diabéticos tipo 2.

IV. ANTECEDENTES

1. Regulación hormonal del metabolismo de la glucosa

La glucemia es un parámetro altamente controlado por el organismo. En humanos, los niveles de glucosa en sangre se mantienen constantes en un intervalo de 70–110 mg/dL.

La homeostasis de la glucosa está regulada principalmente por la acción de dos hormonas: la insulina y el glucagon. Ambas son sintetizadas por el páncreas en las células β y α de los islotes de Langerhans, respectivamente.

Las concentraciones elevadas de glucosa promueven la síntesis y secreción de la insulina, la cual aumenta la captación de glucosa en el músculo y en el tejido adiposo, estimula la glucólisis, la lipogénesis, la glucogenogénesis y la síntesis de proteínas e inhibe la producción hepática de glucosa, la β -oxidación de ácidos grasos, la glucogenólisis y la proteólisis.

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

El páncreas es el órgano responsable de esta regulación debido a que tiene la capacidad de monitorear la concentración de glucosa y, en consecuencia, producir insulina y glucagon [13–15].

El cortisol es una hormona esteroide de tipo glucocorticoide que también participa en el control de la homeostasis de la glucosa debido a que estimula la producción hepática de glucosa a través de la activación transcripcional de genes que codifican para enzimas reguladas por glucocorticoides, como la tirosina aminotransferasa y la fosfoenolpiruvato carboxinasa. Además, promueve la acumulación de lípidos en el tejido adiposo e inhibe la actividad de la enzima glucógeno sintasa en el músculo esquelético y la secreción de insulina [16].

2. Diabetes mellitus

La diabetes mellitus es un desorden metabólico caracterizado por hiperglucemia crónica en el cual se presentan alteraciones del metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas debido a una deficiencia en la síntesis, secreción y/o acción de la insulina.

Los síntomas que se presentan debido a la hiperglucemia son: poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso y visión borrosa.

Las complicaciones a largo plazo incluyen *retinopatía* con pérdida potencial de la visión, *nefropatía* que conduce a falla renal, *neuropatía periférica* con riesgo de úlceras de pie y amputaciones, además de *neuropatía autonómica* que causa disfunción sexual y

síntomas gastrointestinales, genitourinarios y cardiovasculares. Los pacientes con diabetes tienen una incidencia elevada de enfermedades cardiovasculares, de arterias periféricas y cerebrovasculares [17,18].

De acuerdo a lo establecido por la Asociación Americana de Diabetes (ADA), los criterios para el diagnóstico de la diabetes mellitus son los siguientes [17,19]:

1. Síntomas de diabetes y una concentración plasmática casual de glucosa ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L). Se define casual como: "a cualquier hora del día sin considerar el tiempo transcurrido desde la última comida". Los síntomas clásicos de diabetes son: poliuria, polidipsia y pérdida de peso inexplicable.

o

2. Glucosa plasmática en ayuno ≥ 126 mg/dL (7.0 mmol/L). Se define ayuno como: "en una ausencia de ingesta calórica en un período mínimo de 8 horas previas.

o

3. Concentración de glucosa ≥ 200 mg/dL 2 horas después de la ingesta de una carga oral de glucosa durante la prueba oral de tolerancia a la glucosa. La prueba debe realizarse como lo indica la Organización Mundial de la Salud, utilizando una carga de glucosa que contenga el equivalente a 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua.

3. Clasificación etiológica de la diabetes mellitus

La mayoría de los casos de diabetes se encuentran clasificados en dos categorías etiopatogénicas principales: diabetes tipo I, en la cual hay una deficiencia absoluta de secreción de insulina y diabetes tipo II, cuya causa es una combinación de resistencia a la acción de la insulina y una respuesta de compensación inadecuada de secreción de insulina.

Existen otros tipos específicos de diabetes mellitus, entre los cuales se encuentran aquellos que están relacionados con defectos genéticos de la función de las células β pancreáticas (MODY), defectos genéticos en la acción de la insulina, enfermedades del páncreas exocrino y endocrinopatías, diabetes inducida por fármacos o agentes químicos, infecciones, formas poco comunes de diabetes mediada por inmunidad, síndromes genéticos que en ocasiones se asocian con diabetes y diabetes mellitus gestacional [17].

4. Diabetes mellitus tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2 es la variedad más frecuente de diabetes. Comprende una serie de padecimientos caracterizados por hiperglicemia y una mayor predisposición al desarrollo de complicaciones vasculares debido a la presencia de anormalidades fisiológicas como resistencia periférica a la insulina en músculo esquelético y tejido adiposo, producción excesiva de glucosa hepática y secreción deficiente de insulina.

Las características clínicas más representativas de la enfermedad son: obesidad, alta penetrancia (concordancia en gemelos monocigóticos superior al 90%), herencia de carácter poligénico y asociación con hipertensión arterial y dislipidemia. En la mayoría de los casos, los individuos afectados no requieren insulina para sobrevivir [7].

Generalmente, esta forma de diabetes se diagnostica años después de su aparición debido a que la hiperglucemia se desarrolla gradualmente y, en etapas tempranas, no es lo suficientemente severa para que el paciente pueda notar alguno de los síntomas de la enfermedad [17].

Los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 comúnmente presentan resistencia a la insulina, la cual se define como la incapacidad genética o adquirida de los tejidos blanco de responder normalmente a la acción de la hormona.

El incremento en la secreción de lipoproteínas hepáticas, el crecimiento del tejido adiposo y la elevación de la concentración de ácidos grasos circulantes favorecen el desarrollo de resistencia a la insulina y aumento de la gluconeogénesis hepática. A largo plazo, la secreción de insulina es deficiente y existe una descompensación del tejido pancreático endocrino mediada por mecanismos apoptóticos [20–22].

La glucotoxicidad y la lipotoxicidad son dos condiciones que se presentan en la diabetes tipo 2, las cuales conducen a la disfunción de las células β .

La alta concentración de glucosa modifica los niveles de expresión del gen que codifica para el transportador de glucosa GLUT2, activa a la glucocinasa y causa una inducción coordinada de genes que codifican enzimas de la glucólisis, anaplerosis y lipogénesis. Se generan otros cambios metabólicos importantes como la acumulación de glucógeno, pérdida de la primera fase de secreción de insulina, flujo glucolítico aumentado, incremento de los procesos anapleróticos y lipogénicos con una marcada producción de triglicéridos. La exposición aguda de la célula β a altas concentraciones de ácidos grasos produce un aumento en la liberación de insulina y la exposición crónica provoca la pérdida de sensibilidad de la célula a la glucosa, mostrando un patrón de hipersecreción de insulina a bajas concentraciones de glucosa y una incapacidad de adaptar la respuesta secretoria a incrementos en la glucemia. La síntesis de insulina disminuye y hay acumulación de triglicéridos [23,24].

En los últimos años, la incidencia de diabetes tipo 2 en jóvenes ha aumentado. El fracaso de adaptación o la incapacidad para recuperarse de la resistencia a la insulina en la pubertad pueden provocar resistencia crónica y falla de las células beta, lo que, eventualmente, dará origen a la enfermedad [5].

Aunque la resistencia a la insulina ha sido caracterizada como una de las principales determinantes de esta forma de diabetes, en jóvenes mexicanos con diabetes mellitus tipo 2 de inicio temprano, la ausencia de resistencia a la insulina en la mayoría de los casos y la alta prevalencia de deficiencia de insulina sugieren que esta última es la principal anomalía responsable de la presencia prematura de diabetes en dicho grupo [6].

4.1 Factores de riesgo

La obesidad, una dieta alta en carbohidratos y lípidos, el estrés, la falta de actividad física y la predisposición genética son factores de susceptibilidad implicados en la aparición de diabetes mellitus tipo 2 [5].

El aumento de tejido adiposo está asociado con el incremento de la liberación rápida de insulina y la disminución de la sensibilidad a la hormona. Ambas condiciones causan resistencia a la insulina, la cual tiene una alta prevalencia en individuos obesos.

Existen otros factores que están involucrados en el aumento de la obesidad y resistencia a la insulina: la falta de actividad física o sedentarismo y el consumo elevado de ciertos componentes dietéticos como carbohidratos y grasas. La relación entre la obesidad y el sedentarismo se puede explicar mediante tres mecanismos: (1) gasto reducido de energía, (2) aumento de la ingesta calórica debido al hábito de comer durante las actividades sedentarias y (3) velocidad metabólica disminuida en el transcurso de este período [5,20,21].

El estrés mental constante puede provocar alteraciones crónicas en las concentraciones de cortisol. La elevación frecuente de los niveles de esta hormona favorece el desarrollo de obesidad abdominal y, en consecuencia, la aparición de resistencia a la insulina [16].

Asimismo, la presencia de diabetes tipo 2 en un primer o segundo grado ascendente en los miembros de la familia aumenta la probabilidad de desarrollar dicha enfermedad [5].

Para poder establecer el riesgo de padecer diabetes tipo 2 en la población juvenil, la ADA recomienda el uso de una combinación de criterios: el estado de sobrepeso y dos de los siguientes factores de riesgo: historia familiar positiva de diabetes tipo 2, etnicidad (Indios Americanos, Afro-Americanos, Hispano-Americanos, Asiáticos) y signos de

resistencia a la insulina o condiciones asociadas con resistencia a la insulina (hipertensión, dislipidemia). Los jóvenes que cumplen con estos criterios deben ser examinados cada dos años iniciando a la edad de 10 años o cuando se presente la pubertad si ésta ocurre tempranamente [5].

4.2 Genética de la diabetes mellitus tipo 2

La diabetes mellitus es un trastorno complejo cuya herencia es de carácter poligénico, lo que significa que es necesaria la presencia de diversos defectos genéticos o polimorfismos para su desarrollo [25].

Un polimorfismo se define como la existencia de dos o más alelos presentes en una población, cuya frecuencia es significativa (>1%). Los alelos son formas alternas de un gen que difieren en la secuencia del ADN debido a la adición, delección o sustitución de uno o más nucleótidos; a este cambio de secuencia se le denomina mutación. Los polimorfismos simples de nucleótidos son aquellos en los que los alelos sólo difieren en una base [26].

Varios estudios han tratado de definir la participación de distintos genes relacionados con el metabolismo y la homeostasis de la glucosa en la patogénesis de la diabetes tipo 2. Sin embargo, sólo en una proporción muy pequeña de pacientes se han encontrado mutaciones en algunos de estos genes, por ejemplo, aquellos que codifican para la insulina, el receptor de la insulina, el transportador de glucosa GLUT2, IRS-1 (sustrato del receptor de la insulina 1), el receptor del glucagon y los genes que expresan las enzimas prohormona convertasa 2 (PC2), glucógeno sintasa y glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial. Por lo tanto, se ha propuesto la participación de genes que codifican para factores transcripcionales involucrados en la regulación de varios genes que están asociados al metabolismo de la glucosa [7,25,27].

Además, los polimorfismos genéticos o mutaciones en los genes de los factores de transcripción que actúan en la regulación de la expresión de genes del desarrollo y funcionamiento del páncreas, entre los que se encuentran NeuroD1 /Beta2, Nkx2.2, Pax4, Pax6, Isl-1 (islote 1) y Hlhx-9, pueden provocar el desarrollo deficiente de este órgano y diabetes consecuente [14,28-30].

La identificación de algunos de estos factores de transcripción se ha realizado a través del estudio de una variedad monogénica de diabetes denominada MODY [6].

5. Diabetes mellitus tipo MODY

La diabetes tipo MODY (Maturity-onset diabetes of the young) es un subtipo monogénico de diabetes mellitus tipo 2 caracterizado por edad de aparición temprana

(generalmente antes de los 25 años), herencia autosómica dominante y secreción deficiente de insulina con sensibilidad normal a la insulina. Su prevalencia en la población diabética tipo 2 es del 5 al 10% y la mayoría de los sujetos que la padecen no son obesos ni requieren de un tratamiento con insulina [31].

Este desorden es genéticamente heterogéneo. A la fecha se han identificado mutaciones en seis genes distintos denominados MODY, cinco de los cuales corresponden a factores de transcripción expresados en páncreas: HNF-4 α , HNF-1 α , IPF-1, HNF-1 β , NeuroD1/Beta2 y uno a la enzima glicolítica glucocinasa.

La glucocinasa participa en la regulación de la secreción de insulina en la célula β . Por otra parte, los cinco factores de transcripción actúan como reguladores positivos (directos o indirectos) del gen de la insulina y otros genes pancreáticos.

La presencia de mutaciones en cualquiera de los genes MODY provoca una deficiencia en los procesos de síntesis y secreción de insulina (Tabla 1).

Tabla 1. Genes responsables del fenotipo MODY y las características asociadas a las mutaciones en cada uno de ellos

	Gen/producto	Efecto de las mutaciones	Fenotipo clínico
MODY 1	TCF14 / HNF-4 α (20q12-q13.1) 23 mutaciones reportadas [9]	Alteración en la síntesis y secreción de insulina	Hiperglicemia severa, frecuente requerimiento de insulina, nefropatía, retinopatía
MODY 2	GCK/ Glucocinasa (7p15-p13) más de 80 mutaciones reportadas	Alteración en la secreción de insulina	Hiperglicemia moderada, control con hipoglucemiantes y dieta
MODY 3	TCF 1 / HNF-1 α (12q24.2) más de 50 mutaciones reportadas	Alteración en la síntesis y secreción de insulina	Hiperglicemia severa, requerimiento de insulina, nefropatía asociada
MODY 4	IPF-1 (13q12.1) 2 mutaciones reportadas	Alteración en la síntesis y secreción de insulina. Retraso en el desarrollo del páncreas (mutación homocigota)	Hiperglicemia moderada, control con hipoglucemiantes, eventual requerimiento de insulina.
MODY 5	TCF 2/ HNF-1 β (17q21.3) 3 mutaciones reportadas	Alteración en la síntesis y secreción de insulina	Hiperglicemia severa, frecuente requerimiento de insulina, nefropatía asociada.
MODY 6	NeuroD1/Beta2 (2q32) 2 mutaciones reportadas	Alteración en la síntesis de insulina	Hiperglicemia moderada o severa.

Existen otras variedades de MODY en las que el gen causal no ha sido identificado. Dichas variedades se agrupan como MODY X, asumiendo que puede haber más de un subtipo distinto a los que ya se conocen [7,32-34].

5.1 Factores de transcripción

La regulación de la expresión génica en los organismos eucariontes puede efectuarse a varios niveles: (1) control transcripcional, (2) procesamiento del pre-mRNA, (3) transporte del mRNA al citoplasma, (4) estabilidad del mRNA, (5) selección del mRNA que se va a transcribir y (6) modificación post-transcripcional de la proteína producida.

Los genes eucarióticos están regulados, en parte, a nivel transcripcional. Hay dos componentes principales que están involucrados en el control de la transcripción: las secuencias cortas de DNA que participan como sitios de reconocimiento para la unión de la RNA polimerasa (regiones promotoras o promotores) y las proteínas reguladoras que se unen a estos sitios para iniciar la transcripción (factores de transcripción).

La región promotora de la mayoría de los genes contiene varios elementos: una secuencia de 8 pares de bases A=T que se denomina caja TATA, una secuencia llamada caja CAAT y una caja GC, cuya secuencia es GGGCGG.

Los factores de transcripción son estructuras proteicas que tienen, al menos, dos dominios funcionales: (1) dominio de unión a DNA y (2) dominio de activación en *trans*, el cual se une a la RNA polimerasa II o a otros factores de transcripción.

