

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



FACULTAD DE QUÍMICA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**EVALUACIÓN GENETICO-MOLECULAR DE LOS
FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN HNF-4 α Y PAX-4
EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2
DE INICIO TEMPRANO**

E.B.C. ISELA MONTUFAR ROBLES

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARTA A. MENJIVAR IRAHETA



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.

A mis Padres

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio de Endocrinología Molecular del Hospital Juárez de México y a la Facultad de Química de la U.N.A.M. por las facilidades recibidas para realizar esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo recibido (CONACYT, México. Proyecto no. 40518). Numero de registro Beca-CONACYT: 185535.

A los miembros del Jurado Dra. Victoria Chagoya de Sánchez, Dra. Ma.Teresa Tusié Luna, Dr. Julio Granados Arriola, Dra. Marcia Hiriart Urdanivia y Dr. Diego González Halphen por las correcciones y aportaciones que hicieron a este trabajo.

A la Dra. Marta Menjívar y a la Dra. Lupita Ortiz por su tiempo y sus consejos.

ABREVIATURAS.

AF-1	Función de activación 1
AF-2	Función de activación 2
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
dNTPs	Desoxinucleotridifosfatos
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Acido etilendiamino-tetracético
GLUT2	Transportador de Glucosa 2
HNF-1 α	Factor nuclear hepatocítico 1 α
HNF-4 α	Factor nuclear hepatocítico 4 α
ICC	Índice Cintura Cadera
ICE	Índice Cintura Estatura
IMC	Índice de Masa Corporal
MODY	Diabetes mellitus de inicio temprano
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RIA	Radioinmunoensayo
RFLP	Polimorfismo de fragmentos largos de restricción
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
SSCP	Polimorfismo conformacional de cadena simple
SPSS	Programa Estadístico para las Ciencias Sociales
TBE	Amortiguador con Tris-base, ácido bórico y EDTA
TEMED	N,N,N,N'-tetrametiletilendiamina
TTE	Amortiguador con Tris-base, Taurina y EDTA
$\alpha^{32}\text{P}$	Fósforo-32 radioactivo posición α

INDICE

RESUMEN	5
1. INTRODUCCION	7
Diabetes mellitus	7
Diabetes mellitus tipo MODY	10
Factores de transcripción	11
2. HNF-4 α Y DIABETES MELLITUS	14
3. PAX4 Y DIABETES MELLITUS	19
4. JUSTIFICACIÓN	24
5. HIPÓTESIS	25
6. OBJETIVOS	26
7. MATERIAL Y MÉTODOS	27
8. RESULTADOS	35
Datos bioquímicos	35
Evaluación de HNF-4 α	38
Evaluación de Pax-4	51
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	67
10. CONCLUSIONES	75
11. ANEXOS	76
12. BIBLIOGRAFÍA	79

RESUMEN

La diabetes mellitus es un desorden metabólico complejo caracterizado por defectos en el metabolismo de la glucosa resultado de alteraciones en la acción o secreción de la insulina. En México su prevalencia es del 12.9 % de la cual aproximadamente el 50 % de los casos son diagnosticados a edades tempranas. Las mutaciones y polimorfismos en la secuencia de DNA de genes específicos que codifican para varios factores de transcripción han sido asociados a la aparición de diabetes mellitus tanto de inicio temprano como tardío, tal es el caso de los factores transcripcionales HNF-4 α y Pax4. HNF-4 α se expresa en células β -pancreáticas, hígado, riñón e intestino delgado; se considera un factor transcripcional mayor ya que regula la transcripción y expresión de otros genes como HNF-1 α , insulina y Glut 2 entre otros. Pax4 es un factor transcripcional esencial para la formación del páncreas y diferenciación de células beta pancreáticas. En este sentido el objetivo del presente trabajo fue realizar la búsqueda de variantes de secuencia de los genes HNF-4 α y Pax4 a través de su análisis molecular, en 50 familias con diabetes de inicio temprano y en 50 sujetos no diabéticos. Los estudios moleculares se realizaron a través de PCR-SSCP, secuenciación y PCR-RFLP para los dos genes estudiados. En el gen HNF-4 α se identificó la variante T130I con una frecuencia del 4% en sujetos no diabéticos y del 16% en sujetos diabéticos (RM = 4.57, $X^2= 4.0$, CI 95% 1.03, 20.3 p=0.045), siendo esta la frecuencia más alta reportada en el mundo por lo que hemos sugerido que se trata de un marcador genético de susceptibilidad a la aparición de diabetes en población mexicana. En el gen Pax4 se identificaron dos cambios, la mutación R133W en el exón 3 y la variante P321H en el exón 9. La mutación R133W se encontró sólo en una paciente diabética. La variante P321H se presentó con alta frecuencia tanto en sujetos diabéticos (19%), como en sujetos no diabéticos (8.7 %), con una RM = 1.25, $X^2= 0.47$ y un valor de p = 0.49. Con el conocimiento del fondo diabetogénico mexicano podremos entender mejor las bases moleculares de la enfermedad así como buscar alternativas en el manejo y tratamiento de la misma.

1

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus es la enfermedad endocrina más común de nuestro país. Estudios realizados en las dos últimas décadas señalan la participación de genes específicos en el desarrollo de un subtipo de diabetes denominada MODY (maturity onset diabetes of the young). Estos genes son responsables de los fenotipos diabéticos de aparición temprana, con herencia autosómico dominante que en su mayoría codifican para factores de transcripción pancreáticos; son de gran relevancia por que participan en la regulación de la transcripción de otras proteínas implicadas en el metabolismo de la glucosa. Variantes de secuencia en estos genes están involucradas en la susceptibilidad a desarrollar diabetes (Froguel y cols 1999).

Diabetes Mellitus

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica y degenerativa caracterizada por altos niveles de glucosa sanguínea y la predisposición al desarrollo de complicaciones micro y macrovasculares. La patogénesis de la DMt2 es en su mayoría aún desconocida, sin embargo se sabe que es el resultado de la combinación de factores genéticos, factores nutricionales y ambientales.

Los principales factores de riesgo para la diabetes son la obesidad, distintas dislipidemias, la hipertensión arterial, la historia familiar de diabetes, la diabetes gestacional, la dieta rica en carbohidratos, factores hormonales y la vida sedentaria (Yki-Järvinen 1994). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) y al Reporte del Comité Experto en el diagnóstico y clasificación de la diabetes mellitus (Alberti y cols 1998; Expert Comitite 2003) ésta se clasifica en:

1.- Diabetes mellitus tipo 1.- Es un transtorno crónico, consecuencia de la activación de mecanismos autoinmunes que destruyen las células beta del páncreas productoras de insulina, debido a esto los pacientes requieren la administración de insulina para su sobrevivencia.

2.- Diabetes mellitus tipo 2.- Es una alteración metabólica progresiva y crónica que se caracteriza por presentar resistencia a la insulina en estados tempranos de la enfermedad e insuficiencia de la célula beta para producir una cantidad adecuada de insulina en estados avanzados de la enfermedad.

3.- Otros tipos específicos de diabetes.- Entre estos figuran los defectos genéticos de la función de la célula beta, los defectos genéticos en la acción de la insulina, enfermedades del páncreas endócrinos, endocrinopatías, y drogas.

4.- Diabetes gestacional.- Es definida como cualquier grado de intolerancia a la glucosa durante el inicio o curso del embarazo, puede desarrollarse por una modificación en el sistema de regulación de la glucosa durante el embarazo y afecta del 2-7% de las mujeres (Carpenter y Counstan 1982). Después del parto, el metabolismo generalmente retorna a la normalidad, pero las pacientes con diabetes gestacional tienen un alto riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 de 10 a 20 años después.

Los principales síntomas de la diabetes son poliuria, polifagia, polidipsia y pérdida de peso. La diabetes tiene una gran repercusión social y económica que recae sobre los servicios de salud pública (Guzmán y Madrigal 2003) ya que se encuentra entre las primeras causas de muerte, las personas con diabetes que no han sido diagnosticadas o que están pobremente controladas pueden generar complicaciones tales como ceguera, insuficiencia renal y problemas circulatorios que llevan a la amputación de extremidades, de ahí que la diabetes esté asociada con una disminución en la

expectativa de vida. Se estima que el número de pacientes con diabetes a nivel mundial excede los 200 millones (Malecki 2005).

En Latinoamérica el país con mayor incremento en la prevalencia de diabetes es México, los estados del norte son los que presentan las tasas más altas de mortalidad por diabetes en comparación a los estados del Sur (Coahuila 51.6 %, Chihuahua 44.6 %, Tamaulipas 43.8%, Sonora 40.7%, Durango 39.9 %, Yucatán 33.6 %, Guerrero 23.8%, Chiapas 19.8%, Quintana Roo 17.4%) los estados del centro tienen comportamiento intermedio y el D.F. se comporta como los estados del norte con una tasa de mortalidad del 63.2 % (Moreno 2001).