Los dominios de unión a DNA tienen distintas estructuras tridimensionales o motivos, entre las que se encuentran la hélice-giro-hélice, las cremalleras de leucina y los dedos de zinc. Estos últimos contienen dos grupos: uno de 2 residuos de cisteína y otro de 2 residuos de histidina. Ambos se encuentran en intervalos repetidos y se unen covalentemente con átomos de zinc, plegando los aminoácidos en lazos conocidos como dedos de zinc (Figura 1) [26].

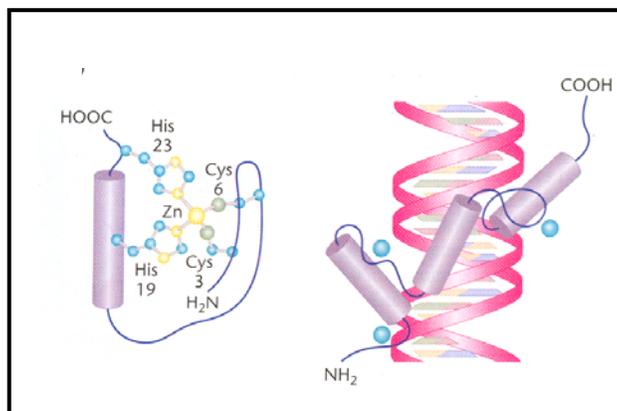


Figura 1. Estructura tipo dedo de zinc

La transcripción del DNA a mRNA se inicia con el ensamblaje de la maquinaria basal o general, el cual consiste en la unión de una variedad de factores de transcripción (IIA, IIB, IID, IIE, IIF y IIH) a la caja TATA del promotor y el subsiguiente acoplamiento de los factores de transcripción asociados a las proteínas de unión de esta región promotora y de la RNA polimerasa II. Los factores de transcripción se pueden unir a regiones intensificadoras, silenciadoras, o a elementos de respuesta metabólica para regular la actividad de la maquinaria basal transcripcional [32].

5.2 Factor nuclear de hepatocito 4 α (MODY 1)

El factor nuclear de hepatocito 4 (HNF-4) es un factor de transcripción que está codificado por dos genes: HNF-4 α y HNF-4 γ , los cuales expresan las proteínas HNF-4 α (receptor nuclear 2A1) y HNF-4 γ (receptor nuclear 2A2), respectivamente. Ambos están considerados como activadores transcripcionales constitutivos [35].

Los receptores nucleares son factores de transcripción que se unen como dímeros a elementos de respuesta (PuGGTCA o PuG(G/A)ACA) y que se encuentran organizados en secuencias palindrómicas, secuencias repetidas o como monómeros.

Después de su unión al promotor, los receptores nucleares modulan la transcripción mediante el reclutamiento de correguladores transcripcionales y componentes del proceso de transcripción.

En ausencia de ligando, estos receptores incorporan complejos represores a la región de la secuencia promotora. Dichos complejos generan un ambiente de cromatina local que restringe la transcripción de manera activa. La unión de ligandos agonistas induce el cambio de correpresores por coactivadores a través de un rearrreglo estructural de los receptores nucleares.

Los receptores nucleares incluyen a los factores de transcripción dependientes de ligando, como los receptores para estrógenos (ER- α y ER- β), andrógenos, glucocorticoides, progesterona, hormonas tiroideas, vitamina D y retinoides [36].

El factor nuclear de hepatocito 4 α (HNF-4 α) es un factor de transcripción que forma parte de la familia de receptores nucleares hormonales esteroideos/tiroideos. En los mamíferos, se expresa en el hígado, riñón, intestino delgado e islotes pancreáticos.

El gen HNF-4 α consta de 13 exones (Figura 2) y codifica 9 isoformas distintas (α 1- α 9), cuya expresión es resultado de un procesamiento alternativo del mRNA y de la utilización de los promotores proximal (P1) y alternativo (P2). El promotor P1 inicia los transcritos que contienen el exón 1A (isoformas α 1- α 6), mientras que el promotor P2 inicia aquellos que contienen el exón 1D (isoformas α 7- α 9).

La expresión de las isoformas de la proteína HNF-4 α varía con el desarrollo, diferenciación y origen del tejido. En el hígado y en el riñón, su transcripción se inicia

principalmente en el promotor P1, mientras que en los islotes pancreáticos está dirigida por ambos promotores [8,37,38].

La proteína HNF-4 α posee una estructura formada por 6 regiones diferentes (A-F), las cuales corresponden a dominios funcionales (Figura 2).

La región A/B (aminoácidos 1-50) es un dominio N-terminal que provee una función de transactivación independiente de ligando llamada AF-1 (aminoácidos 1-24). La región C (aminoácidos 50-116) contiene el dominio de unión a DNA (DBD). En la región D (aminoácidos 116-174), la función del dominio también está involucrado en la unión al DNA. La región E (aminoácidos 174-370) comprende un complejo funcional C-terminal que forma un dominio de unión a ligando (LBD), una interfase de dimerización y un dominio de transactivación dependiente de ligando AF-2 (aminoácidos 128-366). La región F (aminoácidos 370-465) tiene un dominio cuya función consiste en inhibir la actividad del dominio de transactivación A2 de HNF-4 α [32,35,39].

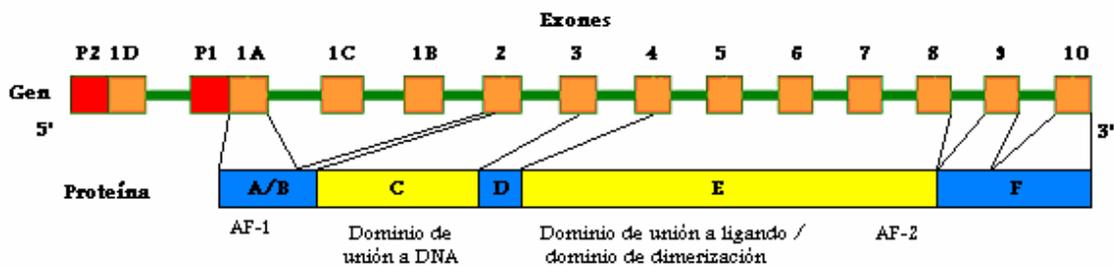


Figura 2. Representación de la estructura del gen y la proteína HNF-4 α

El potencial transcripcional del factor nuclear de hepatocito 4 α está regulado por coactivadores y correpresores. El módulo de la función de activación AF-1, codificado por el exón 1A, está implicado en el potencial transcripcional de HNF-4 α y en el reclutamiento de coactivadores que son esenciales para la función de la proteína [35].

El factor de transcripción HNF-4 α se une al DNA como homodímero. El dominio de unión a DNA consta de dos estructuras tipo dedos de zinc y una extensión C-terminal, en la cual se encuentran las cajas T y A. La caja T posee una estructura de hélice α llamada tercera hélice. Este dominio media la unión específica y de alta afinidad al DNA [40,41].

El dominio de unión a ligando de la proteína HNF-4 α es hidrofóbico y sus ligandos son ácidos grasos monoinsaturados y saturados (C14-C18), los cuales poseen una función estructural en el plegamiento correcto de la proteína activa [42,43]. Dentro de este dominio, se ha demostrado que la presencia de una región denominada caja I proporciona una interfase de dimerización, la cual está involucrada en la unión de los receptores nucleares al DNA [44].

Los dominios de unión a ligando de los receptores nucleares se encuentran en dos conformaciones distintas. La diferencia entre las formas está en la posición de la hélice $\alpha 12$, comúnmente referida como dominio de transactivación AF-2. En la primera conformación, $\alpha 12$ se extiende colinealmente con las hélices $\alpha 10$ y $\alpha 11$, dejando el sitio de unión a ligando accesible y el dominio de unión a ligando en lo que se conoce como una conformación “abierta”. Debido a que esta estructura no permite la unión de moléculas coactivadoras, se considera que es la forma inactiva. En la segunda conformación, la hélice $\alpha 12$ se pliega en la parte posterior del dominio de unión a ligando para sellar el sitio de unión a ligando. Debido a que esta forma “cerrada” interactúa con coactivadores, se considera que es el estado activo de los receptores nucleares [45,46].

La actividad de la proteína HNF-4 α está regulada a través de varias vías como las modificaciones post-transcripcionales (fosforilación o acetilación) y las interacciones proteína-proteína con otros factores. Por ejemplo, la proteína cinasa activada por AMPc inhibe la actividad de HNF-4 α mediante la fosforilación de uno de los residuos de serina del factor de transcripción, lo cual provoca la disminución de su dimerización [40,47].

El factor nuclear de hepatocito-4 α participa en el desarrollo embrionario y se requiere para la función normal de los hepatocitos y de las células β pancreáticas [45].

Este factor de transcripción interactúa con elementos de regulación en los promotores e intensificadores de más de 40 genes blanco involucrados en el metabolismo de la glucosa, colesterol y ácidos grasos [8,9].

Algunos de los genes blanco incluyen a aquellos que codifican para el transportador de la glucosa 2 (GLUT 2), la aldolasa B, la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, la piruvato cinasa, la fosfoenolpiruvato carboxicinas y las apolipoproteínas Apo-AI, Apo-II, Apo-IV, Apo-B, Apo-CII, Apo-III y Apo-E [7,42,45].

El factor nuclear de hepatocito-4 α también participa en la regulación de la expresión de los genes que codifican para la albúmina, el fibrinogeno y los factores de coagulación VII, VIII, IX y X [48].

En los islotes pancreáticos, el factor de transcripción HNF-4 α se une a 1400 genes distintos [29] y su función en las células β consiste en activar directamente al promotor del gen de la insulina y participar en el proceso de secreción de insulina inducida por glucosa [35,40].

Debido a que el gen HNF-4 α se expresa en las células β maduras, cualquier deficiencia estructural o funcional de esta proteína que haya sido causada por alguna mutación, puede favorecer la disminución de la secreción de insulina y, en consecuencia, aumentar el riesgo de desarrollar diabetes mellitus [49].

La región de codificación del gen HNF-4 α ha sido investigada extensamente en distintas poblaciones con la finalidad de identificar variantes alélicas que contribuyan al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2. Algunas de las 23 mutaciones heterocigotas que se han encontrado a la fecha en familias MODY1 y familias con diabetes de aparición temprana son: D69A, F75fsdelT, K99fsdelAA, G115S, D126Y, D126H, R127W, T130I, R154X, V255M, Q268X, E276Q, R324H, V328ins, I145V y V393I [8,9,37,50].

Los pacientes con MODY1 exhiben defectos en la secreción de insulina estimulada por glucosa y por arginina, lo que indica que existe una pérdida progresiva de la función de las células β pancreáticas. Además, las concentraciones en suero de triglicéridos y lípidos están disminuidas en estos individuos, lo cual sugiere la presencia de un defecto hepático primario en estos pacientes. Debido a que MODY está caracterizada principalmente por una secreción deficiente de insulina estimulada por nutrientes, se cree que la pérdida de la proteína HNF-4 α en las células β es el defecto primario que causa la hiperglucemia. [9,43,51,52]

Se han descrito varios mecanismos para explicar cómo es que las mutaciones en el gen HNF-4 α provocan que la función de este receptor nuclear sea deficiente. Estos incluyen: (1) pérdida del modulo de función de activación AF-2 debido a mutaciones sin sentido como R154X y Q268X, (2) pérdida parcial de la unión a DNA debido a mutaciones en el dominio de unión a DNA, como D126Y y D126H y (3) reclutamiento deficiente de coactivadores y otros activadores transcripcionales (mutación E276Q) [40].

La variante T130I (treonina-130-isoleucina) es un polimorfismo simple de un nucleótido que se origina a partir de una mutación de sentido equivocado localizada en el exón 4 del gen HNF-4 α y en la cual se produce el cambio del alelo ACT que codifica para el aminoácido treonina por el alelo ATT que corresponde al aminoácido isoleucina, lo que provoca que se haga un producto de traducción alterado. Este polimorfismo afecta a un residuo de la caja A, la cual se encuentra en el dominio de unión a DNA y es importante para la homodimerización y la unión de alta afinidad al DNA.

Debido a la presencia de la mutación, el potencial de transactivación del factor de transcripción HNF-4 α disminuye en los hepatocitos; sin embargo, esto no se ha observado en las células β . Por lo tanto, es necesario realizar más estudios sobre la actividad biológica de la proteína alterada en el tejido pancreático.

Aún no se conoce el mecanismo molecular mediante el cual se produce una baja actividad de este factor de transcripción en las células hepáticas ni su contribución al desarrollo de diabetes tipo 2. Una posible explicación es que dichas células lleven a cabo alguna modificación post-traducciona l o que posean proteínas que inhiban la unión de la mutante T130I [10].

Los polimorfismos simples de nucleótidos dentro del gen HNF-4 α están relacionados con diabetes tipo 2 en finlandeses, judíos Ashkenazi, japoneses y daneses, entre otros. En la población japonesa y danesa, el polimorfismo T130I fue asociado de manera

significativa con la diabetes mellitus tipo 2. Además, se encontró que los portadores de la mutación tuvieron niveles inferiores de colesterol en suero en comparación con aquellos que no presentaron la variante [10,11,53].

Asimismo, en un estudio realizado en México en 100 familias diabéticas, se detectó la mutación T130I en 16 individuos, uno de cada familia (frecuencia génica: 16 %). Esta es la prevalencia más alta detectada en el mundo y la primera asociación con diabetes de inicio temprano, por lo que se sugirió que la variante podría formar parte del fondo genético de susceptibilidad a diabetes en la población mexicana [12].

Las frecuencias de los alelos para algunas variantes en el gen HNF-4 α son consistentes entre grupos étnicos distintos, mientras que otras son diferentes. Por lo tanto, es posible que el locus HNF-4 α sea una determinante genética común de diabetes tipo 2 en múltiples poblaciones, pero su contribución relativa puede diferir entre ellas [53,54].

V. MATERIAL Y MÉTODOS

En esta evaluación participaron voluntariamente 100 estudiantes de 18 a 22 años de edad.

Los alumnos contestaron un cuestionario en el que se incluían preguntas sobre sus datos generales, estilo de vida y antecedentes familiares de diabetes. Además, cada uno de ellos firmó una carta de consentimiento para participar en este proyecto.

MEDICIONES ANTROPOMÉTRICAS

Se registraron los datos antropométricos (talla, peso, medidas de cintura y cadera), a partir de los cuales se calcularon los siguientes parámetros:

Índice de Masa Corporal (IMC):

$$IMC = \frac{\text{Peso(Kg)}}{[\text{Talla(m)}]^2}$$

Índice Cintura-Cadera (ICC):

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

Posteriormente, se tomaron muestras sanguíneas (20 mL) para evaluar el perfil bioquímico, hormonal y genético-molecular de cada estudiante.

PERFIL BIOQUÍMICO

La evaluación del perfil bioquímico de los alumnos consistió en la determinación de las concentraciones de glucosa, colesterol total y triglicéridos en suero mediante el uso de métodos enzimáticos-colorimétricos.

Reacciones:

GLUCOSA (Kit: Stanbio Glucosa Liquicolor, Stanbio Laboratory)

La glucosa es oxidada en presencia de la enzima glucosa oxidasa (GOD) para formar ácido glucónico y peróxido de hidrógeno.



El peróxido de hidrógeno reacciona bajo la influencia de la peroxidasa (POD) con fenol y 4-aminoantipirina, dando lugar a la formación de un complejo rojo-violeta de quinona.



La intensidad del color rojo-violeta es proporcional a la concentración de glucosa.

Reactivos empleados:

- Glucosa Liquicolor ® (Fabricante: Stanbio Laboratory)
- Solución estándar de glucosa (100 mg/dL)

COLESTEROL TOTAL (Kit: Colestat enzimático AA, Wiener Laboratory)

La colesterol esterasa (CE) hidroliza los ésteres de colesterol, produciendo colesterol libre y ácidos grasos.



El colesterol libre se oxida en presencia de la colesterol oxidasa (COX) para formar colestén-3-ona y peróxido de hidrógeno.



El peróxido de hidrógeno reacciona con 4-aminofenazona y fenol (contenido en el buffer), en presencia de la peroxidasa (POD). Se produce una quinonimina de color rojo.



La intensidad del color rojo es proporcional a la concentración total de colesterol.

Reactivos empleados:

- Reactivo de trabajo preparado a partir de la reconstitución, con solución amortiguadora, de las enzimas liofilizadas.
- Solución estándar de colesterol (200 mg/dL)

TRIGLICÉRIDOS (Kit: Stanbio Triglicéridos Liquicolor GPO-PAP, Stanbio Lab.)

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

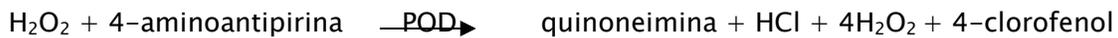
El glicerol se fosforila por el adenosin-5'-trifosfato (ATP) para producir glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosin-5'-difosfato (ADP) en una reacción catalizada por la glicerol cinasa (GK).



El G3P es oxidado por la glicerolfosfato oxidasa (GPO), produciendo dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrógeno.



El peróxido reacciona con 4-aminoantipirina y 4-clorofenol bajo la influencia catalítica de la peroxidasa (POD) para formar una quinoneimina de color rojo.



La intensidad del color rojo es proporcional a la concentración de triglicéridos.

Reactivos empleados:

- Reactivo enzimático líquido para triglicéridos.
- Reactivo activador.
- Solución estándar de triglicéridos (200 mg/dL)

Procedimiento:

Cada determinación se hizo por separado, con los reactivos correspondientes y siguiendo el procedimiento que se describe a continuación:

1. Se colocaron en tubos de vidrio los volúmenes de reactivo y/o muestras (sueros de las muestras de los alumnos y sueros para control de calidad) que se indican a continuación:

	Reactivo (blanco)	Sol. estándar	Muestra
Reactivo	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL
Estándar	-	0.01 mL	-
Muestra	-	-	0.01 mL

2. Los tubos se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente (15–30°C).
3. Se leyeron las absorbencias (A) de la solución estándar y de cada muestra a $\lambda = 500$ nm.
4. A partir de la A de la solución estándar, se determinó la concentración de cada metabolito.

Valores normales:

	Concentración en suero (mg/dL)
Glucosa	70–110
Colesterol total	140–200
Triglicéridos	30–150

PERFIL HORMONAL

La valoración del perfil hormonal comprendió la determinación cuantitativa de insulina, péptido C y cortisol en suero. Para ello, se utilizó la técnica de radioinmunoanálisis (RIA).

INSULINA (Kit: Insulina Coat–A–Count, Diagnostic Products Corporation)

Se realizó un radioinmunoensayo de fase sólida basado en la competencia de la insulina marcada con ^{125}I con la insulina de la muestra del sujeto por los sitios de unión al anticuerpo específico para insulina. Debido a que el anticuerpo está inmovilizado en la pared de un tubo de polipropileno, la decantación de sobrenadante es suficiente para terminar la competencia y aislar la fracción de anticuerpo a la que se encuentra unida la insulina marcada con el isótopo. La lectura del tubo en un contador gama proporciona una medida de la insulina presente en la muestra del sujeto.

Reactivos:

- Insulina marcada con ^{125}I
- Soluciones control de insulina
- Soluciones estándar de insulina utilizadas para realizar la curva de calibración:

Solución Estándar	Concentración de insulina ($\mu\text{UI}/\text{mL}$)
A	0
B	5
C	15
D	50
E	100
F	200
G	350

Procedimiento:

1. Se etiquetaron 2 tubos no recubiertos para cuentas totales y los tubos recubiertos con anticuerpos anti-insulina necesarios para las soluciones empleadas en la curva de calibración (por duplicado), las soluciones control (por duplicado) y las muestras.
2. Se colocaron 200 μL de las soluciones estándar, soluciones control y de las muestras problema en el fondo de los tubos correspondientes.
3. Se añadió 1.0 mL de ^{125}I insulina a cada tubo.
4. Los tubos se agitaron suavemente con ayuda de un vortex y se incubaron a temperatura ambiente durante 18–24 horas.
5. Posteriormente, se decantaron todos los tubos (excepto los de cuentas totales) mediante inversión simultánea con una gradilla de esponja sobre un dispositivo para residuos radioactivos y se dejaron escurrir sobre papel absorbente durante 1–2 minutos.
6. Se secaron los bordes de cada tubo para eliminar las gotas restantes antes de volver a colocarlos en posición vertical.
7. Finalmente, se introdujo cada uno de los tubos en un contador gama durante un minuto y se registraron las lecturas correspondientes a las cuentas totales y a la concentración de insulina de las soluciones estándar, las soluciones control y las muestras.

Valores normales: 5–25 $\mu\text{UI/mL}$.

NOTA: 1 Unidad Internacional de insulina equivale a 43.3 μg de insulina humana del estándar de referencia de la Organización Mundial de la Salud Código No. 60/304 que se emplea en el kit Insulina Coat–A–Count de Diagnostic Products Corporation [55]

PÉPTIDO C (Kit: Péptido C de la Insulina RIA, Diagnostic Systems Lab., Inc.)

El procedimiento realizado sigue el principio básico del radioinmunoensayo, que consiste en la competencia entre un antígeno radioactivo y otro no radioactivo por una cantidad fija de lugares de unión a anticuerpos. La cantidad de péptido C marcado con ^{125}I unida al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de péptido C sin marcar presente. La separación del antígeno libre y el unido a anticuerpos se lleva a cabo mediante un sistema de dos anticuerpos.

Reactivos:

- Péptido C marcado con ^{125}I
- Antisuero frente a Péptido C

- Reactivo para la precipitación
- Soluciones control de péptido C
- Soluciones estándar de péptido C para realizar la curva de calibración:

Solución Estándar	Concentración de péptido C (ng/mL)
A	0
B	0.1
C	0.5
D	1.5
E	5.0
F	20.0

Procedimiento:

1. Se etiquetaron los tubos para cuentas totales, soluciones estándar (por duplicado), soluciones control (por duplicado) y muestras.
2. Se añadieron 50 μ L de las soluciones estándar, soluciones control y de las muestras a los tubos correspondientes.
3. Se agregaron 100 μ L de antisuero frente a péptido C a todos los tubos, excepto a los tubos para cuentas totales.
4. Se añadieron 100 μ L de Péptido C marcado con 125 I a cada uno de los tubos.
5. Todos los tubos se agitaron con ayuda de un vortex y se dejaron incubar durante 24 horas a una temperatura de 2–8°C.
6. Transcurrido este tiempo, se agregó 1.0 mL del reactivo de precipitación a cada tubo, excepto a los tubos para cuentas totales.
7. Se agitaron todos los tubos en el vortex y se incubaron a temperatura ambiente durante 15–20 minutos. Posteriormente, se centrifugaron durante 20 minutos a 1500 x g.
8. Todos los tubos se decantaron (excepto los tubos de cuentas totales) mediante inversión simultánea con una gradilla de esponja sobre un dispositivo para residuos radioactivos. Los tubos invertidos se dejaron escurrir sobre el papel absorbente durante 15–30 segundos.
9. Se secaron los bordes de cada tubo para eliminar las gotas restantes antes de volver a colocarlos en posición vertical.
10. Se introdujo cada uno de los tubos en un contador gama durante un minuto y se registraron las lecturas correspondientes a las cuentas totales y a la concentración de péptido C de las soluciones estándar, las soluciones control y las muestras.

Valores normales: 1.1–3.2 ng/mL

CORTISOL (Kit: Coat-A-Count Cortisol, Diagnostic Products Corporation)

El procedimiento utilizado en la determinación de esta hormona es un radioinmunoanálisis en fase sólida, en el cual el cortisol marcado con ^{125}I compete, durante un periodo de tiempo determinado, con el cortisol del individuo por los sitios de unión de los anticuerpos. Debido a que el anticuerpo está inmovilizado en la pared de un tubo de polipropileno, la decantación del sobrenadante es suficiente para terminar la competencia y aislar la fracción de anticuerpo a la que se encuentra unido el cortisol marcado. La lectura del tubo en un contador proporciona una medida del cortisol presente en la muestra del sujeto.

Reactivos:

- Cortisol marcado con ^{125}I
- Soluciones control para cortisol
- Soluciones estándar de cortisol utilizadas para realizar la curva de calibración:

Solución Estándar	Concentración de cortisol ($\mu\text{g}/\text{dL}$)
A	0
B	1
C	5
D	10
E	20
F	50

Procedimiento:

1. Se etiquetaron 2 tubos no recubiertos para cuentas totales y los tubos recubiertos con anticuerpos anti-cortisol necesarios para las soluciones empleadas en la curva de calibración (por duplicado), las soluciones control (por duplicado) y las muestras.
2. Se colocaron 25 μL de las soluciones estándar, soluciones control y de las muestras problema en el fondo de los tubos correspondientes.
3. Se añadió 1.0 mL de ^{125}I cortisol a cada tubo.
4. Los tubos se agitaron suavemente con ayuda de un vortex y se incubaron a temperatura ambiente durante 45 minutos.
5. Posteriormente, se decantaron todos los tubos (excepto los de cuentas totales) mediante inversión simultánea con una gradilla de esponja sobre un dispositivo para residuos radioactivos y se dejaron escurrir sobre papel absorbente durante 1-2 minutos.

6. Se secaron los bordes de cada tubo para eliminar las gotas restantes antes de volver a colocarlos en posición vertical.
7. Se introdujo cada uno de los tubos en un contador gama durante un minuto y se registraron las lecturas correspondientes a las cuentas totales y a la concentración de cortisol de las soluciones estándar, las soluciones control y las muestras.

Valores normales: variación del ritmo diurno a.m.: 5–25 µg/dL; p.m.: aproximadamente la mitad de los valores para a.m.

Nota: Se consideró el intervalo para a.m. porque las muestras sanguíneas fueron tomadas en la mañana.

EVALUACIÓN GENÉTICO-MOLECULAR

En la presente evaluación se realizó la extracción de DNA de leucocitos de sangre periférica y se llevaron a cabo las siguientes técnicas: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), purificación de los productos de PCR y el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).

EXTRACCIÓN DE DNA

La técnica utilizada para extraer el DNA está basada en la densidad y solubilidad de esta molécula.

Inicialmente, se eliminan las células no nucleadas (eritrocitos) mediante el uso de una solución hipotónica que, por presión osmótica, llena al eritrocito con agua proveniente de la solución debido a que ésta se desplaza del sitio en el que hay una menor concentración de solutos al lugar en el que su concentración es mayor. La consecuencia de este desplazamiento de agua provoca que el eritrocito se lise, ya que se sobrepasa la flexibilidad de su membrana. A dicho proceso se le conoce como hemólisis.

Posteriormente, se emplea una solución isotónica de lavado que deja a los leucocitos libres de residuos de eritrocitos. La membrana y núcleo de los leucocitos son lisados por desnaturalización de proteínas, procedimiento en el que se emplea la enzima proteinasa K. El DNA queda en solución.

Se adiciona entonces una solución sobresaturada de NaCl que precipita los polipéptidos y deja nuevamente al DNA en solución. El DNA se deshidrata con etanol absoluto, el cual precipita a la molécula de tal manera que es posible observar un precipitado blanco suspendido en el disolvente.

Procedimiento realizado para cada muestra:

1. La muestra sanguínea, contenida en un tubo Falcon de 50 mL, se descongeló.
2. El tubo se agitó suavemente por inversión y se colocó en hielo.
3. Se llevó a un volumen de 35 mL con solución sacarosa-tritón 2X fría y se agregaron 15 mL de agua destilada estéril.
4. Se mezcló por inversión y se dejó incubar durante 10 minutos en hielo.
5. Se centrifugó a 805 x g durante 15 minutos a 4°C.
6. El sobrenadante se decantó en un recipiente con hipoclorito de sodio y se desecharon los residuos.
7. El botón se lavó con 5 mL de solución sacarosa-tritón 1X fría.
8. El tubo se centrifugó a 805 x g durante 15 minutos a 4°C.
9. Se decantó el sobrenadante y se conservó el botón.
10. Se adicionaron 3 mL de solución amortiguadora de lisis nuclear y se resuspendió el botón con una pipeta Pasteur de punta sellada por calor.
11. Se agregaron 216 μ L de dimetilsulfóxido de sodio (SDS) al 10 % y 100 μ L de proteinasa K (5mg/mL) y se mezcló la solución.
12. El tubo fue incubado en baño maría a 37°C (con agitación suave) durante 18–24 horas.
13. Transcurrido el periodo de incubación, se transfirió la mezcla a un tubo cónico estéril de 15 mL.
14. Se agregó a la solución 1 mL de NaCl saturado y el tubo fue agitado vigorosamente.
15. Se centrifugó a 805 x g durante 15 minutos a 4 °C.
16. El sobrenadante se transfirió cuidadosamente a otro tubo cónico de 15 mL.
17. Se agregó un volumen de etanol al 100 % (frío) 2 veces igual al volumen de la muestra.
18. El tubo se agitó suavemente por inversión hasta observar una hebra blanca (DNA).
19. Se retiró el DNA precipitado con una pipeta Pasteur sellada de la punta y éste se lavó con etanol al 70 %.
20. El DNA adherido a la pipeta Pasteur se dejó secar a temperatura ambiente y luego se colocó en 150 μ L de solución amortiguadora TE contenidos en un tubo eppendorf estéril. El tubo se incubó a 37°C durante 20 minutos con la finalidad de incorporar la mayor cantidad posible de DNA a la solución amortiguadora.
21. Finalmente, se cuantificó el DNA de la muestra, preparando una dilución 1:200 (por duplicado), cuya absorbencia (A) se leyó a dos longitudes de onda: 260 y 280 nm. Así mismo, se determinó la pureza del DNA a través del cálculo del promedio de las lecturas de A a $\lambda = 260$ nm.

Nota: Los valores de pureza de las muestras de DNA se encuentran dentro del intervalo de 1.8-2.0.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Esta técnica fue empleada para amplificar *in vitro* el exón 4 del gen HNF-4 α de cada una de las muestras de DNA de los alumnos. En el proceso, las cadenas individuales de DNA son flanqueadas por oligonucleótidos específicos y son duplicadas por una DNA polimerasa en cada uno de los ciclos que integran la reacción. Al final de cada ciclo, las nuevas cadenas son duplicadas por la misma enzima, lográndose una producción exponencial de millones de copias del segmento de DNA.