En México los pacientes diabéticos viven 20 años en promedio con la enfermedad, se sabe que entre 20 y 90% de los que se saben enfermos no reciben o no cumplen con su tratamiento y el 68% de los casos de diabetes mellitus se diagnostican de manera casual, tardía y como consecuencia de las complicaciones (Hernández-Ronquillo y cols 2003). A la fecha existen más de 6 millones de personas con diabetes de las cuales poco más de un millón no han sido diagnosticadas (Secretaría de Salud 2000), se pronostica que cerca de 11.7 millones de mexicanos tendrán diabetes para el año 2025.

Actualmente el 15% de los casos son diagnosticados antes de los 40 años de edad, dado que el 75% de los 97 millones de mexicanos son menores de 40 años, por tanto es necesario y urgente la creación de programas de prevención de diabetes en todo el país ya que la morbilidad y mortalidad asociada a diabetes de inicio temprano tiene un impacto socio-económico mayor que la diabetes de inicio tardío (Aguilar-Salinas y cols 2003).

Una de las claves para entender la causa de la enfermedad es el análisis de genes de susceptibilidad, es decir, variantes de secuencia específicas (alelo polimórfico) que se presentan con mayor frecuencia en pacientes que en controles, ya que una asociación significativa de este tipo facilitará la detección eventualmente de personas con mayor riesgo para desarrollar la enfermedad.

Diabetes mellitus tipo MODY.

La diabetes mellitus tipo MODY (maturity onset diabetes of the young), se presenta con una prevalencia del 2-5% de la totalidad de la diabetes y es caracterizada por: 1) herencia autosómico dominante, 2) aparición usualmente antes de los 30 años de edad, y 3) por presentar un defecto en la secreción de insulina por parte de las células beta pancreáticas (Velho y Froguel 1998, Fajans y cols 1994).

Este tipo de diabetes puede ser el resultado de mutaciones en la enzima glucocinasa y en los genes que codifican para 5 distintos factores de transcripción: HNF-4 α , HNF-1 α , HNF-1 β , IPF-1 y Beta2/NeuroD1. Estos genes son responsables de activar la transcripción de varios genes en la célula beta-pancreática incluyendo el gen de la insulina. Por tanto mutaciones en cualquiera de estos genes dan como resultado la deficiencia en la síntesis o secreción de insulina observada en la diabetes tipo 2 de inicio temprano los pacientes MODY también presentan una masa de células beta pancreáticas disminuida, comparada con la de personas no diabéticas de peso similar (Groop 2000, Martin y cols 1992).

Dentro de las familias con diabetes de inicio temprano hay un gran número de ellas que no presentan mutaciones en ninguno de los genes MODY, indicando que hay otros genes que pueden causar esta forma de diabetes. Aproximadamente del 15-20% de familias con diabetes mellitus de inicio temprano caen dentro de este grupo al cual se le ha denominado MODY X, la edad de aparición de la enfermedad en dicho grupo parece ser más elevada que en las otras formas de diabetes de inicio temprano (Owen y Hattersley 2001).

Sin embargo deberá tomarse en cuenta que la mayor parte de las veces la edad de diagnóstico no es igual a la edad de inicio ya que la mayoría de los sujetos diabéticos tienen un diagnóstico retardado debido principalmente al curso inicial de la enfermedad (Winter 2000), así mutaciones en otros factores de transcripción expresados en la célula beta pancreática pueden ser causales de la aparición de la enfermedad (Sánchez-Reyes y cols 2001).

El análisis estructural y funcional de los genes establecidos como causantes de diabetes tipo MODY así como de otros factores de transcripción expresados en la célula beta pancreática han permitido su reconocimiento como genes candidato involucrados

en la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad, entre estos genes están Pax-4, Pax-6, Nkx2.2, Neurogenina 3, Nkx6.1, Islet-1, Hlhx-9 (Hsiang-Po y cols 2000, Frayling y cols 2001).

Así, la importancia del estudio de los factores de transcripción radica no solo en su participación en la formación y mantenimiento de la célula beta pancreática, sino también en que si un factor transcripcional es afectado en su función por una mutación, la expresión de los genes que regula también será afectada, por lo que una mutación en cualquiera de los factores de transcripción implicados en el metabolismo de la glucosa, afectará la expresión de otros genes que también son importantes para la homeostasia de la glucosa, creándose así condiciones favorables para la aparición de diabetes (Mansouri y cols 1999, Zhang y cols 1995).

Los estudios moleculares han mostrado que la presencia y frecuencia de polimorfismos y mutaciones presentes en factores transcripcionales varían en las diferentes poblaciones del mundo, que distintos genes o la combinación de ellos pueden dar como resultado un mismo fenotipo diabético y que estos genes pueden ser diferentes aún entre distintas familias de una misma población (Pillay y cols 1995).

Factores de Transcripción.

Como es sabido, en muchos procesos biológicos la función del DNA depende de su interacción con proteínas específicas que se unen a él, tal es el caso del inicio y control de la expresión génica, ejercida por proteínas también llamadas factores de transcripción, que reconocen e interactúan con secuencias concretas del DNA (Alberts y cols 1994). El contacto entre los factores de transcripción y el DNA son de tipo iónico, hidrofóbico y enlaces de hidrógeno, aunque todos ellos son enlaces débiles, juntos dan una interacción específica y muy fuerte entre dichas proteínas y el DNA (Beato y cols 1997).

Para que se lleve a cabo la transcripción, la polimerasa precisa de dos secuencias básicas de control: promotores e intensificadores. Tanto los promotores como los intensificadores son reconocidas por factores de transcripción, los promotores funcionan junto al sitio de inicio de la transcripción, mientras que los intensificadores lo hacen a grandes distancias de ese punto (Ptashne 1988; Dynan 1989). Un número variable de

factores de transcripción puede unirse a cada promotor, favoreciendo o dificultando la unión de la RNA polimerasa, o de otros factores de transcripción y por tanto determinando la eficacia del inicio de la transcripción (Ptashne y Gann 1997).

La diversidad de los factores de transcripción es mayor que la de los promotores, lo que permite la gran flexibilidad existente en el control de la expresión de los genes. La expresión de los genes se controla en el inicio de la transcripción, esta regulación se centra en la interacción de los promotores con los factores de transcripción (Maniatis y cols 1987). Los factores de transcripción tienen generalmente 4 dominios (Pabo y Sauer 1992, Mitchell y Tijan 1989) que se describen a continuación:

1. Dominio de unión al DNA.- que reconoce y se une a las secuencias de DNA, y los más conocidos son 5 tipos, la figura 1 muestra su estructura y la forma como se unen al DNA:

- Motivo hélice-giro-hélice
- Motivo hélice-bucle-hélice
- Motivo homeodominio
- Motivo dedos de zinc
- Motivo cremallera de leucina

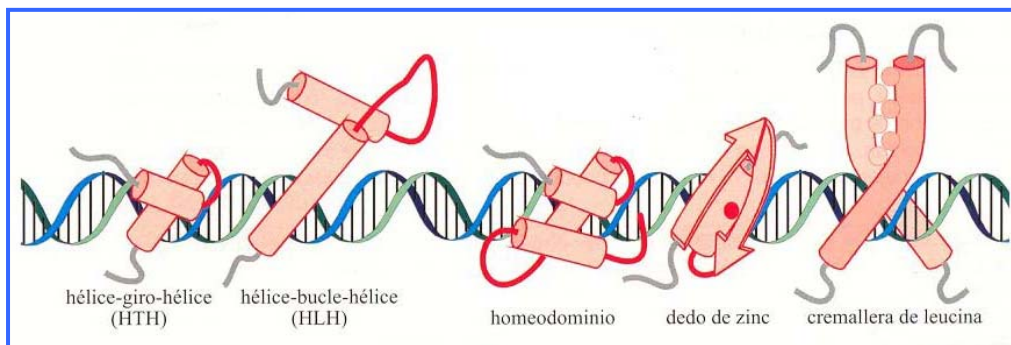


Fig. 1. Motivos de unión al DNA de los factores de transcripción.
Tomada de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Luque J. y cols 2001.

2. Dominio de unión al ligando.- al no conocerse se denominan receptores huérfanos.
3. Dominio de transactivación.- que se encarga de activar la transcripción.
4. Dominio de dimerización.- que no todos lo tienen, y su función es formar dímeros.

Los factores de transcripción participan en la regulación de la expresión de genes que forman diferentes órganos del cuerpo, entre los cuales están aquellos que son importantes dentro del metabolismo de la glucosa, como el páncreas. Sin embargo, solo algunos de los factores de transcripción involucrados en la formación del páncreas y de sus diferentes tipos celulares son conocidos, muchos de estos factores de transcripción también participan en el desarrollo de otros órganos, como hígado, intestino, sistema nervioso central, riñón, sugiriendo que mutaciones en estos genes pueden tener diversas consecuencias fisiológicas (Haber y Stoffel 1998).

Los factores de transcripción implicados en la morfogénesis del páncreas actúan como una red transcripcional, agrupándose en dímeros, tetrámeros, pentámeros, etc., por tanto si faltara alguno de ellos se presentarían alteraciones en la expresión de los genes que regulan (Lemaigre y Rousseau 1994). Por ejemplo, el gen HNF-4 α , actúa río arriba como un regulador positivo de la expresión de HNF-1 α por lo que la pérdida de su función puede dar una actividad de células beta-pancreáticas disminuida, secundaria a un defecto en la expresión de dicho gen que regula (Owen y Hattersley 1998). La figura 2 muestra la forma en que actúan estos factores de transcripción.

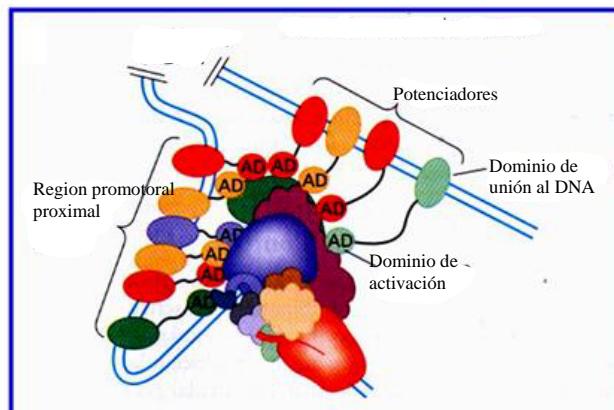


Fig.2 Red de factores transcripcionales implicados en el inicio de la transcripción.

2

HNF-4 α y Diabetes mellitus

HNF-4 α (Factor nuclear hepatocítico 4 α) es miembro de la familia de receptores nucleares de hormona esteroides/tiroideas, es codificado por el gen TCF14 en el cromosoma 20. HNF-4 α tiene una función muy importante en el hígado, intestino, riñón y célula beta pancreática, este factor transcripcional se compone de seis dominios nombrados de la A a la F como se muestra en la figura 3. (Sladek y cols 1990).

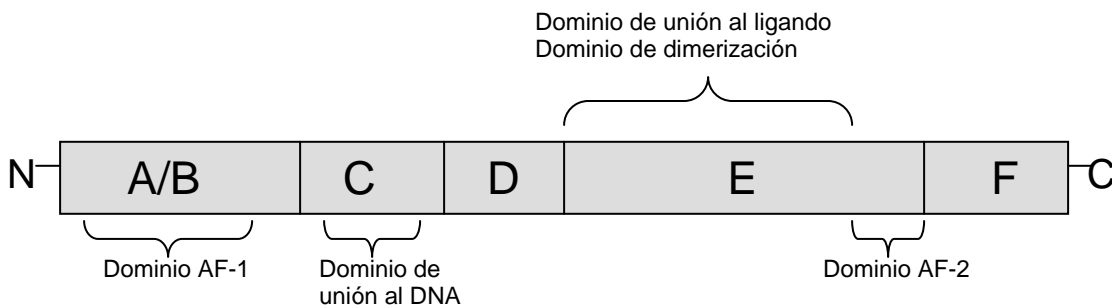


Fig. 3 Dominios funcionales de HNF-4 α
Hadzopouou y cols 1997.

El dominio A/B se encuentra en el extremo amino terminal, y contiene un motivo llamado AF-1 (función de activación 1) que implica un mecanismo de transactivación

constitutivo que es independiente de la función del ligando. El dominio C, o DBD (DNA Binding Domain) consta de 66 residuos de aminoácidos, es la región más conservada entre los diferentes receptores nucleares. Se caracteriza por una estructura de dedos de zinc con una conformación de hélice que permite la interacción con el surco mayor del DNA. Este dominio también se encuentra implicado en el mecanismo de dimerización de los receptores.

El dominio D es una unión flexible entre el dominio C y el dominio E, y permite los fenómenos de rotación de estos últimos. Este dominio se encuentra implicado en la localización nuclear. El dominio E o LBD (Ligand Binding Domain) es una región compleja. Contiene el sitio de fijación al ligando, e interviene en la dimerización y en la transactivación (AF-2, función de activación 2), este dominio también está implicado en la localización nuclear. La función del dominio F no está determinada, algunos receptores no poseen el dominio F o éste es muy corto (Iyemere y cols 1998, Hadzopouou y cols 1997). Los estudios de cristalografía sugieren que los ácidos grasos son ligandos endógenos para HNF-4 α (Dhe-Paganon y cols 2002).

HNF-4 α posee varios sitios de fosforilación sobre los residuos de serina, treonina y tirosina. Se ha demostrado que la fosforilación de los residuos de tirosina de HNF-4 α es necesaria para la unión al DNA. Además se ha indicado que la fosforilación de los residuos de treonina y los residuos de serina está asociada a una fuerte afinidad y especificidad de unión al DNA (Jiang y cols 1997).

HNF-4 α también participa en el desarrollo embrionario, ya que interviene en la formación del hígado, intestino, riñones, y endodermo extraembrionario. HNF-4 α tiene dos distintos promotores (P1 y P2). Los hepatocitos utilizan el promotor proximal P1, pero el promotor distal P2 es utilizado en células β -pancreáticas. El exón 1A es transcrito a partir del promotor P1 en el hígado, pero el exón 1D es transcrito a partir del promotor distal P2 en tejido pancreático. El promotor P2 incluye un sitio de unión para IPF-1 y un sitio de unión para HNF-1 α , mutaciones en los sitios de unión del promotor P2 causan MODY.

La expresión hepática del RNAm de HNF-4 α es normal en ratones knockout para el gen HNF-1 α , pero su expresión es abolida en el páncreas. (Lee y cols 1998). Estos resultados sugieren la importancia del promotor P2 para la transcripción de HNF-4 α en

las células beta pancreáticas (Thomas y cols 2001). En el ratón HNF-4 α aparece en el día 8.5 embrionario en hígado e intestino primitivo. La inactivación de HNF-4 α provoca severas alteraciones durante el desarrollo de la gastrulación que generarán la muerte del embrión de ratón en el día 10.5 embrionario (Chen y cols 1994).

Como ha sido indicado HNF-4 α esta presente en la morfogénesis del hígado y por tanto en la formación de hepatocitos, que a su vez participan en la síntesis de la mayoría de las proteínas plasmáticas, la regulación del metabolismo de los glúcidos, lípidos, y de la urea. Se ha demostrado que HNF-4 α es capaz de regular la transcripción de genes que intervienen en el metabolismo de lípidos, aminoácidos, carbohidratos y síntesis de proteínas séricas (Stoffel y Duncan 1997).

A nivel del promotor de HNF-4 α existe un sitio de unión para HNF-1 α , y a nivel del promotor de HNF-1 α existe un sitio de unión para HNF-4 α , sin embargo los estudios *in vivo* han demostrado que HNF-1 α no es necesario para la expresión de HNF-4 α , sino más bien que su papel es mantener la expresión de éste (Miura y Tanaka 1993). Los factores transcripcionales ejercen su función mediante la conexión de varios factores de transcripción, formando así una red transcripcional en la cual se necesitan unos a otros y todos participan de una manera activa. La siguiente figura nos muestra la forma de conexión de los factores hepatocíticos nucleares.

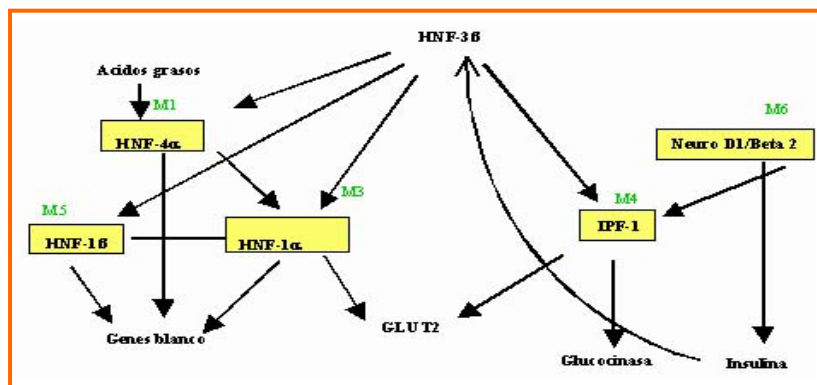


Figura 4. Red de Factores nucleares hepatocíticos en células β . Tomada de Molecular genetics of maturity-onset diabetes of the young. Trends Endocrinol Metab. 10: 142 – 146 1999.

Dentro del metabolismo de la glucosa, HNF-4 α regula a genes como GLUT2, aldolasa B, gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato carboxicinasa, glucocinasa, insulina y piruvato cinasa. Dentro del metabolismo de lípidos se ha demostrado que HNF-4 α es un regulador importante de la expresión positiva de varios genes de apolipoproteínas, pues se une y activa a promotores como los de la apoA-II, apoA-IV, apo-B, apoC-II y apoC-III (Ladías y cols 1992).