Reactivos de la mezcla de reacción de cada muestra:

- Taq Polimerasa (Promega Lab.)
- Solución de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) 1 mM
- Solución amortiguadora 10 x
- DNA genómico humano
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Oligonucleótidos de sentido y antisentido (5' y 3')

Oligonucleótidos utilizados en la reacción

Gen	Exón	Secuencia de nucleótidos	Sentido	Talla del exón	Temperatura de alineación
HNF-4 α	4	CCACCCCTACTCCATCCCTGT	5'-3'	271 pb	68°C
		CCCTCCCGTCAGCTGCTCCA	3'-5'		

Procedimiento:

La reacción se realizó en un termociclador y el proceso consistió en una serie de 25 ciclos, cada uno de los cuales constaba de tres pasos:

- 1) Desnaturalización del templado de DNA (95°C, 30 segundos), procedimiento en el que las hebras de la doble hélice del DNA se separan.
- 2) Alineamiento, en el cual los oligonucleótidos se hibridan específicamente con el templado de DNA (68° C, 30 segundos)
- 3) Polimerización, en la que los oligonucleótidos son extendidos por la DNA polimerasa (72° C, 30 segundos).

Al término del proceso, se realizó un corrimiento electroforético (80 Voltios, 1 hora) de las muestras en gel de agarosa al 1 % (solución amortiguadora TBE 1 x) teñido con bromuro

de etidio, para verificar la amplificación y talla del exón. Las bandas resultantes fueron observadas en un transiluminador UV.

Nota. Se incluyó un control positivo (muestra de DNA que tiene la mutación) y un control negativo (H₂O).

PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR (Kit Purificación de DNA, Roche Lab.)

Se llevó a cabo esta técnica con la finalidad de retirar los componentes residuales de la reacción que se encontraban en la mezcla y conservar en la solución únicamente los segmentos amplificados del exón 4 del gen HNF-4 α . Para ello, cada muestra fue procesada de la siguiente manera:

1. El tubo de PCR (componentes de la reacción + producto DNA) se ajustó a un volumen total de 100 μ L con H₂O destilada estéril.
2. Se agregaron 500 μ L de solución amortiguadora de unión.
3. Se mezcló la muestra (solución amortiguadora de unión + solución PCR)
4. Por otra parte, se colocó el tubo de filtrado dentro de un tubo colector.
5. Se transfirió la muestra (600 μ L) al tubo de filtrado.
6. Se centrifugó durante 60 segundos a 12552 x g en una microcentrífuga a 15–25°C.
7. Se retiró el tubo de filtrado y se desechó la solución filtrada.
8. El tubo de filtrado se colocó nuevamente dentro del tubo colector.
9. Se adicionaron 500 μ L de la solución amortiguadora de lavado en la parte superior del tubo de filtrado.
10. Se centrifugó durante 1 minuto a 12552 x g y se desechó la solución filtrada.
11. Nuevamente se colocó el tubo de filtrado en el tubo colector.
12. Se agregaron 200 μ L de la solución amortiguadora de lavado y el tubo se centrifugó durante 1 minuto a 12552 x g.
13. Se desechó la solución filtrada y el tubo colector.
14. El tubo de filtrado se colocó en un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL
15. Se agregaron 60 μ L de la solución amortiguadora de elución en el filtro del tubo y se centrifugó durante 90 segundos a 12938 x g para obtener el DNA puro en la solución filtrada.
16. Finalmente, se llevó a cabo un corrimiento electroforético (80 Voltios, 1 hora) de las muestras en gel de agarosa al 1 % (solución amortiguadora TBE 1 x) teñido con bromuro de etidio, para corroborar la presencia del producto amplificado mediante la observación, en un transiluminador UV, de las bandas correspondientes a la talla del exón.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron pruebas de t de Student y análisis de varianza de una vía, considerando un intervalo de confianza del 95%, de los datos obtenidos en las mediciones antropométricas y de los perfiles bioquímico y hormonal con respecto a la edad, género y genotipo de la población estudiada mediante el uso de los programas estadísticos siguientes:

- SPSS 10.0 for Windows, standard version. Copyright© SPSS Inc., 1989–1999.
- GraphPad Prism Version 2.01. Copyright© GraphPad Software Incorporated, 1994–1996.

VI. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en las evaluaciones del perfil bioquímico, hormonal y las mediciones antropométricas de los 100 estudiantes de la Facultad de Química se muestran en la tabla 2. En el proyecto participaron 23 hombres y 77 mujeres.

Tabla 2. Datos antropométricos, perfil bioquímico y hormonal de la población evaluada.

Parámetro	Valor promedio \pm error estándar (n = 100)	Valores de referencia
IMC (Kg/m ²)	23.01 \pm 0.34	<25
ICC	0.82 \pm 0.007	Hombres: <1.0 Mujeres: <0.85
[Glucosa] (mg/dL)	75.77 \pm 0.68	70-110
[Colesterol total] (mg/dL)	173.05 \pm 3.61	140-200
[Triglicéridos] (mg/dL)	80.96 \pm 4.53	30-150
[Insulina] (μ UI/mL)*	6.77 \pm 0.47	5-25
[Péptido C] (ng/mL)	1.57 \pm 0.11	1.1-3.2
[Cortisol] (μ g/dL)	13.13 \pm 0.50	5-25

* 1 Unidad Internacional de insulina = 43.3 μ g de insulina humana del estándar de referencia de la Organización Mundial de la Salud Código No. 60/304 que se emplea en el kit Insulina Coat-A-Count de Diagnostic Products Corporation [55]

En la tabla 3 se encuentran los datos proporcionados por los estudiantes acerca de sus costumbres y antecedentes familiares de diabetes mellitus.

Tabla 3. Costumbres y antecedentes familiares de diabetes mellitus de la población evaluada.

	Consumo de alcohol	Consumo de refresco		Consumo de cigarro	Realización de alguna actividad física	Antecedentes familiares de diabetes mellitus
		Coca-cola	Otros sabores			
Frecuencia (%)	41	44	34	26	58	67

n = 100

A continuación se presenta el análisis estadístico de los datos de las mediciones antropométricas y los valores de los parámetros determinados en las evaluaciones del perfil bioquímico y hormonal con respecto a la edad y género de la población.

MEDICIONES ANTROPOMÉTRICAS

A partir de los valores de índice de masa corporal (IMC) calculados, se utilizaron los siguientes criterios [56] para establecer el peso normal, sobrepeso u obesidad de los individuos evaluados:

	IMC (Kg/m ²)
Delgadez	<18.5
Peso normal	18.6 - 24.9
Sobrepeso	25.0 - 29.9
Obesidad	>30.0

El porcentaje de sujetos con peso normal fue del 75 %, mientras que el 21 % tuvo sobrepeso y el 4 %, obesidad.

La presencia de obesidad intra-abdominal fue determinada en los hombres cuyo valor de índice cintura-cadera (ICC) era mayor a 1.0 y en las mujeres con un ICC superior a 0.85, de acuerdo a lo que señala la Organización Mundial de la Salud [57].

De las 77 mujeres evaluadas, 19 tuvieron obesidad intra-abdominal (24.7%). En cambio, en ninguno de los 23 hombres se observó esta característica.

En relación al análisis estadístico que se llevó a cabo para evaluar el IMC de los alumnos de acuerdo a su edad, no se obtuvo una diferencia significativa. Sin embargo, se observó que este parámetro aumentó con respecto al incremento en la edad en los grupos de 18 a 21 años (Figura 4), aunque hubo una disminución en el valor promedio del IMC correspondiente al grupo de alumnos de 22 años.

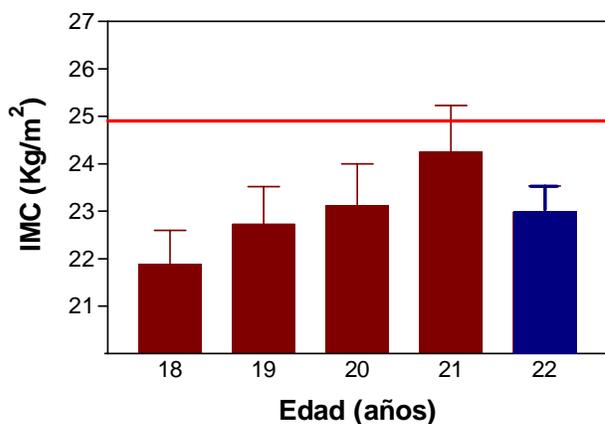
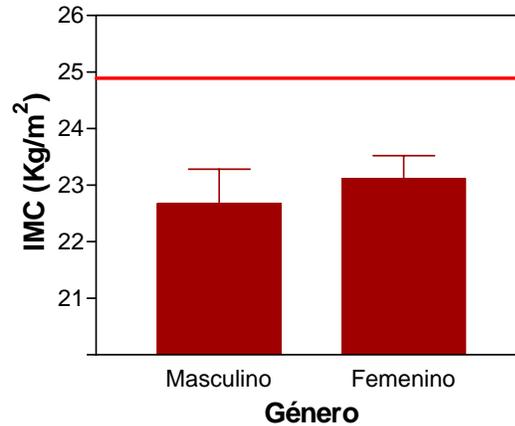


Figura 4. Índice de masa corporal (IMC) vs. Edad. Los datos están representados como el promedio \pm error estándar. Se realizó un análisis de varianza de una vía, en el cual un valor de $P < 0.05$ se consideró como significativo.

En lo que respecta a la comparación del índice de masa corporal entre géneros, el promedio del IMC del género femenino tuvo un valor mayor al del masculino, aún cuando la diferencia entre ambos no fue significativa (Figura 5).

Figura 5. Índice de masa corporal (IMC) vs. Género. Los datos están representados como el promedio \pm error estándar. Se realizó una prueba t de Student, en la cual un valor de $P < 0.05$ se consideró como significativo.



Debido a que los valores de referencia del índice cintura-cadera son distintos para el género masculino y el femenino, el análisis estadístico de este parámetro en relación a la edad se hizo por separado.

En la figura 6 se muestra el índice cintura-cadera del género masculino según la edad de los alumnos. Se observó un incremento en los valores de este parámetro en relación a aumento de la edad, aunque, en el grupo de individuos de 22 años, el valor fue menor en comparación con el del grupo de 21 años. La diferencia entre los grupos no fue significativa.

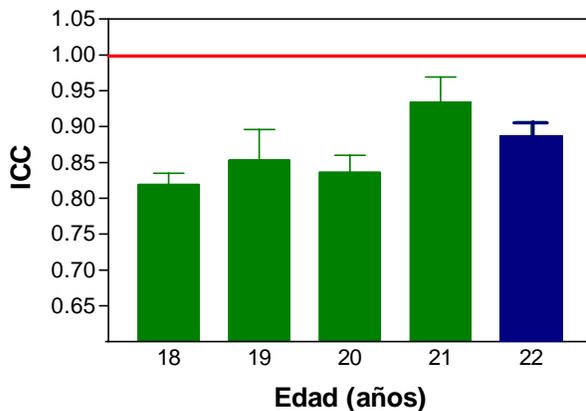
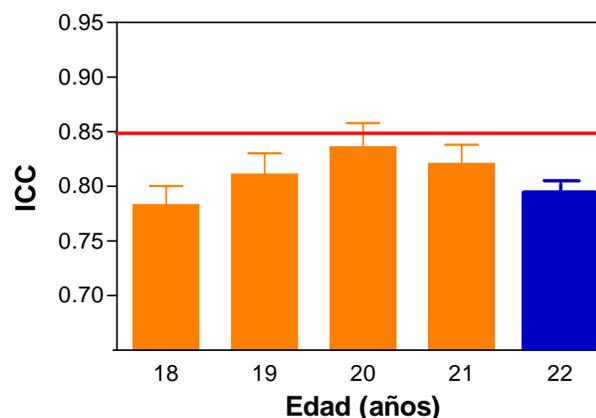


Figura 6. Índice cintura-cadera (ICC) del género masculino vs. Edad. Los datos están representados como el promedio \pm error estándar. Se realizó un análisis de varianza de una vía, en el cual un valor de $P < 0.05$ se consideró como significativo.

El valor promedio del índice cintura-cadera del género femenino que se determinó en cada edad evaluada mostró variaciones que no tuvieron tendencia alguna y cuya diferencia no fue significativa (Figura 7).

Figura 7. Índice cintura-cadera (ICC) del género femenino vs. Edad. Los datos están representados como el promedio \pm error estándar. Se realizó un análisis de varianza de una vía, en el cual un valor de $P < 0.05$ se consideró como significativo.



PERFIL BIOQUÍMICO

Los resultados de la determinación de las concentraciones de glucosa, colesterol total y triglicéridos se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Perfil bioquímico de la población de alumnos de la Facultad de Química.

Género	[Glucosa] (mg/dL)	[Colesterol] (mg/dL)	[Triglicéridos] (mg/dL)
Masculino	76.11 \pm 1.45	162.0 \pm 4.8	73.29 \pm 10.6
Femenino	73.65 \pm 0.78	161.6 \pm 2.5	80.29 \pm 4.7

Los datos están representados como el promedio \pm error estándar.

Todos los valores de concentración de glucosa determinados estuvieron dentro del intervalo normal (70–110 mg/dL). El 16% de los alumnos tuvieron concentraciones de colesterol superiores a 200 mg/dL. Por otra parte, el 9 % presentó niveles altos de triglicéridos (> 150 mg/dL).

En la comparación realizada entre los valores promedio de las concentraciones de glucosa correspondientes a cada edad, se obtuvo una diferencia significativa (ANOVA: $P = 0.042$), lo cual indicó la existencia de una relación directamente proporcional entre ambos parámetros, con excepción del valor que se determinó en la edad de 22 años (Figura 8). El incremento en las concentraciones promedio de glucosa del grupo de individuos de 18 años con respecto al de 21 años fue de 6.2 unidades.

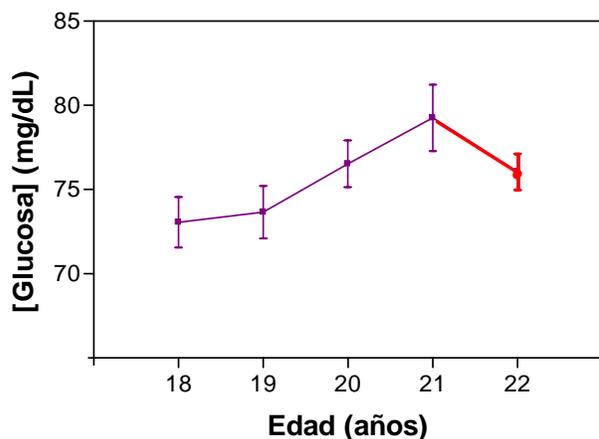
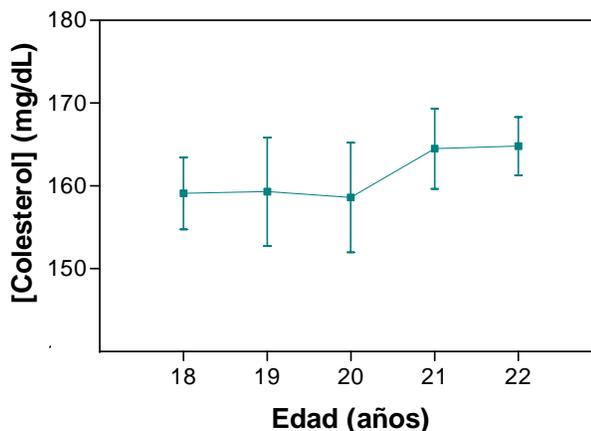


Figura 8. Concentración de glucosa vs. Edad. Los datos están representados como el promedio \pm error estándar. Se realizó un análisis de varianza de una vía, en el cual un valor de $P < 0.05$ se consideró como significativo.