El gen HNF-4 α es considerado como uno de los principales reguladores transcripcionales de varios genes expresados en hígado, como son α -1antitripsina, α -1antiquimotripsina, α -fetoproteína, ceruloplasmina, transferrina, apolipoproteína AI, apolipoproteína AII, apolipoproteína B y apolipoproteína C. Así la pérdida de la función por mutaciones en HNF-4 α podría manifestarse en un fenotipo MODY 1 que resulta no solo en una disfunción de las células productoras de insulina en los islotes pancreáticos, sino también en el hígado, aunque la función del hígado no ha sido valorada en pacientes con mutaciones en el gen HNF-4 α (Lehto y cols 1999).

La expresión nula de HNF-4 α en ratones knockout resulta en muerte embrionaria, mientras que en los ratones heterocigotos se observa un fenotipo aparentemente normal (Cereghini 1996). En el humano, mutaciones heterocigotas en este gen resultan en el fenotipo MODY (Yamagata y col 1996). Mutaciones en HNF-4 α aparecen en menos del 10% de los pacientes MODY estudiados a la fecha. Estos pacientes presentan una forma severa de diabetes, requieren insulina en un 30 % de los casos y presentan complicaciones microvasculares (Yamagata y col 2003). La figura 5 presenta las mutaciones encontradas en el gen HNF-4 α a la fecha.

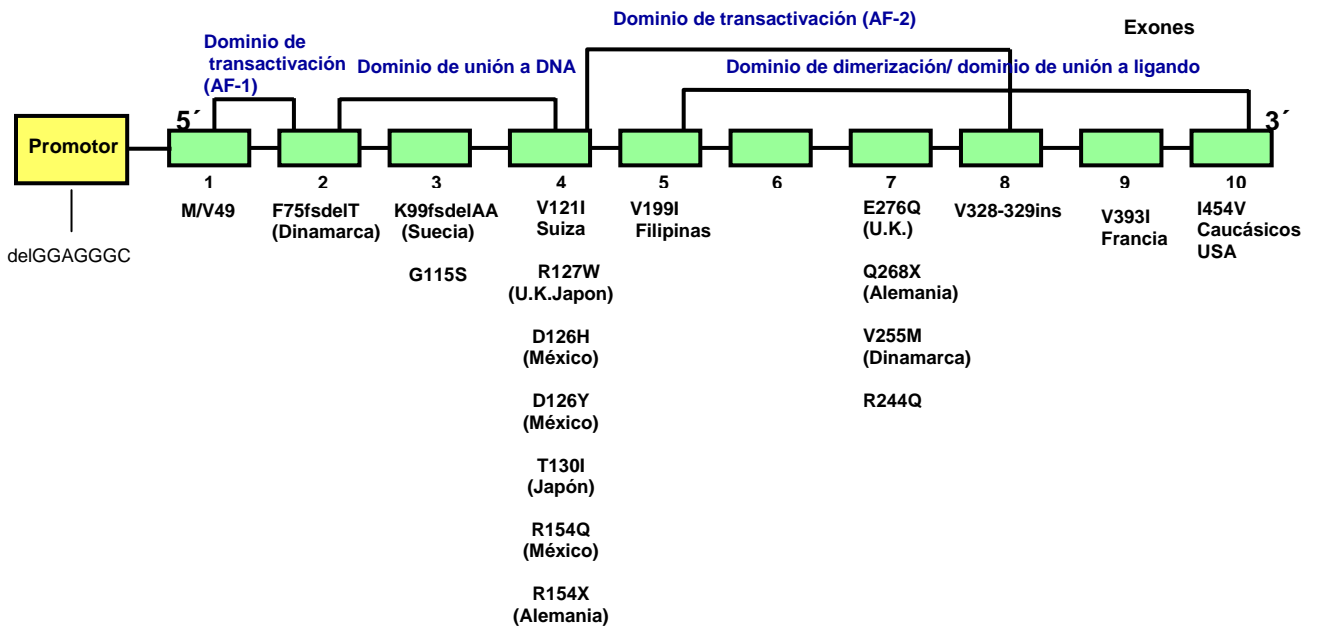


Fig. 5. Estructura de HNF4 α y mutaciones encontradas en pacientes de todo el mundo. Tomada de Regulation of pancreatic β -cell function by the HNF transcription Network: Lessons from Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY). Endocrine Journal 50(5): 491 - 499. 2003

3

PAX-4 y Diabetes mellitus

Los genes Pax, constituyen una pequeña familia de genes conservados que codifican para factores de transcripción de caja-pareada y que son esencialmente requeridos para la formación de varios tejidos a partir de las capas germinales de los embriones de los mamíferos. Durante la embriogénesis los genes Pax exhiben un patrón de expresión temporal (Mansouri y cols 1996). Los estudios funcionales de ratones mutantes revelan que estos genes son necesarios en los eventos primarios para generar gran variedad de tejidos de todas las capas germinales.

En el endodermo, los genes Pax son esenciales para la diferenciación de células endócrinas pancreáticas, la diferenciación del páncreas endocrino derivado del endodermo es mediado a través de Pax4 y Pax6 (Mansouri y cols 1999).

En el ratón la primera aparición morfológica del desarrollo del páncreas es evidente en el día 9.5 embrionario como un brote ventral y dorsal en la primera parte de intestino, donde se ubicará el duodeno. Para el día 10.5 embrionario la expresión de Pax4 es observada en la bolsa dorsal y para el día 11.0 embrionario se encuentra en la bolsa pancreática ventral, en los siguientes días la población de células Pax 4-positivas se expande rápidamente, mostrando un máximo entre los días 13.5 y 15.5 embrionarios (Sosa-Pineda 2004).

En esta etapa temprana la expresión de Pax4 está restringida a pocas células, las que además expresan también el gen para insulina; este patrón es seguido durante

todo el desarrollo embrionario, al nacimiento Pax4 es detectado solamente en células beta productoras de insulina, así Pax4 es expresado selectivamente en células beta (Sosa-Pineda y cols 1997).

En la diferenciación más avanzada se forma un sistema de ramificación ductal, dando origen al páncreas adulto, el cual consiste en su mayor parte de células exocrinas (acinos) que producen las enzimas digestivas, y en menor cantidad están las células endocrinas organizadas en unidades llamadas islotes de Langerhans (Brink y cols 2001).

Los cuatro tipos celulares endocrinos encontrados en el adulto son alfa (α), beta (β), gamma (γ) y delta (δ), las cuales producen glucagon, insulina, somatostatina y polipéptido pancreático respectivamente. El desarrollo de estos 4 tipos celulares endocrinos empieza con un precursor endocrino común, la diferenciación termina cuando en etapas tardías del desarrollo ocurre la expresión de una hormona en cada tipo de celular (Slack 1995).

Aunque Pax4 es expresado en tejido extrahepático tal como el cordón espinal ventral su significado fisiológico es evidente solamente en el páncreas, ya que los ratones con mutaciones homólogas para Pax4 nacen a término, pero mueren tan pronto como nacen. Los análisis histológicos han mostrado que la población de células δ y β están ausentes, en cambio las células α productoras de glucagon son más abundantes al compararlas con el ratón silvestre y están atípicamente agrupadas en el centro.

Normalmente las células alfa productoras de glucagon representan un porcentaje menor de las células endocrinas y están localizadas en la periferia de los islotes alrededor del centro donde se encuentran las células beta. Los datos sugieren que en los ratones recién nacidos Pax4 $-/-$, las células beta y posiblemente algunas células delta han sido reemplazadas por células alfa, así Pax4 es mostrado como un factor esencial para el desarrollo de células beta y delta pancreáticas (Sosa-Pineda y cols 1997).

Pax4 funciona como un represor transcripcional, la región C-terminal de la proteína contiene un dominio de represión y un dominio de transactivación. La secuencia de unión al DNA de Pax4 es similar a otros miembros de la familia Pax como lo es Pax6, de hecho Pax4 se une mediante un motivo de unión a Pax6.

Varios estudios han mostrado que Pax4 parece ejercer su efecto transrepositor aún en ausencia de factores de transcripción positivos, sin embargo si este es coexpresado con otras proteínas de la familia Pax y factores de transcripción que contengan un homeodominio los cuales reconocen un motivo de unión común, Pax4 será un antagonista potencial de aquellas proteínas con las cuales puede competir para la unión al DNA.

Como se ha mencionado durante el desarrollo del páncreas Pax4 parece ser expresado en un cierto linaje celular (células beta pancreáticas) mientras que Pax6 es expresado en todas las células del páncreas endocrino. La misma regla parece ser aplicable al momento de la transcripción donde la expresión de Pax6 parecer mantenerse en los islotes en etapa adulta, pero la expresión de Pax4 no es detectable después del nacimiento. Así la mayor parte de las células que expresan Pax4 en el páncreas también expresarán Pax6, apoyando la idea de las funciones de Pax4 como un regulador negativo de Pax6 *in vivo* (St-Onge y cols 1997).