También se realizó un análisis de la concentración de glucosa considerando tanto el género como la edad de los alumnos. Sin embargo, en ninguno de los casos se obtuvo una diferencia significativa.

Por otra parte, hubo un aumento en la concentración de colesterol total con respecto a la edad. Sin embargo, el valor de P que se obtuvo en el análisis estadístico no reveló un significado estadístico para las diferencias (Figura 9).

Figura 9. Concentración de colesterol total vs. Edad. Los datos están representados como el promedio \pm error estándar. Se realizó un análisis de varianza de una vía, en el cual un valor de $P < 0.05$ se consideró como significativo.



Al evaluar los valores promedio de las concentraciones de triglicéridos que se determinaron para cada edad, no se observó alguna tendencia y la diferencia entre los grupos no fue significativa (Figura 10).

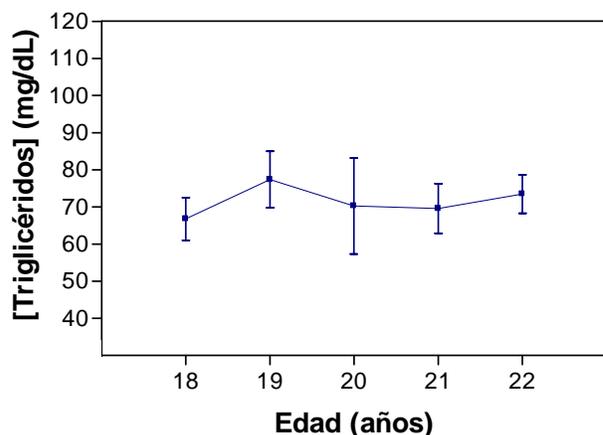


Figura 10. Concentración de triglicéridos vs. Edad. Los datos están representados como el promedio \pm error estándar. Se realizó un análisis de varianza de una vía, en el cual un valor de $P < 0.05$ se consideró como significativo.

En la evaluación que se efectuó para comparar las concentraciones de glucosa, colesterol total y triglicéridos entre el género masculino y femenino, los valores promedio de ambos grupos fueron semejantes y no se obtuvieron diferencias significativas.

PERFIL HORMONAL

En la tabla 5 se presentan los resultados de las concentraciones de insulina, péptido C y cortisol de los estudiantes.

Tabla 5. Perfil hormonal de la población evaluada de alumnos de la Facultad de Química.

Género	[Insulina] ($\mu\text{U}/\text{mL}$)	[Péptido C] (ng/mL)	[Cortisol] ($\mu\text{g}/\text{dL}$)
Masculino	5.75 ± 0.52	1.17 ± 0.09	13.81 ± 0.93
Femenino	6.70 ± 0.45	1.34 ± 0.08	12.48 ± 0.51

Los datos están representados como el promedio \pm error estándar.

Sólo se encontró un individuo cuya concentración de insulina fue mayor a $25 \mu\text{UI}/\text{mL}$; en cambio, el 35% de los estudiantes presentaron niveles inferiores a $5 \mu\text{UI}/\text{mL}$.

Con respecto a las concentraciones de péptido C que se determinaron, el 9% de la población tuvo valores mayores al límite superior normal ($3.2 \text{ ng}/\text{mL}$). Por el contrario, se obtuvieron valores inferiores a $1.1 \text{ ng}/\text{mL}$ en el 33 % de los sujetos.

En general, las concentraciones de cortisol estuvieron dentro del intervalo normal de variación del ritmo diurno a.m.: $5\text{--}25 \mu\text{g}/\text{dL}$. Sólo 3 personas tuvieron niveles bajos de cortisol y 2 presentaron concentraciones mayores a la del límite superior.

En relación a la concentración de insulina, se observó una relación inversamente proporcional entre la edad y los niveles de esta hormona (Figura 11); la diferencia entre los grupos fue significativa (ANOVA: $P = 0.015$).

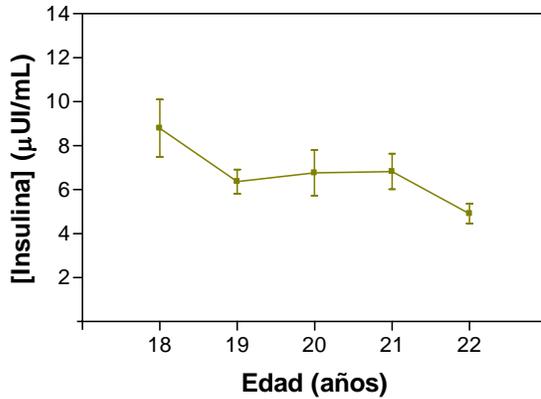
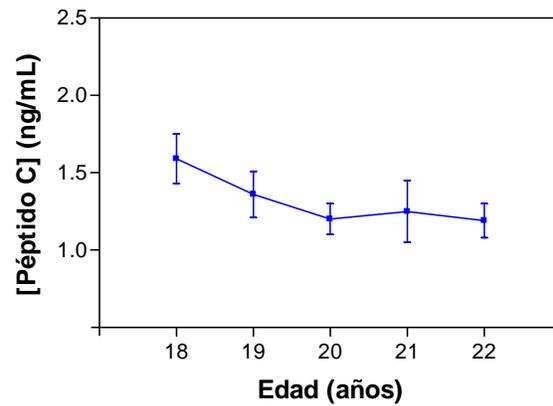


Figura 11. Concentración de insulina vs. Edad. Los datos están representados como el promedio \pm error estándar. Se realizó un análisis de varianza de una vía, en el cual un valor de $P < 0.05$ se consideró como significativo.

Se observó una disminución de los niveles de péptido C conforme aumentaba la edad (Figura 12), aunque en el análisis de varianza no se encontró una diferencia significativa.

Figura 12. Concentración de péptido C vs. Edad. Los datos están representados como el promedio \pm error estándar. Se realizó un análisis de varianza de una vía, en el cual un valor de $P < 0.05$ se consideró como significativo.



De acuerdo a lo que se muestra en la figura 13, se notó una disminución de los valores promedio de las concentraciones de cortisol con respecto al aumento de la edad, pese a que la diferencia no fue significativa.

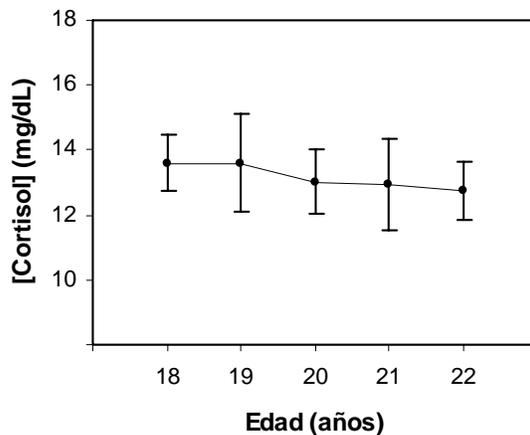


Figura 13. Concentración de cortisol vs. Edad. Los datos están representados como el promedio \pm error estándar. Se realizó un análisis de varianza de una vía, en el cual un valor de $P < 0.05$ se consideró como significativo.

Adicionalmente, se realizaron comparaciones de los valores promedio de las concentraciones de insulina, péptido C y cortisol entre los géneros masculino y femenino, en las cuales no se obtuvieron diferencias significativas.

EVALUACIÓN GENÉTICO-MOLECULAR

Los geles de agarosa que se prepararon al realizar las técnicas de amplificación por PCR del exón 4 del gen HNF-4 α , purificación de los productos de PCR y RFLP fueron observados en un transiluminador UV y fotografiados con una cámara instantánea Polaroid para geles. A continuación se presentan las fotografías correspondientes a cada una de las técnicas mencionadas.

Con la finalidad de verificar la amplificación y talla del exón (271 pb), se realizó una electroforesis en la cual se observó el corrimiento de las bandas correspondientes a los productos de PCR de las muestras de DNA. Algunas de éstas se presentan en la figura 14.

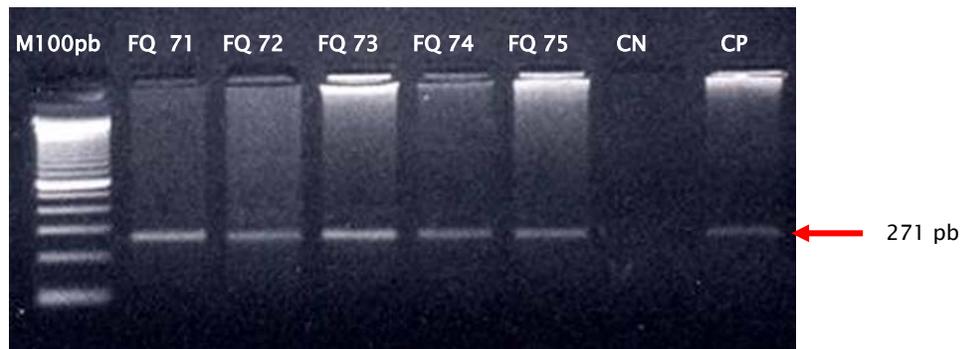


Figura 14. Fotografía de uno de los geles preparados en la técnica de PCR. Gel de agarosa al 1% en TBE 1x, teñido con bromuro de etidio. Voltaje = 80 V. Tiempo de corrimiento = 1 h. M 100 pb = marcador de 100 pares de bases; CN = control negativo; CP = control positivo.

Posteriormente, se llevó a cabo la técnica de purificación de los productos de PCR en la cual se eliminaron los componentes residuales de la reacción para obtener en solución únicamente al DNA y se realizó un corrimiento electroforético de las muestras purificadas con el objetivo de verificar la presencia del producto amplificado. Las bandas que se observan en la figura 15 corresponden al DNA puro que se obtuvo al finalizar la técnica.

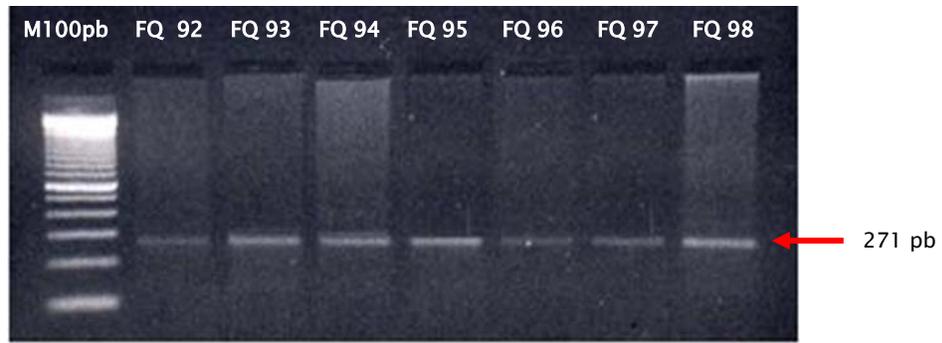


Figura 15. Fotografía de uno de los geles preparados en la técnica de purificación de los productos de PCR. Gel de agarosa al 1% en TBE 1x, teñido con bromuro de etidio. Voltaje = 80 V. Tiempo de corrimiento = 1 h. M 100 pb = marcador de 100 pares de bases.

Finalmente, se detectó la presencia de la mutación T130I a través del análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). En las muestras que presentaron el polimorfismo se observaron 3 bandas de 271, 190 y 81 pares de bases, generadas a partir del corte enzimático (Enzima Sfu 1) del alelo ATT (Figura 16), lo cual indicó que los portadores de la variante T130I fueron heterocigotos para el locus.



Figura 16. Fotografía de uno de los geles preparados en la técnica de RFLP. Gel de agarosa al 3% en TBE 1x, teñido con bromuro de etidio. Voltaje = 80 V. Tiempo de corrimiento = 1 h. Marcador: φx174. CN = control negativo; CP = control positivo.

Se confirmó que los portadores de la mutación T130I fueron heterocigotos mediante la técnica de secuenciación automática. En la figura 17 se señalan, con una flecha roja, los dos picos correspondientes a las bases citosina (alelo silvestre: ACT) y timina (alelo mutado: ATT).

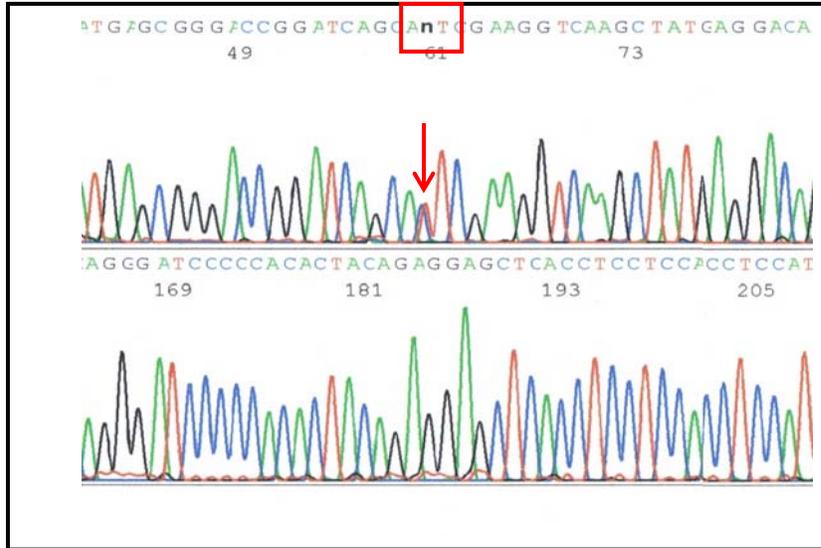


Figura 17. Secuenciación automática de la muestra de DNA de uno de los alumnos que presentó el polimorfismo T130I del gen HNF-4 α .

La variante T130I fue identificada en el 5% de la población. Todos los portadores de la mutación T130I fueron heterocigotos. En la tabla 6 se muestran las características fenotípicas de estas 5 personas.

Tabla 6. Datos antropométricos, perfil bioquímico y hormonal de los alumnos que tuvieron el polimorfismo T130I del gen HNF-4 α .

No.	Edad (años)	Género	IMC (Kg/m ²)	ICC	[Glucosa] (mg/dL)	[Colesterol] (mg/dL)	[Triglicéridos] (mg/dL)	[Insulina] (μ UI/mL)	[Péptido C] (ng/mL)	[Cortisol] (μ g/dL)
1	22	F	21.4	0.732	75.8	179.8	107.6	6.4	1.82	8.8
2	19	F	23.3	0.787	71.9	200.8	188.5	4.0	3.44	15.4
3	19	F	19.8	0.882	70.8	169.5	60.5	8.5	1.26	12.2
4	22	M	21.3	0.968	67.0	193.7	50.3	4.0	0.55	8.5
5	19	F	22.3	0.719	67.5	164.1	63.4	10.7	2.04	9.4

F = femenino, M = masculino.

Valores normales: IMC = 18.5–24.9; ICC = Hombres < 1.0, Mujeres < 0.85; [Glucosa] = 70–110 mg/dL; [Colesterol] = 140–200 mg/dL ; [Triglicéridos] = 30–150 mg/dL ; [Insulina] = 5–25 μ UI/mL ; [Péptido C] = 1.1–3.2 ng/mL ; [Cortisol] a.m. = 5–25 μ g/dL.

En lo que se refiere a los datos antropométricos, ninguno de los portadores del polimorfismo T130I tuvo sobrepeso u obesidad y sólo una mujer (No. 3) presentó obesidad intra-abdominal.

Tres de las concentraciones de glucosa estuvieron dentro del intervalo normal y dos de ellas se encontraron por debajo del límite inferior. Únicamente una persona (No. 2) tuvo concentraciones de colesterol total y triglicéridos mayores a la de los límites superiores normales correspondientes.

Dos sujetos presentaron bajas concentraciones de insulina ($<5.0 \mu\text{UI}/\text{mL}$). Sólo un individuo tuvo niveles bajos de péptido C, mientras que a la persona No. 2 se le determinó una concentración mayor a la del límite superior ($3.2 \text{ ng}/\text{mL}$). Todos los valores de las concentraciones de cortisol se encontraron dentro del intervalo de referencia.

Se llevó a cabo un análisis estadístico para comparar los datos de las mediciones antropométricas, del perfil bioquímico y del hormonal de las personas que presentaron el polimorfismo T130I del gen HNF-4 α con respecto a los valores de aquellas personas que no tuvieron esta variante.

■ Medidas antropométricas

Se observó que la diferencia entre el valor promedio del IMC de los alumnos que no presentaron el polimorfismo T130I y el de aquellos que sí lo tuvieron no fue significativa; sin embargo, se obtuvo un valor superior en aquellos individuos sin la variante (Figura 18).

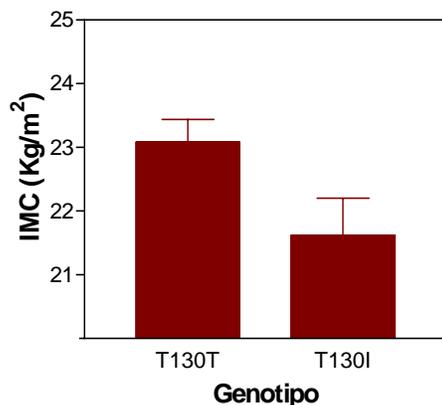


Figura 18. Índice de masa corporal (IMC) vs. Genotipo. Los datos están representados como el promedio \pm error estándar. Se realizó una prueba t de Student, en la cual un valor de $P < 0.05$ se consideró como significativo.

De acuerdo a lo que se determinó en la comparación entre el valor promedio del ICC del género masculino, el ICC del sujeto que presentó la variante T130I fue mayor con respecto al de aquellos que no presentaron el polimorfismo, aunque la diferencia entre ambos grupos no fue significativa. (Figura 19). En lo relacionado al ICC del género

femenino, se obtuvo un valor promedio de ICC mayor en el grupo que no tuvo el polimorfismo en comparación con el que sí presentó la variante. Sin embargo, no hubo diferencia significativa entre ellos (Figura 20).

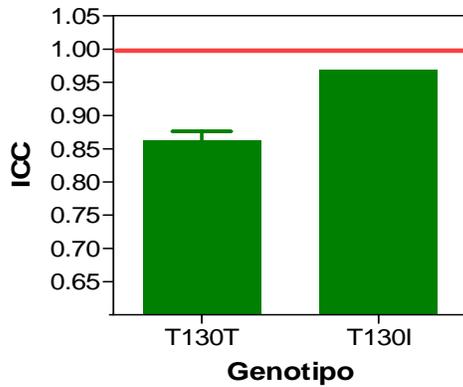


Figura 19. Índice cintura-cadera (ICC) del género masculino vs. Genotipo. Los datos están representados como el promedio \pm error estándar. Se realizó una prueba t de Student, en la cual un valor de $P < 0.05$ se consideró como significativo.

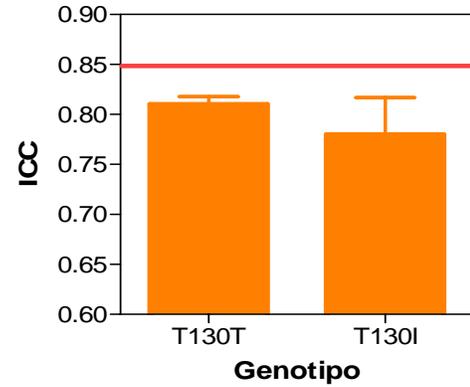
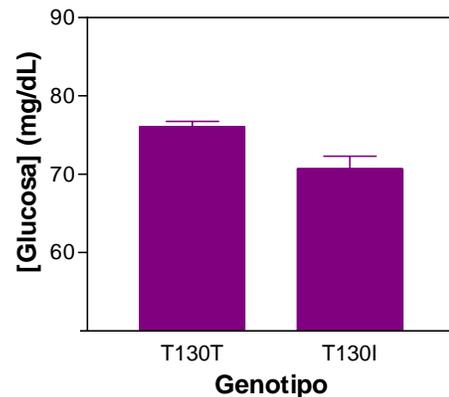


Figura 20. Índice cintura-cadera (ICC) del género femenino vs. Genotipo. Los datos están representados como el promedio \pm error estándar. Se realizó una prueba t de Student, en la cual un valor de $P < 0.05$ se consideró como significativo.

Perfil bioquímico

Al efectuar la comparación entre los valores promedio de las concentraciones de glucosa se notó que el valor correspondiente al grupo que presentó la variante T130I fue menor en relación al del grupo sin el polimorfismo. Pese a ello, no se obtuvo una diferencia significativa (Figura 21).

Figura 21. Concentración de glucosa vs. Genotipo. Los datos están representados como el promedio \pm error estándar. Se realizó una prueba t de Student, en la cual un valor de $P < 0.05$ se consideró como significativo.



En lo que respecta a las concentraciones de colesterol total, los valores promedio del grupo de individuos con el polimorfismo evaluado y del grupo que no lo presentó fueron semejantes; no se obtuvo una diferencia significativa al realizar la comparación de ambos (Figura 22).

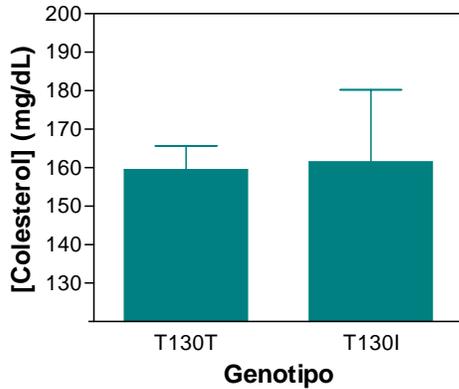
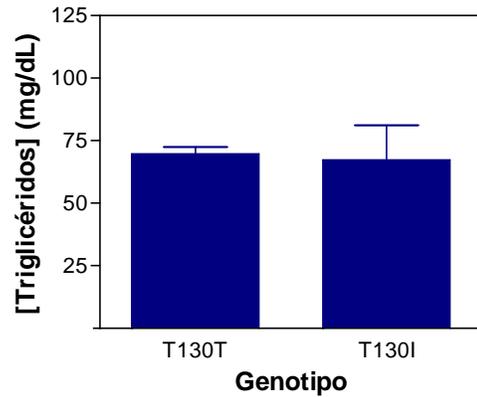


Figura 22. Concentración de colesterol total vs. Genotipo. Los datos están representados como el promedio \pm error estándar. Se realizó una prueba t de Student, en la cual un valor de $P < 0.05$ se consideró como significativo.

El promedio de los niveles de triglicéridos en las personas cuyo genotipo fue determinado como T130T (sin la variante) fue mayor en comparación con el de los individuos que presentaron el polimorfismo T130I, aún cuando no se obtuvo una diferencia significativa (Figura 23).

Figura 23. Concentración de triglicéridos vs. Genotipo. Los datos están representados como el promedio \pm error estándar. Se realizó una prueba t de Student, en la cual un valor de $P < 0.05$ se consideró como significativo.



Perfil Hormonal

Los promedios de las concentraciones de insulina del grupo que presentó la variante T130I y del grupo sin el polimorfismo, tuvieron valores semejantes y su diferencia no fue significativa (Figura 24).

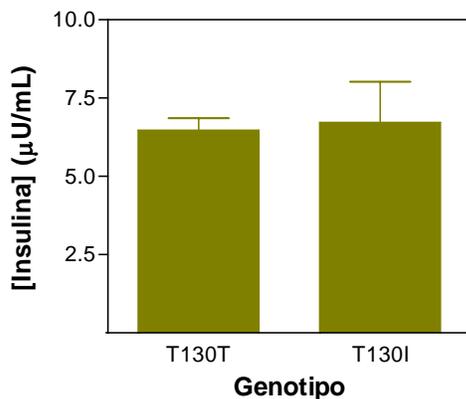
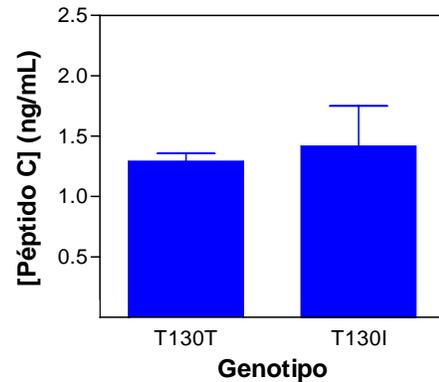


Figura 24. Concentración de insulina vs. Genotipo. Los datos están representados como el promedio \pm error estándar. Se realizó una prueba t de Student, en la cual un valor de $P < 0.05$ se consideró como significativo.

El análisis estadístico indicó que no hubo diferencia significativa entre los valores promedio de las concentraciones de péptido C de los genotipos evaluados aunque se observó que el valor de la población que tuvo la variante T130I fue mayor (Figura 25).

Figura 25. Concentración de péptido C vs. Genotipo. Los datos están representados como el promedio \pm error estándar. Se realizó una prueba t de Student, en la cual un valor de $P < 0.05$ se consideró como significativo.



El promedio de las concentraciones de cortisol de los sujetos que presentaron el polimorfismo T130I tuvo un valor mayor al de aquellos sin la variante. Sin embargo, la diferencia no fue significativa (Figura 26).

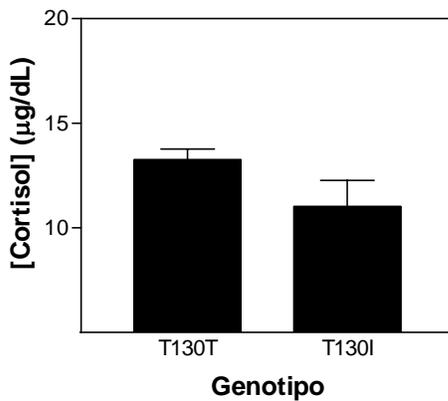


Figura 26. Concentración de cortisol vs. Genotipo. Los datos están representados como el promedio \pm error estándar. Se realizó una prueba t de Student, en la cual un valor de $P < 0.05$ se consideró como significativo.

Finalmente, en la figura 27 se representan las frecuencias génicas del polimorfismo T130I de las poblaciones japonesa, danesa y mexicana. En esta última se encuentra la frecuencia obtenida en la evaluación de los alumnos de la Facultad de Química, cuyo valor es semejante al determinado en sujetos control mexicanos.

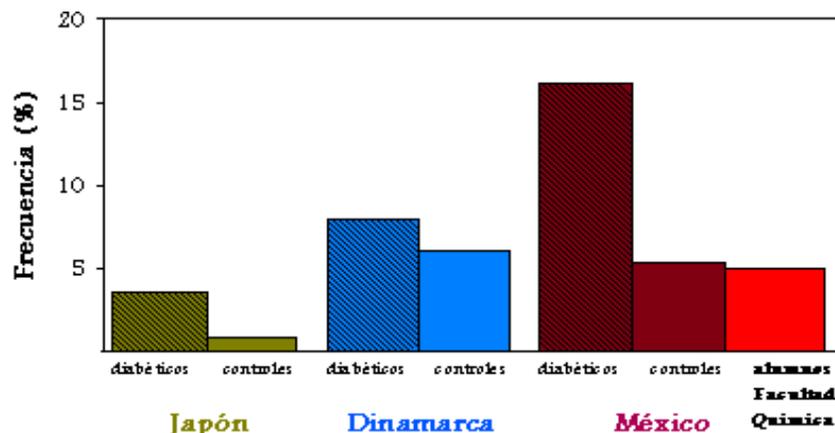


Figura 26. Frecuencias génicas (%) del polimorfismo T130I en las poblaciones japonesa, danesa y mexicana.

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La asociación del polimorfismo T130I del gen HNF-4 α con la diabetes mellitus tipo 2 en varias poblaciones y la alta prevalencia en pacientes diabéticos mexicanos sugieren que su presencia incrementa el riesgo de padecer esta forma de diabetes. En este estudio se determinó la frecuencia de dicha variante en una población de 100 estudiantes de la Facultad de Química.

La importancia de evaluar la presencia de la variante T130I como factor de riesgo de diabetes mellitus tipo 2 en la juventud radica en el reciente incremento en la incidencia de esta enfermedad en dicha población. Se ha reportado que alrededor del 30% de los casos de diabetes se presentan en la segunda década de la vida y en México, aproximadamente el 15% de los pacientes diabéticos tipo 2 son diagnosticados entre los 20 y los 40 años de edad [4-6]. Además, de acuerdo al Instituto Nacional de Geografía, el 40% de la población mexicana está constituida por niños y en los próximos 10 años, 50 millones de mexicanos serán jóvenes, por lo que este tipo de estudios permite conocer parte del fondo diabetogénico y de los factores de riesgo ambientales que contribuyen al desarrollo de diabetes mellitus en la población juvenil de nuestro país.

Para obtener una muestra representativa de la comunidad de la Facultad de Química, se reclutaron 100 alumnos de manera aleatoria. El único requisito que se les solicitó fue que contaran con una edad entre los 18 y 22 años debido a que éste es el período regular en el cual se lleva a cabo el estudio de las distintas carreras que se imparten en la Facultad.

Con la finalidad de realizar un análisis integral de la susceptibilidad genética y ambiental de desarrollar diabetes mellitus tipo 2, las características fenotípicas que fueron evaluadas en la población, incluyeron algunas de las condiciones y factores involucrados en esta enfermedad.

El aumento en la obesidad puede ser una razón importante para el incremento de diabetes tipo 2 en la juventud [5]. La obesidad se estableció en base a la medida más común que se emplea: el índice de masa corporal (IMC). La prevalencia de sobrepeso y obesidad de los 100 estudiantes fue baja en comparación con lo reportado en la ENSA 2000, en la cual se especifica que el 33.3% de los jóvenes mexicanos menores de 29 años tienen sobrepeso y el 14.4% tiene obesidad [2]. Sin embargo, se notó un incremento del IMC con respecto a la edad en el intervalo de 18 a 21 años, lo cual es relevante ya que en el período en el cual se cursa la carrera, el IMC aumenta 2.4 unidades, ubicando a los alumnos de los últimos semestres en el límite entre el peso normal y el sobrepeso.

Generalmente las mujeres tienen un mayor porcentaje de grasa corporal en relación al de los hombres [2,58], lo cual se reflejó en la comparación del IMC realizada entre los dos géneros. La obesidad representa un factor de riesgo para las mujeres puesto que las predispone para el desarrollo de diabetes mellitus gestacional.

La obesidad intra-abdominal, determinada por el índice cintura-cadera (ICC), está asociada con el incremento en la susceptibilidad de desarrollar diabetes [21]. Se observó un mayor índice cintura-cadera con respecto a la edad en el género masculino al compararlo con el ICC del género femenino. Esta diferencia se debe a que las mujeres acumulan mayor grasa en la región glúteo-femoral, mientras que los hombres la acumulan en el la región abdominal [58].