Los análisis de ratones knockout para Pax4 revelan que ellos son capaces de formar células beta inmaduras las cuales subsecuentemente fallan en su diferenciación a células beta maduras, pero alternativamente adquieren características de células alfa. Los ratones carentes de Pax4 y Pax6 fallan en el desarrollo de células endócrinas maduras, indicando que tanto Pax4 como Pax6 son necesarios para el desarrollo del páncreas. Otros reportes indican que los ratones homocigotos para Pax-4 mueren después del nacimiento por deshidratación mientras que los ratones heterocigotos muestran un fenotipo aparentemente normal (Yamaoka e Itakura 1999).

Conjuntamente de Pax4 y Pax6, otros factores de transcripción han sido implicados en el desarrollo del páncreas y la diferenciación de las células endócrinas, tales como ISL-1, PDX-1, BETA2/NEUROD1, NKX6.1 y NKX2.2 (Wang y cols 2004). Aunque aún es difícil asignar funciones específicas para algunos de estos factores, se sugiere que hay 3 niveles en el desarrollo del páncreas, el primer nivel involucra la generación de progenitores endócrinos los que son capaces de diferenciarse en los 4 tipos celulares: alfa, beta, delta y gamma dentro del epitelio pancreático.

En el segundo nivel los progenitores endócrinos pluripotenciales se limitan a 2 destinos: células: beta/delta ó a células alfa/gamma. En el tercer nivel las células

precursoras son comprometidas a desarrollarse como células: beta o delta. El camino de diferenciación hacia células alfa y gamma es el menos entendido (Dohrmann y col 2000). La siguiente figura muestra los tres niveles en el desarrollo del páncreas:

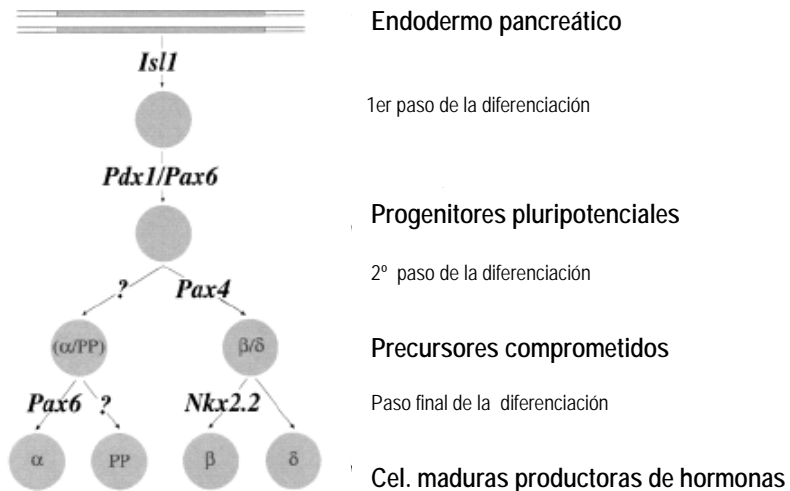


Fig 6. Modelo de diferenciación celular endocrina
Tomada de Pax genes and the differentiation of hormone producing
endocrine cells in the pancreas. Mech Dev. 92: 47 – 54. 2000.

Aunque aún no se sabe cuales son los mecanismos que involucran a Pax4 en el desarrollo de las células beta y delta pancreáticas, el hecho que Pax4 sea esencial para la diferenciación de dichas células beta productoras de insulina, sugieren que Pax4 puede ser un gen de susceptibilidad para la DT2.

Los análisis genéticos en varias poblaciones del mundo han mostrado que mutaciones en el gen Pax4 causan una disminución en la producción de insulina por parte de las células beta, de ahí que se haya propuesto a Pax4 como un diabetogen (Brun y cols 2004). La figura siguiente muestra los 9 exones que estructuran al gen Pax4 y las mutaciones que a la fecha se han encontrado.

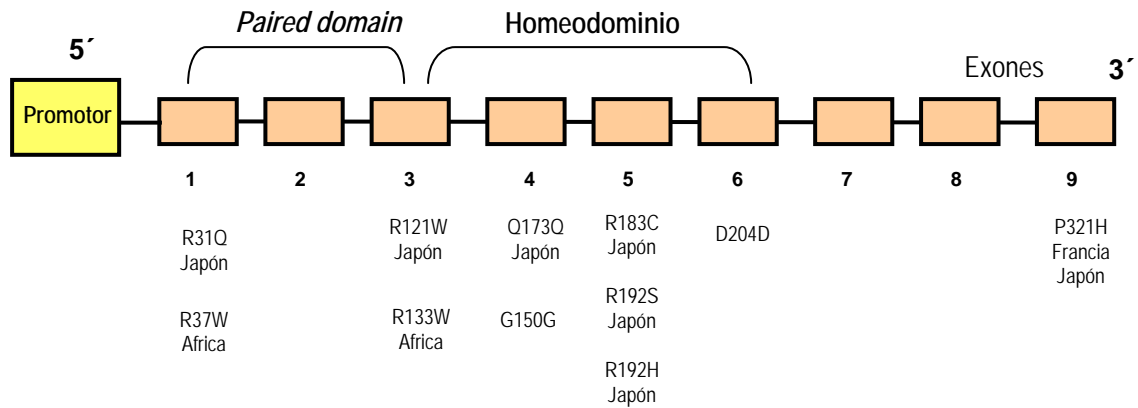


Fig. 7. Estructura de Pax-4 y mutaciones encontradas en pacientes de todo el mundo

La importancia de la evaluación de los factores transcripcionales HNF-4 α y Pax4 radica en conocer los polimorfismos y/o mutaciones, así como la frecuencia con la que se presentan estos en sujetos mexicanos.

Con la evaluación de estos genes y de todos aquellos que participen dentro del metabolismo de la glucosa se podrá conocer mejor el fondo genético de la población mexicana y su grado de participación en el desarrollo de la enfermedad.

JUSTIFICACION

La Diabetes mellitus tipo 2 de inicio temprano es uno de los mayores problemas de salud en México y el mundo, debido a su alta prevalencia, por aparecer en personas cada vez más jóvenes, y por las complicaciones crónicas a las que se asocia.

Los avances en el estudio de la diabetes a nivel molecular han permitido asociar la enfermedad con alteraciones en genes específicos, particularmente factores de transcripción que participan en la creación de moléculas clave dentro del metabolismo de la glucosa como lo es la insulina. Sin embargo las variaciones que estos genes han presentado no explican la gran mayoría de la diabetes de inicio temprano, es por ello que se han propuesto gran cantidad de genes relacionados al metabolismo de la glucosa como posibles desencadenantes de la enfermedad. Las variantes de secuencia y la frecuencia con que se presentan éstas son propias de cada población, de ahí la importancia de estudiar la genética de la población diabética mexicana, ya que solo así podremos conocer las bases moleculares de la diabetes en México y por tanto ayudar a su manejo y prevención.

5

HIPÓTESIS

Debido a la asociación de la diabetes con mutaciones en genes que codifican para factores transcripcionales específicos, se espera que en los sujetos diabéticos se encuentren:

1. Variaciones en la secuencia de DNA de los genes HNF-4 α y Pax 4 que estén asociadas a la aparición de diabetes.
2. Que la frecuencia de las variaciones encontradas sean distintas a las reportadas en otras poblaciones.

6

OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL:

Evaluar la participación de los genes HNF-4 α y Pax-4 en pacientes con diabetes de inicio temprano.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estudiar molecularmente los genes HNF-4 α y Pax-4 en 50 familias con diabetes de inicio temprano y en 50 sujetos no diabéticos.
2. Determinar la existencia de cosegregación de las mutaciones encontradas con la enfermedad.
3. Caracterizar y relacionar los aspectos clínicos y bioquímicos de la enfermedad con las mutaciones identificadas.