Por otra parte, el perfil bioquímico de la población mostró que ninguno de los alumnos tuvo concentraciones de glucosa superiores a 110 mg/dL. Sin embargo, la asociación significativa (ANOVA: $P = 0.042$) de la variación en los niveles de glucosa a lo largo del tiempo en el que se cursa la carrera en la Facultad de Química indicó que, aún cuando no se detectó diabetes en ninguno de ellos, los estudiantes empiezan a tener alteraciones en el metabolismo de carbohidratos a una edad temprana. Este hecho constituye un factor de riesgo para el desarrollo de diabetes mellitus y es importante dado que las personas jóvenes que presentan dicha enfermedad se exponen por mayor tiempo a los efectos adversos de la hiperglucemia y tienen más probabilidades de padecer las complicaciones crónicas [2].

Al igual que lo observado en las mediciones antropométricas IMC e ICC, el valor promedio de las concentraciones de glucosa de los individuos de 22 años fue menor en comparación con el del grupo de 21 años. Una posible justificación de este hecho es que en esta etapa los alumnos están finalizando la carrera y tienen mayor tiempo disponible para realizar otras actividades que no estén involucradas con sus estudios, por ejemplo, el ejercicio. El 70% de los sujetos de 22 años lleva a cabo actividades deportivas, en contraste con el grupo de 21 años, en el cual sólo el 40% de ellos practica algún deporte. Además, a la edad de 22 años, la mayoría de los alumnos sólo cursan un semestre en la Facultad, por lo cual no se está evaluando el año completo.

En varios estudios realizados en adultos, se ha demostrado que algunos de los beneficios potenciales que se pueden obtener mediante el ejercicio incluyen la disminución en la grasa intra-abdominal, glucosa rápida y ácidos grasos libres, así como el incremento en la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa. En jóvenes, por lo menos en dos estudios se ha demostrado un efecto positivo del ejercicio en la disminución de la concentración de insulina rápida y la estabilización de la acumulación de grasa visceral [5].

La población evaluada tuvo una alta prevalencia de hipercolesterolemia (16%), porcentaje semejante al reportado por Aguilar-Salinas y colaboradores [59], cuyo trabajo

indica que el **13.9%** de la población mexicana adulta de 20 a 29 años tiene niveles altos de colesterol. Además, se observó un incremento de las concentraciones de colesterol en relación a la edad de los estudiantes, aunque no se determinó una diferencia significativa. Por otra parte, el 9% de los alumnos de la Facultad de Química tuvo hipertrigliceridemia. Dicho porcentaje es menor al que obtuvieron Aguilar-Salinas y colaboradores (**26.8%** de la población mexicana adulta de 20 a 29 años). En este caso, las concentraciones de triglicéridos con respecto a la edad tampoco tuvieron diferencias significativas.

Las alteraciones en el perfil lipídico son consecuencia, en parte, del aporte energético excesivo a través de la dieta [23]. Esto indica que los individuos que tuvieron hiperlipidemia tienen la costumbre de consumir alimentos que poseen altas cantidades de carbohidratos. En este sentido, el 87% de los alumnos con este desorden toman refresco regularmente, de los cuales el 65% consumen Coca-cola (bebida con una gran proporción de azúcar). Así, el aumento del colesterol podría estar relacionado con la dieta, además de otros factores ambientales como la obesidad, el sedentarismo y el estrés.

En el análisis comparativo de las concentraciones de glucosa, colesterol y triglicéridos entre el género masculino y el femenino no se obtuvo una diferencia significativa, lo cual indicó que ambos grupos mantienen un estilo de vida y dieta homogéneos.

La evaluación del perfil hormonal comprendió la determinación de los niveles de insulina, péptido C y cortisol.

La baja sensibilidad a la insulina y la secreción deficiente de la hormona son condiciones que representan una mayor probabilidad de desarrollar diabetes tipo 2. En jóvenes, en estudios recientes se sugiere que niveles altos de insulina están asociados con una baja sensibilidad a la insulina en edades tempranas [5]. La relación entre la concentración de insulina y la edad fue significativa (ANOVA: $P = 0.015$). Los niveles de la hormona disminuyeron conforme al aumento de edad, lo cual podría correlacionarse con el incremento observado en las concentraciones de glucosa. Se esperaría que los niveles altos de glucosa en sangre provocaran una elevación en los niveles de insulina. Además, se observó una disminución de las concentraciones de péptido C con respecto a la edad de los individuos, aunque la diferencia no fue significativa (ANOVA: $P = 0.077$). Probablemente, al aumentar el número de individuos se podría alcanzar un valor de P menor a 0.05, lo cual indicaría una diferencia significativa.

En este estudio, sólo un alumno presentó hiperinsulinemia, por lo cual no es posible considerar a la resistencia a la insulina como una condición que confiera susceptibilidad de desarrollar diabetes en el grupo estudiado.

Estos resultados fueron consistentes con lo encontrado en el estudio que se llevó a cabo en jóvenes diabéticos. En dicha evaluación se obtuvo una ausencia de resistencia a la insulina en la mayoría de los casos y una alta prevalencia de deficiencia de insulina, sugiriendo que esta última era la principal anormalidad responsable de la presencia

prematura de diabetes en los jóvenes mexicanos con diabetes mellitus tipo 2 de inicio temprano [6].

Debido a la relevancia del papel de la insulina en el metabolismo de carbohidratos y la patología de la diabetes, este es un punto que deberá investigarse a fondo con un número mayor de alumnos.

Por otra parte, se cuantificaron las concentraciones de cortisol para evaluar al estrés crónico como factor de riesgo de diabetes mellitus. Se cree que los alumnos se encuentran estresados constantemente debido a que, generalmente, la carga de trabajo que se tiene durante el estudio de la carrera es excesiva y además va aumentando de acuerdo al avance en los semestres. Por lo tanto, se esperaba obtener una elevación en las concentraciones de cortisol con respecto a la edad. No obstante, en el análisis de los datos se observó lo contrario y, además, las variaciones entre los valores promedio de las distintas edades fueron mínimas. Es posible que en la etapa en la cual se llevó a cabo la toma de muestra, inicio del semestre, no se haya reflejado el estrés de los individuos en los niveles de cortisol ya que en este período la carga de trabajo es menor, al contrario de lo que sucede al final del semestre.

En ninguno de los tres parámetros evaluados en el perfil hormonal se obtuvo una asociación significativa en la comparación entre géneros, indicando que en el período de 18 a 22 años no hay diferencias notables entre los hombres y las mujeres y que ambos grupos mantienen un estilo de vida y dieta homogéneos, como se mencionó con anterioridad.

En lo que se refiere al estilo de vida y costumbres de los alumnos, las características que se consideraron como factores de susceptibilidad para el desarrollo de diabetes incluyeron el consumo de alcohol, cigarro, refresco, la realización de actividades deportivas y los antecedentes familiares de diabetes mellitus.

La influencia de la ingesta de alcohol sobre el riesgo de padecer diabetes tipo 2 no está clara todavía, aunque se piensa que el exceso en su consumo podría aumentar las probabilidades de desarrollar la enfermedad [60]. Los efectos diabetogénicos de la alta ingesta de alcohol incluyen su contribución al consumo calórico elevado y obesidad, inducción de pancreatitis, alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, deficiencia de la función hepática y disminución de la captación de glucosa mediada por la insulina [61]. El 47% de los alumnos consumen alcohol aunque, en general, no lo hacen con demasiada frecuencia ni en grandes cantidades; la gran mayoría refirió tomar alcohol únicamente los fines de semana. Por lo tanto, el consumo de alcohol como factor de riesgo de desarrollo de diabetes no está presente durante el período en el cual se estudia la carrera.

El consumo de cigarro disminuye la sensibilidad a la insulina y favorece el desarrollo de hiperinsulinemia [62]. Sin embargo, los niveles de insulina entre los fumadores de la población evaluada, no tuvieron algún cambio o tendencia.

En un estudio realizado en sujetos jóvenes se sugiere que la glucosa y la respuesta en la liberación de la insulina pueden estar en función de la interacción entre la obesidad y el consumo de refresco [5]. El porcentaje de alumnos que toman refresco es elevado (78%) y, de éstos, el 25% de ellos tiene sobrepeso u obesidad. Este fenómeno señala que la selección de una dieta apropiada y un estilo de vida sano son fundamentales para mantener el buen estado de salud.

Un elevado porcentaje de los alumnos tiene antecedentes familiares de diabetes (67%), razón por lo cual estos sujetos tienen un mayor riesgo de padecer diabetes debido al carácter hereditario reconocido en esta enfermedad. No obstante, en el desarrollo de este desorden también participan factores ambientales, como los que se describieron anteriormente. Por lo tanto, es posible prevenir o, al menos, retardar la aparición de la diabetes si se modifica la dieta y la inactividad física. En estudios recientes de intervención en adultos se ha demostrado que el ejercicio y una dieta saludable pueden reducir los riesgos e incidencia de la diabetes y sugieren que el efecto de la intervención en el estilo de vida es mejor que la terapia farmacológica. En gente joven, se pueden obtener beneficios a largo plazo si se inicia tempranamente un estilo de vida sano [5].

Se encontró el polimorfismo T130I del gen HNF-4 α en los jóvenes de la Facultad de Química y su frecuencia génica fue ligeramente menor a la reportada en sujetos control mexicanos mayores de 60 años (5.0% vs. 5.4%). Se esperaba obtener un porcentaje intermedio entre el de los controles y el de los diabéticos tipo 2 (16.0%) porque en éste están incluidos aquellos alumnos que no serán diabéticos y los que sí desarrollarán la enfermedad. Aún así, el porcentaje obtenido fue superior al encontrado en sujetos control y diabéticos de Japón. Además, en México está reportada la frecuencia más alta del polimorfismo T130I que se ha detectado en el mundo y la primera asociación con diabetes mellitus tipo 2 de inicio temprano. Por lo tanto, los alumnos que poseen esta variante tienen un factor de riesgo adicional para el desarrollo de diabetes.

En la comparación realizada entre los individuos en los que se detectó la presencia del polimorfismo T130I y aquellos sujetos sin la variante, no se encontró ninguna diferencia significativa en el IMC, concentraciones de glucosa, colesterol total y triglicéridos. En el estudio que se realizó en japoneses tampoco se obtuvo una asociación significativa de estos parámetros con respecto al genotipo [10]. Sin embargo, en la evaluación que se hizo en sujetos daneses se encontró que los portadores de la mutación tuvieron niveles inferiores de colesterol en comparación con aquellos sin la variante [11], lo cual no sucedió en la población de estudiantes ya que los niveles de colesterol de los alumnos con el polimorfismo fueron ligeramente superiores a los del grupo que no lo presentó.

Hubo una secreción variable de insulina entre los alumnos que presentaron la mutación T130I, situación que también se presentó en el estudio realizado por Zhu y colaboradores [10]. Esto indica que es necesario realizar más estudios para evaluar la secreción de insulina en un número mayor de portadores del polimorfismo T130I, o bien, considerar que no existe una vinculación directa entre este fenómeno y la presencia de la mutación.

Es comprensible que en la muestra evaluada en la Facultad de Química, los alumnos con el polimorfismo T130I no presenten cambios bioquímicos importantes por las siguientes razones:

a) La variante T130I fue encontrada de manera heterocigota en los 5 estudiantes, es decir, sólo se detectó en uno de los dos alelos del gen HNF-4 α . Por lo tanto, es probable que las alteraciones provocadas por este defecto genético estén compensadas por el alelo silvestre,

b) Se trata de un polimorfismo que se asocia al aumento de la susceptibilidad de desarrollar diabetes mellitus y

c) Debe considerarse que los sujetos son jóvenes, razón por la cual aún no es posible notar los efectos metabólicos asociados en caso de que los alumnos presenten daño pancreático.

En conjunto, las características genotípicas y fenotípicas evaluadas mostraron que los alumnos tienen un riesgo potencial de desarrollar la enfermedad debido al hallazgo del polimorfismo T130I con una frecuencia semejante e incluso mayor a la de otras poblaciones (danesa y japonesa, respectivamente) y a que, adicionalmente, en los 100 alumnos evaluados se observó un incremento significativo en las concentraciones de glucosa y una deficiencia en la secreción de insulina. El estilo de vida que se lleva en la Facultad y los efectos de éste sobre la salud de los estudiantes indican que es necesario tomar medidas correctivas y preventivas que disminuyan las probabilidades de desarrollar diabetes, como modificaciones en la dieta y el desarrollo de programas escolares que promuevan el ejercicio.

VIII. CONCLUSIONES

- El polimorfismo T130I del gen HNF-4 α que se encontró en los jóvenes de la Facultad de Química, tuvo una frecuencia semejante a lo reportado para la población adulta mexicana, lo cual sugiere un fondo genético de susceptibilidad de diabetes mellitus.
- Se detectaron factores de riesgo de tipo ambiental que conducen a la alteración de los niveles de glucosa e insulina en los alumnos de la Facultad, los cuales incrementan el riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Permutt MA, Wasson J, Cox N. *Genetic epidemiology of diabetes*. The Journal of Clinical Investigation 2005; 115: 1431–1439.
2. Olaiz G, Rojas R, Barquera S, Shamah T, Aguilar C, Cravioto P, López P, Hernández M, Tapia R, Sepúlveda J. *Encuesta nacional de salud 2000. Tomo 2. La salud de los adultos*. Instituto Nacional de Salud Pública 2003.
3. Landeros EA. *El panorama epidemiológico de la diabetes mellitus*. Revista Mexicana de Enfermería Cardiológica 2000; 8: 56–59.
4. Bell R. *Search for diabetes in youth: a multicenter study of the prevalence, incidence and classification of diabetes mellitus in youth*. Controlled Clinical Trials 2004; 25: 458–471.
5. Huang TT-K, Goran MI. *Prevention of type 2 diabetes in young people: a theoretical perspective*. Pediatric Diabetes 2003; 4: 38–56.
6. Aguilar-Salinas C, Reyes-Rodríguez E, Ordoñez-Sánchez ML, Arellano-Torres M, Ramírez-Jiménez S, Domínguez-López A, Martínez-Francois JR, Velasco-Pérez ML, Alpizar M, García-García E, Gómez-Pérez F, Rull J, Tusié-Luna MT. *Early-onset type 2 diabetes: metabolic and genetic characterization in the mexican population*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2001; 86: 220–226.
7. Tusié MT. *La genética de la diabetes mellitus tipo 2: genes implicados en la diabetes de aparición temprana*. La Revista de Investigación Clínica 2000; 52: 296–305.
8. Bagwell AM, Bailly A, Mychaleckyj JC, Freedman BI, Bowden DW. *Comparative genomic analysis of the HNF-4 α transcription factor gene*. Molecular Genetics and Metabolism 2004; 81: 112–121.
9. Bagwell AM, Bento JL, Mychaleckyj JC, Freedman BI, Langefeld CD, Bowden DW. *Genetic analysis of HNF4A polymorphisms in caucasian-american type 2 diabetes*. Diabetes 2005; 54: 1185–1190.
10. Zhu Q, Yamagata K, Miura A, Shihara N, Horikawa Y, Takeda J, Miyagawa J, Matsuzawa Y. *T130I mutation in HNF-4 α gene is a loss-of-function mutation in hepatocytes and is associated with late-onset type 2 diabetes mellitus in japanese subjects*. Diabetologia 2003; 46: 567–573.
11. Ek J, Rose CS, Jensen DP, Glümer C, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Pedersen O, Hansen T. *The functional Thr130Ile and Val255Met polymorphisms of the hepatocyte nuclear factor-4 α (HNF4A): gene associations with type 2 diabetes or altered β -cell function among danes*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2005; 90: 3054–3059.
12. Menjívar M, Granados MA, Montufar I, Herrera M, Tusié-Luna MT, Canizales S, Ortiz-López MG. *High frequency of T130I mutation of HNF-4 α gene in mexican*