MATERIAL Y METODOS

DISEÑO EXPERIMENTAL

A cada sujeto propósito se le tomaron sus medidas antropométricas y se le extrajo 20 ml de sangre total que fue alicuotada en dos tubos, uno para obtener el suero con el fin de determinas las concentraciones de glucosa, colesterol, triglicéridos y hormonas como insulina, glucagon y péptido c; del segundo tubo se extrajo el DNA para realizar las pruebas moleculares, como se indica en la figura 8:

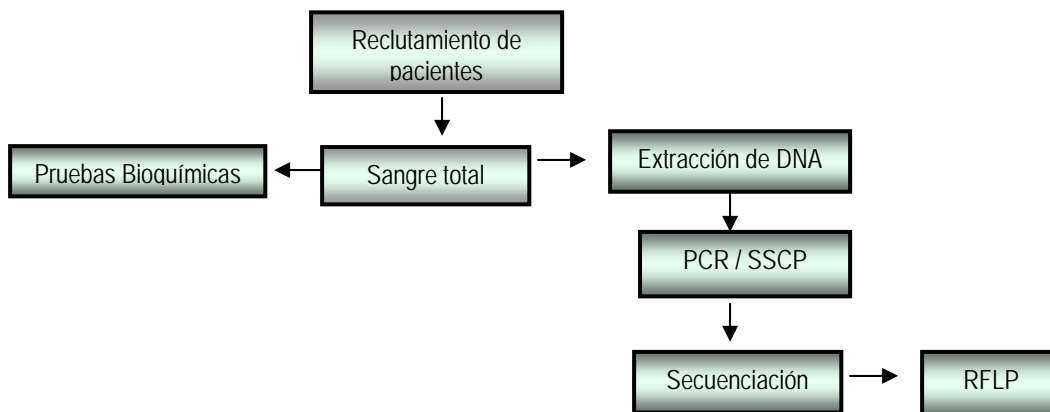


Fig. 8 Diagrama de flujo

Familias diabéticas.- Se evaluaron 50 familias con diabetes de inicio temprano al menos en tres generaciones y sin ninguna relación entre ellas reclutadas del Hospital

Juárez de México. Todos los sujetos propósito tuvieron un rango de edad entre los 15 y 35 años al momento de diagnosticar la enfermedad, no presentaron enfermedades crónicas ni obesidad. La historia clínica, los estudios metabólicos y los estudios moleculares fueron realizados en cada uno de los sujetos propósito, seguido de la investigación en sus familiares cuando alguna mutación se identificó en ellos.

Sujetos no diabéticos.- Se evaluaron 50 sujetos no diabéticos mayores de 50 años, sin antecedentes heredo-familiares de diabetes al menos en tres generaciones, no obesos y sin enfermedades crónicas como cáncer, pancreatitis, hepatitis y alteraciones autoinmunes.

Aspecto ético.- Este proyecto fue registrado (HJM-62/621) y aprobado por el Comité Ético del Hospital Juárez de México, los participantes firmaron una carta consentimiento (Anexo 1) y se les aplicó un cuestionario (Anexo 2) para conocer sus antecedentes heredofamiliares, medidas antropométricas y tratamiento (en sujetos diabéticos).

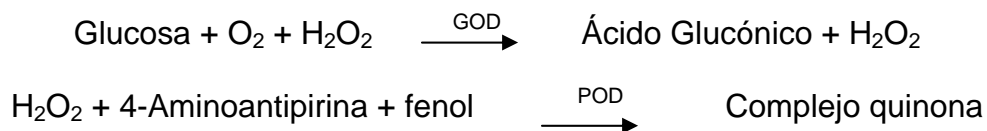
Medidas antropométricas.- El cálculo del índice de masa corporal o índice de Quelet (IMC) se realizó mediante la fórmula de Bray, la cual divide el peso en kilogramos entre la talla en metros elevada al cuadrado (Kg/m^2). Un índice entre 25 y 29.9 se considera sobrepeso y más de 30 obesidad (Ferranini 1995).

El índice cintura cadera (ICC) fue determinado dividiendo la circunferencia de la cintura en centímetros entre la circunferencia de la cadera en centímetros. El Consenso Nacional de Obesidad ha sugerido un $\text{ICC} \leq 0.95$ en hombres y ≤ 0.8 en mujeres (Consenso Nacional de Obesidad 1997, González y León 2002).

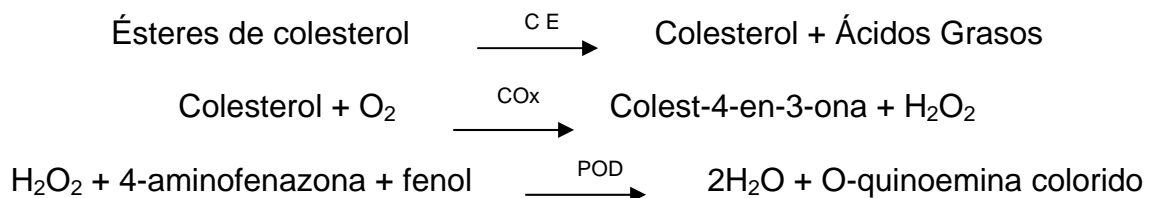
El índice cintura estatura (ICE) se determinó dividiendo la circunferencia de la cintura en centímetros entre la estatura en centímetros. La relación deberá ser menor a 0.5. El valor de éste índice puede ser usado indistintamente para hombres y mujeres, un valor ≥ 0.5 indica riesgo coronario para los dos géneros. (Ríos y Legorreta 2005).

Determinaciones bioquímicas.- Las determinaciones cuantitativas de glucosa, colesterol y triglicéridos, se realizaron mediante estuches enzimático-colorimétricos de la marca Stanbio Laboratory (LINCON, Boerne TX). El coeficiente de variación intra ensayo para la glucosa fue de 6.15 % a nivel de 83.2 mg/dl, para el colesterol de 7.46 % a nivel de 136.0 mg/dl y para los triglicéridos de 6.2 % a nivel de 159.0 mg/dl.

Glucosa.- La glucosa es oxidada en presencia de glucosa oxidasa (GOD) a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno formado, reacciona en presencia de peroxidasa (POD) con fenol y 4-aminoantipirina para formar un complejo rojo violeta de quinona. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de glucosa. Las reacciones son las siguientes:

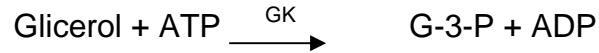


Colesterol.- La colesterol esterasa (CE) hidroliza los ésteres para originar colesterol libre y ácidos grasos. El colesterol libre producido más el colesterol preformado se oxida en presencia de colesterol oxidasa (Cox) para dar colest-4-en-3-ona y peróxido de hidrógeno. Un cromógeno quinonaimina, con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

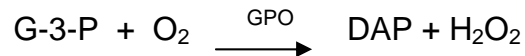


Triglicéridos.- a) El glicerol y los ácidos grasos se forman en una primera etapa por acción de la lipasa sobre los triglicéridos.

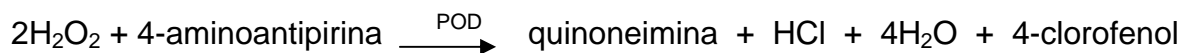
b) El glicerol se fosforila por el adenosin-5'-trifosfato (ATP) para producir glicerol-3 fosfato (G-3-P) y adenosin-5'-difosfato (ADP) en una reacción catalizada por la glicerol-cinasa (GK):



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



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



Determinaciones Hormonales.- Las concentraciones de insulina, glucagon y péptido c se determinaron en todos los participantes del estudio mediante estuches de radioinmunoanálisis comercialmente disponibles. El coeficiente de variación intra ensayo para la insulina fue de 8.25% a nivel de 122 μ UI/ml, para el péptido c de 8.17% a nivel de 6.0 ng/ml y para el glucagon 6.63% a nivel de 209 pg/ml.

Insulina.- La determinación de la insulina se hizo a través de un estuche de Diagnostic Systems Laboratories Inc (DSL). Se trata de un radioinmunoensayo de fase sólida, donde la insulina marcada con ¹²⁵I compite durante un tiempo fijo con la insulina de la muestra del paciente por sitios de unión al anticuerpo específico para la insulina.

El anticuerpo utilizado está inmovilizado en la pared de un tubo de polipropileno debido a ello la simple decantación de sobrenadante es suficiente para terminar la competencia y aislar la fracción de anticuerpo unido de la insulina marcada con el isótopo. La lectura del tubo se realiza en un contador gama, el resultado dado en cpm

(cuentas por minuto) se convierte por medio de una curva de calibración en una medida de la insulina (mUI/ml) presente en la muestra del paciente.

Glucagon.- Su determinación se realizó a través de un estuche de Diagnostic Products Corporation (DPC), un radioinmunoensayo secuencial. Después de preincubar la muestra del paciente con un anticuerpo anti-glucagon, el glucagon marcado con ^{125}I compete con el glucagon de la muestra por los sitios de unión de los anticuerpos, luego de incubarlo por un tiempo determinado, la separación del glucagon unido del glucagon libre, se logra mediante un método de doble anticuerpo acelerado por polietilenglicol, seguido de centrifugación. El precipitado que contiene la fracción unida al anticuerpo se lee en un contador gama y las concentraciones del paciente se extrapolan en una curva de calibración para conocer la concentración de glucagon presente ($\text{pg}/\mu\text{l}$).

Péptido c.- El procedimiento sigue el principio básico del radioinmunoanálisis donde hay una competencia entre el antígeno radioactivo y el no-radioactivo, por sitios sobre anticuerpos específicos. La cantidad de péptido-C marcado con ^{125}I unido al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de péptido-C no marcado. La separación del antígeno libre y unido se lleva a cabo fácilmente debido al sistema del doble anticuerpo.