- patients with early-onset type 2 diabetes*. Revisión de artículo enviada a Diabetes Metabolism Research and Review 2006.
13. Bouwens L, Rooman I. *Regulation of pancreatic beta-cell mass*. Physiological Reviews 2005; 85: 1255–1270.
 14. Desvergne B, Michalick L, Wahli W. *Transcriptional regulation of metabolism*. Physiological Reviews 2006; 86: 465–514.
 15. Shaikh IM, Jadhav KR, Ganga S, Kadam VJ, Pisal SS. *Advanced approaches in insulin delivery*. Current Pharmaceutical Biotechnology 2005; 6: 387–395.
 16. Rosmond R. *Stress induced disturbances of the HPA axis: a pathway to type 2 diabetes?*. Medical Science Monitor: International Journal of Experimental and Clinical Research 2003; 9: RA35–39.
 17. American Diabetes Association. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care 2006; 29: S43–S48.
 18. Bloomgarden ZT. *Diabetes complications*. Diabetes Care 2004. 27(6) : 1506–1514.
 19. Mancillas-Adame LG, Gómez-Pérez FJ, Rull-Rodrigo JA. *Diagnóstico y clasificación de la diabetes mellitus, conceptos actuales*. Revista de Endocrinología y Nutrición 2002; 10: 63–68.
 20. De la Paz JA. *La diabetes mellitus y su detección temprana*. Revista del Hospital General Dr. M. Gea González 2002; 5:5–6.
 21. Bloomgarden ZT. *Developments in diabetes and insulin resistance*. Diabetes Care 2006; 29: 161–167.
 22. Zamora-Valdés D, Chávez-Tapia NC, Méndez-Sánchez N. *Mecanismos moleculares de resistencia a la insulina*. Revista de Médica Sur 2004; 11: 149–159.
 23. Roche E. *Diabetes tipo 2: gluco-lipo-toxicidad y disfunción de la célula β pancreática*. Ars Pharmaceutica Journal 2003; 44: 313–332.
 24. Del Prato S, Marchetti P, Bonadonna RC. *Phasic insulin release and metabolic regulation in type 2 diabetes*. Diabetes 2002; 51: S190–S116.
 25. Rojas I, Novials A. *Bases moleculares de la diabetes mellitus tipo 2: estudio de genes candidatos para su desarrollo*. Obesidad, Nutrición y Diabetes 2002; 1: 34–39.
 26. Klung WS, Cummings MR. *Conceptos de genética*. Quinta edición. Editorial Prentice Hall. Madrid, 1999. Pp. 343–367, 574–584.
 27. Smit JWA, Diamant M. *Genetically defined pancreatic beta cell failure*. Pharmacogenomics 2002; 3: 669–678.
 28. Cerf ME, Muller CJF, Du Toit DF, Louw J, Wolfe-Coote SA. *Transcription factors, pancreatic development and β -cell maintenance*. Biochemical and Biophysical Research Communications 2005; 326: 699–702.
 29. Habener JF, Kemp DM, Thomas MK. *Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development*. Endocrinology 2005; 146: 1025–1034.
 30. Boj SF, Párrizas M, Maestro MA, Ferrer J. *A transcription factor regulatory circuit in differentiated pancreatic cells*. The Proceedings of the National Academy of Sciences 2001; 98: 14481–14486.

31. Gragnoli C, Von Preussenthal GM, Habener JF. *Triple genetic variation in the HNF-4 α gene is associated with early-onset type 2 diabetes mellitus in a philippino family.* Metabolism 2004; 53: 959–963.
32. Winter WE. *Molecular and biochemical analysis of the MODY syndromes.* Pediatric Diabetes 2000; 1: 88–117.
33. Sánchez-Reyes L, Fanghänel G, Márquez-Cid ME, Salazar-Rocha R, Labastida-Sánchez C, Solís-Pérez A, Tusié-Luna MT. *Actualización en los diferentes subtipos de diabetes tipo MODY.* Revista de Endocrinología y Nutrición 2001; 9: 5–11.
34. Froguel P, Velho G. *Molecular genetics of maturity-onset diabetes of the young.* Trends in Endocrinology and Metabolism 1999; 10: 142–146.
35. Eeckhoute J, Moerman E, Bouckennooghe T, Lukoviak B, Pattow F, Formstecher P, Kerr-Conte J, Vandewalle B, Laine B. *Hepatocyte nuclear factor 4 α isoforms originated from the P1 promoter are expressed in human pancreatic β -cells and exhibit stronger transcriptional potentials than P2 promoter-driven isoforms.* Endocrinology 2003; 144: 1686–1694.
36. Métivier R, Reid G, Gannon F. *Transcription in four dimensions : nuclear receptor-directed initiation of gene expression.* European Molecular Biology Organization reports 2006; 7: 161–167.
37. Price JA, Fossey SC, Sale MM, Brewer CS, Freedman BI, Wuerth JP, Bowden DW. *Analysis of the HNF-4 α gene in caucasian type II diabetic nephropatic patients.* Diabetologia 2000; 43: 364–372.
38. Thomas H, Jaschkowitz K, Bulman M, Frayling TM, Mitchell SM, Roosen S, Lingott-Frieg A, Tack CJ, Ellard S, Ryffel GU, Hattersley AT. *A distant upstream promoter of the HNF-4 α gene connects the transcription factors involved in maturity-onset diabetes of the young.* Human Molecular Genetics 2001; 10: 2089–2097.
39. Ihara A, Yamagata K, Nammo T, Miura A, Yuan M, Tanaka T, Sladek FM, Matsuzawa Y, Miyagawa J, Shimomura I. *Functional characterization of the HNF4 α isoform (HNF4 α 8) expressed in pancreatic β -cells.* Biochemical and Biophysical Research Communications 2005; 329: 984–990.
40. Oxombre B, Kouach M, Moerman E, Formstecher P, Laine B. *The G115S mutation associated with maturity-onset diabetes of the young impairs hepatocyte nuclear factor 4 α activities and introduces a PKA phosphorylation site in its DNA-binding domain.* Biochemical Journal 2004; 383: 573–580.
41. Monney CT, Kaltenrieder V, Cousin P, Bonny C, Schorderet DF. *Large family with maturity-onset diabetes of the young and a novel V121I mutation in HNF4 α .* Human Mutation 2002; 20: 230–1.
42. Aggelidou E, Iordanidou P, Tsantili P, Papadopoulos G, Hadzopoulou-Cladaras M. *Critical role of residues defining the ligand binding pocket in hepatocyte nuclear factor 4 α .* The Journal of Biological Chemistry 2004; 279: 30680–30688.
43. Wisley GB, Miller AB, Davis RG, Thornquest, Johnson R, Spitzer T, Sefler A, Shearer B, Moore JT, Miller AB, Willson TM, Williams SP. *Hepatocyte nuclear factor 4 is a*

- transcription factor that constitutively binds fatty acids.* Structure 2002; 10: 1225–1234.
44. Eeckhoutte J, Oxombre B, Formstecher P, Lefebvre P, Laine B. *Critical role of charged residues in helix 7 of the ligand binding domain in hepatocyte nuclear factor 4 α dimerisation and transcriptional activity.* Nucleic Acids Research 2003; 31: 6640–6650.
 45. Duda K, Young-In C, Shoelson S. *Structural basis for HNF-4 α activation by ligand and coactivator binding.* The Journal of Biological Chemistry 2004; 279: 23311–23316.
 46. Hani EH, Suaud L, Boutin P, Chèvre JC, Durand E, Phillippi A, Demenais F, Vionnet N, Furuta H, Velho G, Bell GI, Laine B, Froguel P. *A missense mutation in hepatocyte nuclear factor-4 α , resulting in a reduced transactivation activity, in human late-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus.* The Journal of Clinical Investigation 1998; 101: 521–526.
 47. Hatzis P, Talianidis I. *Regulatory mechanisms controlling human hepatocyte nuclear factor 4 α gene expression.* Molecular and Cellular Biology 2001; 21: 7320–7330.
 48. Lindner T, Gragnoli C, Furuta H, Cockburn BN, Petzoid C, Rietzsch H, Weib U, Schuize J, Bell GI. et al. *Hepatic function in a family with a nonsense mutation (R154X) in the hepatocyte nuclear factor-4 α /MODY1 gene.* The Journal of Clinical Investigation 1997; 100: 1400–1405.
 49. Malecki MT, Yang Y, Antonellis A, Curtis S, Warram jH, Krolewski AS. *Identification of new mutations in the hepatocyte nuclear factor 4 α gene among families with early onset type 2 diabetes mellitus.* Diabetic Medicine 1999; 16: 193–200.
 50. Furuta H, Iwasaki N, Oda N, Hinokio Y, Horikawa Y, Yamagata K, Nobuki Y, Sugahiro J, Ogata M, Ohgawara H, Omori Y, Iwamoto Y, Bell GI. *Organization and partial sequence of the hepatocyte nuclear factor-4 α /MODY1 gene and identification of a missense mutation, R127W, in a Japanese family with MODY.* Diabetes 1997; 46: 1652–1657.
 51. Gupta RK, Kaestner KH. *HNF-4 α : from MODY to late-onset type 2 diabetes.* Trends in Molecular Medicine 2004; 10: 521–524.
 52. Silander K, Mohlke KI, Scott LJ, Peck EC, Hollstein P, Skol AD, Jackson AU, Deloukas P, Ilunt S, Stavrides G, Chines PS, Erdos MR, Narisu N, Conneely KN, Li C, Fingerlin TE, Dhanjal SK, Valle TT, Bergman RN, Tuomilehto J, Watanabe RM, Boehnke M, Collins FS. *Genetic variation near the hepatocyte nuclear factor-4 α gene predicts susceptibility to type 2 diabetes.* Diabetes 2004; 53: 1141–1149.
 53. Muller YL, Infante AM, Hanson RL, Love-Gregory L, Knowler W, Bogardus C, Baier LJ. *Variants in hepatocyte nuclear factor 4 α are modestly associated with type 2 diabetes in Pima Indians.* Diabetes 2005; 54: 3035–3039.
 54. Winckler W, Graham RR, de Barker PIW, Sun M, Almgren P, Tuomi T, Gaudet D, Hudson TJ, Ardlie KG, Daly MJ, Hirschhorn JN, Groop L, Altshuler D. *Association*

- testing of variants in the hepatocyte nuclear factor 4 α gene with risk of type 2 diabetes in 7,883 people.* Diabetes 2005; 54: 886–892.
55. Bristow AF. United Kingdom Nation External Quality Assessment Service. Standardization of protein hormone immunoassays: current controversies. www.uknegas.org.uk/afbpaper.pdf. Copyright Association of Clinical Biochemists 1998. Fecha de consulta: 26 de Septiembre de 2006.
 56. Zárate A, Basurto L, Saucedo R. *La obesidad: conceptos actuales sobre fisiopatogenia y tratamiento.* Rev. Fac. Med. UNAM 2001; 44: 66–70.
 57. World Health Organization. *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Part 1.* WHO Technical Report Series (894). Geneva, 2000. Pp. 5–13.
 58. Blaak E. *Gender differences in fat metabolism.* Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care 2001; 4: 499–502.
 59. Aguilar-Salinas CA, Olaiz G, Valles V, Ríos-Torres JM, Gómez-Pérez FJ, Rull JA Rojas R, Franco A, Sepúlveda J. *High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nationwide survey.* Journal of Lipid Research 2001; 42:1298–1307.
 60. Carlsson S, Hammar N, Grill V. *Alcohol consumption and type 2 diabetes. Meta-analysis of epidemiological studies indicats a U-shaped relationship.* Diabetologia 2005; 48: 1051–1054.
 61. Nakanishi N, Suzuki K, Tatara K. *Alcohol consumption and risk for development of impaired fasting glucose or type 2 diabetes in middle-aged japanese men.* Diabetes Care 2003; 26: 48–54.
 62. Kapoor D, Johnes TH. *Smoking and hormones in health and endocrine disorders.* European Journal of Endocrinology 2005; 152: 491–499.

EXTRACCIÓN DE DNA

Preparación de reactivos:

Sacarosa Tritón 2X

Sacarosa	219 g (0.64 M)
Tris-Base	2.42 g (0.02 M)
MgCl ₂	2.03 g (0.01 M)
Tritón 100X	10 mL (2%)

1. Vaciar todos los reactivos a un vaso de precipitados de 1000 mL y agregar aprox. 800 mL de agua desionizada.
2. Mezclar en el agitador magnético hasta homogenizar.
3. Ajustar el pH a 7.6.
4. Aforar a 1 L.
5. Filtrar con membrana.
6. Almacenar a 4°C.

Sacarosa Tritón 1X

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

Buffer Lisis Nuclear

Tris-Base	1.21 g (10 mM)
NaCl ₂	23.4 g (400 mM)
Na ₂ EDTA	0.75 g (2 mM)

1. Vaciar todos los reactivos a un vaso de precipitados de 500 mL y agregar aproximadamente 300 mL de agua desionizada.
2. Mezclar en el agitador magnético hasta homogenizar.
3. Aforar a 500 mL.
4. Esterilizar en autoclave.
5. Almacenar a temperatura ambiente.

Proteinasa K 5mg/mL

1. Pesar 50 mg de la proteinasa (0.050 g)
2. Llevar a 10 mL.
3. Mezclar completamente.
4. Hacer alícuotas de 500 μ L.
5. Almacenar a -20°C .

NaCl saturado

1. Disolver 35 g de NaCl en 100mL de agua desionizada.
2. Agitar.
3. Almacenar a temperatura ambiente.

ETOH 70%

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

Buffer TE

1. Tomar 1 mL de Tris/HCL 1 M a pH = 8.0.
2. Agregar 200 μ L de EDTA 0.5 M a pH = 8.0.
3. Aforar a 100 mL.
4. Esterilizar en autoclave.
5. Almacenar a temperatura ambiente.

Tris/HCl 1 M a pH = 8.0

1. Pesar 30.275 g de Tris/HCl
2. Disolver con 150 mL de agua desionizada.
3. Ajustar el pH a 8.0
4. Aforar a 250 mL.
5. Almacenar a temperatura ambiente.

CARTA CONSENTIMIENTO FIRMADA POR LOS ALUMNOS QUE PARTICIPARON EN ESTE
PROYECTO



HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN, LAB. DE ENDOCRINOLOGÍA MOLECULAR

CARTA CONSENTIMIENTO INFORMADO

México D.F., _____

A quien corresponda:

Yo, el/la abajo suscrito/a _____ de _____ años de edad, en forma libre y voluntaria acepto participar en el estudio “Evaluación del polimorfismo T130I del gen HNF-4 α como factor de riesgo de diabetes mellitus tipo 2 de inicio temprano en alumnos de la Facultad de Química de la UNAM” que se llevará a cabo en el Hospital Juárez de México y la Facultad de Química de la UNAM, cuyo objetivo es identificar a la variante T130I como factor de susceptibilidad de desarrollo de diabetes mellitus en jóvenes mexicanos.

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

Firma: _____