Extracción de DNA.- El DNA se extrajo a partir de leucocitos de sangre periférica mediante una técnica estándar modificada por Buffone (Buffone y Darlington 1985). Se extrajeron 10 ml de sangre total y se depositaron en tubos cónicos de 50 ml con heparina, a los que se agregaron 25 ml de solución Sacarosa/Tritón 2X, se incubaron en hielo por 10 min y centrifugaron a 2000 rpm/15min, descartando el sobrenadante y agregando 4 ml de solución Sacarosa/Tritón 1x, se centrifugaron nuevamente a 2000 rpm/15min y decantaron cuidadosamente.

Al botón obtenido se adicionaron 3 ml de amortiguador de lisis, se mezcló suavemente y se agregó dodecil sulfato de sodio al 10%, se mezcló cuidadosamente y se agregaron 100 μl de proteinasa K al 0.5 % (Boehringer), se disolvió el botón y se incubó la solución toda la noche a 37°C . Posteriormente se agregó 1 ml de cloruro de

sodio saturado, se agitó vigorosamente y centrifugó a 2000 rpm/15min. se decantó el sobrenadante cuidadosamente depositándolo dentro de un tubo cónico limpio y descartando el botón.

El DNA se precipitó adicionando 2 volúmenes de etanol al 95%, finalmente se recuperó el DNA mediante una varilla de vidrio eliminando el cloruro de sodio mediante un lavado suave con etanol al 75%. Se removió el etanol por evaporación y se resuspendió el DNA en buffer TE (Tris-HCl-EDTA). El DNA se cuantificó espectrofotométricamente (260/280 nm) para conocer el grado de pureza (pureza óptima 1.8 – 2.0 densidades ópticas) y concentración.

PCR de HNF-4 α y Pax4.- Cada gen estudiado fue amplificado por PCR utilizando oligonucleótidos específicos que flanquearon cada uno de los exones (tabla 1 y 2). Para la PCR se utilizaron 100 ngr de ADN genómico, desoxi-nucleotriposfosatos (dNTPs) 25 μ M, DMSO (dimetil sulfóxido), Amortiguador 10X (500mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 9.0, 1% Triton X.100), Mg₂Cl 15mM, Oligonucleótidos específicos 20 μ M, 5 μ Ci [α ³²P]d CTP (Amersham) y 0.7 U de Taq DNA polimerasa (Bioselec S.A. de C.V.) en un volumen de 25 μ l para cada muestra. La amplificación de las muestras se realizó en un termociclador.

Las condiciones de los ciclos para la PCR fueron: desnaturalización a 95°C/5 minutos seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 95°C/30 segundos. La temperatura de alineamiento fue de acuerdo a la T_m (temperatura media de fusión) de cada par de oligonucleótidos usados, por un tiempo de 30 segundos, la extensión fue a 72°C/30 segundos con una extensión final de 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR obtenidos fueron cargados en un gel de agarosa al 1% con amortiguador TBE 1X y se corrieron electroforéticamente a 80Volts durante 1 hora para finalmente ser visualizados a través de un transiluminador (UV transilluminator M-20 UVP. CA. USA)

Secuencias de oligonucleótidos.- La secuencia de oligonucleótidos utilizados se baso en el diseño reportado por Yamagata para HNF-4 α y por Shimajiri para Pax4 (Yamagata y cols 1996, Shimajiri y cols 2001):

HNF-4 α

Exon	5' – 3'	3' – 5'	pb	TA
E1	GGGCACTGGGAGGAGGCAGT	GCCTGTAGGACCAACCTACC	340	65
E1B	TCTGGTGTGCACGACTGCAC	CTGGAGCTGCAGCCTCATA64	356	64
E2	AAGGCTCCCTTAGATGCCTG	CCACTCAGGGAGAAGACAGACCT	321	67
E3	CCTAGTTCTGTCTAAGAGG	GTCATAAAGTGTGGCTACAG	253	59
E4	CCACCCCTACTCCATCCCTGT	CCCTCCCGTCAGCTGCTCCA	271	68
E5	GTGCAGGGGACAGAGAATGC	AATCAAGCCAGTCCACGGCTAT	322	66
E6	GCCCAGCGTCACTGAGTTGGCTA	TTGCCTGGGTGAGTGCCATG	234	64
E7	GCACCAGCTATCTTGCCAAC	AGGAGAAGTCTGGCAGAGCG	315	66
E8	CTCCTTGTGTGACACAAGTC	CTCACTGTGTGAGGCCTGTC	407	61
E9	TGGTTGATTGGCCACGCCTG	ATCCTGGTTCTACCTTCTAG	341	59
E10	CATTTACTCCCACAAAGGCT	GACCACGTGATCACCAGGTG	277	59

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos empleados para amplificar el gen HNF-4 α .

PAX 4

Exón	5'-3'	3'-5'	pb	TA
E1	AGGTGGTGTGTGGATACCTC	CAGGCTCTTTGCCTTCAGAG	241	62
E2	CCATCATGCCTCACCTGTC	GCCTCTTTTCCAGCCCCAGTG	298	62
E3	CCTGAGTCTGAGCACCATCTC	GATTTGGCTGTGATTAGCCC	165	58
E4	CTGACCAGAGGAATCACCATC	CCCTGTGTCACACTGAGGAC	233	58
E5	GAGACCCATGCCTTGCTCCTC	GGCCCAGACTCTTCCTCCTTG	194	58
E6	GATCAGCAGGTGACAGGCAGC	GATGACTGAGCGGGCAGATG	173	58
E7	AGTGGCTGACTTTCCTAGAAC	GAGCCCATGAGCCCTTCAGTC	226	58
E8	CTCTACAGGAGGCATCACTG	GAGGTTGAGTCAGTCGACCCT	259	58
E9	GTCCCCACAGGCCACTTGC	TGGGCAGGATGGTATTAGATCTTCTATG	205	58

Tabla 2. Secuencia de oligonucleótidos empleados para amplificar el gen Pax4.

Cada oligonucleótido fue reconstituido con 500 μ l de agua desionizada, y una dilución 1:200 fue leída espectrofotométricamente (Espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS λ 20) para ajustar la concentración a 20 μ M para su uso.

SSCP.- Para efectuar el análisis del DNA mediante SSCP se llevó cabo una PCR en condiciones anteriormente descritas para cada uno de los exones a estudiar, los productos amplificados fueron desnaturalizados a 95°C/5 minutos y cargados en un gel de poliacrilamida al 5.4% y 8% en presencia y ausencia de glicerol al 10%. La electroforesis se llevó a cabo en un cuarto a temperatura ambiente por 24 hrs y 200 Volts. Después del corrimiento el gel fue secado en un desecador (Gel Dryer GD2A, Labnet) a 75°C durante 1 hr y fue expuesto a una placa radiográfica (X-OMAT Kodak) durante 12 hrs para finalmente ser revelado (Orita y cols 1989, Glavac y Dean 1995).

Secuenciación.- La secuenciación fue realizada mediante la técnica de Sanger (Sanger y cols 1977). De acuerdo a los resultados del análisis por SSCP, se escogieron aquellas muestras de DNA que presentaron un corrimiento electroforético diferente al corrimiento de todas las otras muestras. Las muestras escogidas se purificaron con un sistema de purificación rápida para PCR (Marligen Bioscience Inc).

La reacción de secuenciación se realizó mediante un estuche de secuenciación (TermoSequenase Radiolabeled, USB Corporation) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras de DNA preparadas para secuenciar fueron depositadas en un gel de acrilamida-urea al 6% en amortiguador TTE 0.8X (Tris Base-Taurina-Na₂EDTA·2H₂O) y corridas a 1800 Volts/2hrs. La secuenciación también fue realizada de forma automática mediante un secuenciador ABI PRISM 3100 de Applied Biosystems para confirmar los resultados obtenidos manualmente.

RFLP.- Se utilizaron dos endonucleasas de restricción la enzima Sfu I (*Sphaerotilus species*. Roche, Penzberg, Germany) para la mutación T130I en el exón 4 de HNF-4 α y la enzima Hsp92II (*Haemophilus influenzae* 92. Promega, Madison, WI, U.S.A.) para la mutación R133W en el exón 3 de Pax4. Así a partir del producto de PCR de un tamaño específico se generarán dos fragmentos más pequeños visibles al efectuar una electroforesis en un gel de agarosa al 3% en amortiguador TBE 1X.

Análisis estadístico.- Los análisis estadísticos fueron realizados usando el programa GraphPad Prism 4 (San Diego CA. USA) y SPSS versión 10.0 (Chicago IL). Un valor de p menor a 0.05 fue considerado como significativo.

8

RESULTADOS

DATOS BIOQUIMICOS

La tabla 3 muestra las determinaciones antropométricas realizadas a los sujetos diabéticos y no diabéticos (tabla 3).

Tabla 3. Medidas antropométricas de sujetos diabéticos y no diabéticos

Parámetro (Referencia)	Sujetos diabéticos	Sujetos no diabéticos	p
n	50	50	ns
Sexo (F/M)	38 / 12	29 / 21	ns
Edad al diagnóstico (años)	29 ± 7	57 ± 10	ns
IMC (Kg/m ²)	27 ± 5.0	26 ± 3.5	ns
ICC (M:<0.8; H:<0.9)	0.90 ± 0.038	0.88 ± 0.065	ns
ICE (< 0.5)	0.58 ± 0.029	0.55 ± 0.066	ns

Los datos mostrados son el resultado del promedio ± la DS
ns: no significativo

Los datos antropométricos muestran que los tres índices medidos (IMC, ICC, ICE) son ligeramente más altos en sujetos diabéticos que en los no diabéticos. Al realizar la

Prueba de Comparación Múltiple de Bonferroni a las diferentes edades de inicio de la diabetes, se observa que estos índices no incrementan con la edad (IMC $p = 0.15$, ICC $p = 0.12$, ICE $p = 0.13$).

Al hacer una agrupación de sujetos diabéticos con un IMC menor a 25 Kg/m^2 ($n = 18$) y mayor a 25 Kg/m^2 ($n = 44$) con el fin de asociarlos a los niveles de insulina mediante la prueba de Mann Whitney no hubo diferencias significativas entre los dos grupos formados ($13.2 \pm 11.6 \text{ mUI/ml}$ y $13.2 \pm 6.3 \text{ mUI/ml}$ respectivamente, $p = 0.15$).

Las concentraciones promedio de los niveles de glucosa en los sujetos diabéticos fue $212 \pm 73 \text{ mg/dl}$. Solo el 8% de ellos tuvo niveles de glucosa menores a 110 mg/dl , el 12% tuvo una concentración menor a 125 mg/dl , y el 80% presento niveles superiores a 126 mg/dl , lo que indica que el 80% de estos pacientes no tienen un buen control glucémico, propiciando el desarrollo de las complicaciones diabéticas.

La concentración promedio de glucosa no incrementó con la edad dentro del grupo diabético como fue demostrado por la prueba de Comparación Múltiple de Bonferroni ($p = 0.29$). Las concentraciones séricas de triglicéridos fueron más altas en sujetos con diabetes que en los sujetos no diabéticos ($p = 0.045$).

Las concentraciones hormonales mostraron que los sujetos diabéticos tienen mayores niveles de insulina y péptido C que los sujetos no diabéticos, posiblemente debido a que el 11.1 % de los sujetos diabéticos se administra insulina, generando un incremento en los niveles de ésta, no obstante el péptido c indica una producción baja de insulina en estos sujetos.

La tabla 4 muestra las determinaciones bioquímicas y hormonales de los sujetos diabéticos y no diabéticos. No se encontraron diferencias significativas para las concentraciones de colesterol y glucagon entre los sujetos diabéticos y sujetos no diabéticos.

Tabla 4. Determinaciones bioquímicas y hormonales de sujetos diabéticos y no diabéticos

Parámetro (Referencia)	Sujetos diabéticos	Sujetos no diabéticos	p
Glucosa (70-110mg/dl)	212 ± 73	96 ± 15	<0.0001
Colesterol (< 200 mg/dl)	204 ± 52	203 ± 32	ns
Triglicéridos (50 - 200mg/dl)	255 ± 176	177 ± 85	0.045
Insulina (5 - 25mUI/ml)	16 ± 17	6.5 ± 4.4	0.0001
Glucagon (59 - 177 pg/ml)	69± 49	70 ± 38	ns
Péptido C (1.1 - 3.2ng/ml)	1.0 ± 0.76	2.1 ± 1.4	<0.0001

Los datos mostrados son el resultado del promedio ± la DS

ns: no significativo

Complicaciones diabéticas expresadas en porcentaje

De los 50 sujetos diabéticos evaluados el 42 % presentaron alguna complicación generada por diabetes, la complicación más frecuente de diabetes en la población estudiada fue retinopatía específicamente glaucoma, seguida por neuropatía entre la que sobresale el adormecimiento de pies y manos y la neuropatía desmielinizante. La nefropatía ocupó el tercer lugar dentro de las complicaciones diabéticas destacando la insuficiencia renal aguda y crónica.

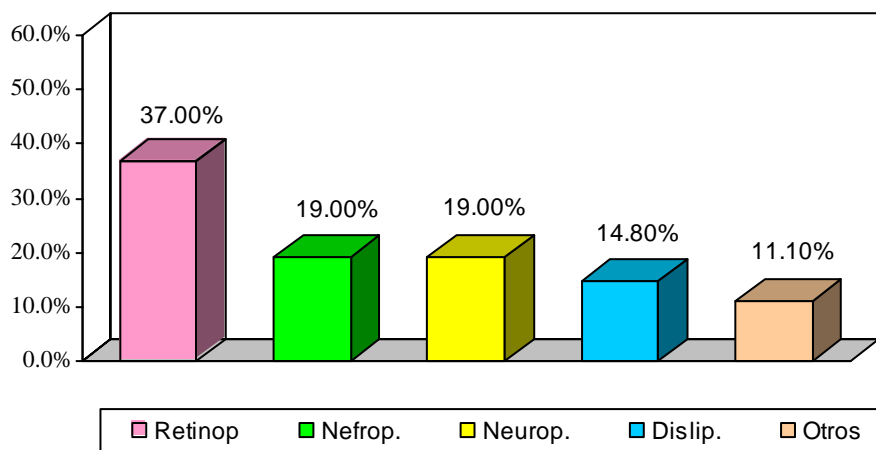


Fig. 9 Complicaciones diabéticas en pacientes con diabetes mellitus de inicio temprano.

Tratamiento recibido por los sujetos diabéticos.

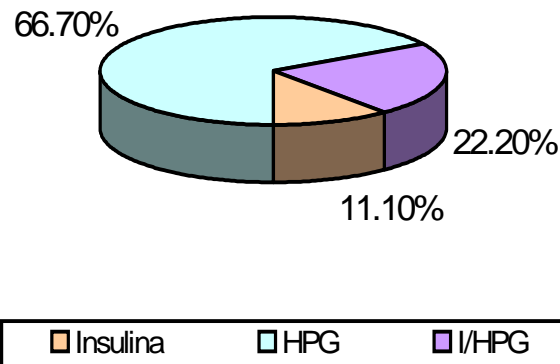


Fig. 10 Tratamiento que reciben los pacientes diabéticos.
HPG: Hipoglucemiantes I: insulina I/HPG: combinación

Como muestra la fig. 10 el 66.7% de los pacientes recibieron tratamiento con hipoglucemiantes entre los que se encuentran la tolbutamida y metformina un fármaco que estimula la secreción pancreática de insulina y el segundo disminuye la resistencia a la insulina. El 11.1% se administra insulina y el 22.2% recibe una terapia combinada (Figura 8).

EVALUACION DEL GEN HNF-4 α

Verificación de talla

Se realizaron 40 amplificaciones por PCR y 160 SSCP para el gen HNF-4 α . La figura 11 muestra las fotografías tipo de la talla de los exones 2, 4 y 5 de 321, 271 y 322 pares de bases (pb) respectivamente. La talla de los 10 exones fueron las esperadas, de acuerdo a las reportadas por el Genbank (número de acceso AH005099).

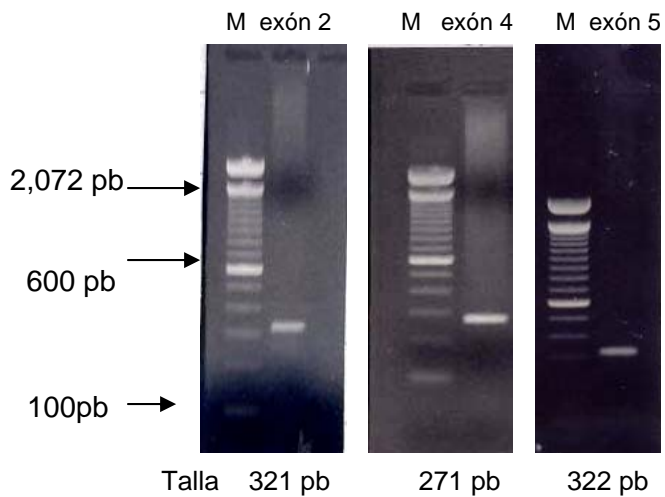


Fig.11 Verificación de tallas del producto de PCR para HNF-4 α .
M: marcador 100 pb.

SSCP

Una vez amplificadas las muestras de sujetos diabéticos y no diabéticos mediante PCR y [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP, los productos desnaturalizados se cargaron en geles de poliacrilamida al 5.4% y 8.0 %. La figura12 muestra una fotografía tipo de la PCR para el exón 4 de HNF-4 α , la flecha de 271pb indica la talla del exon amplificado, las flechas de 100 y 600pb indican las bandas correspondientes al marcador.

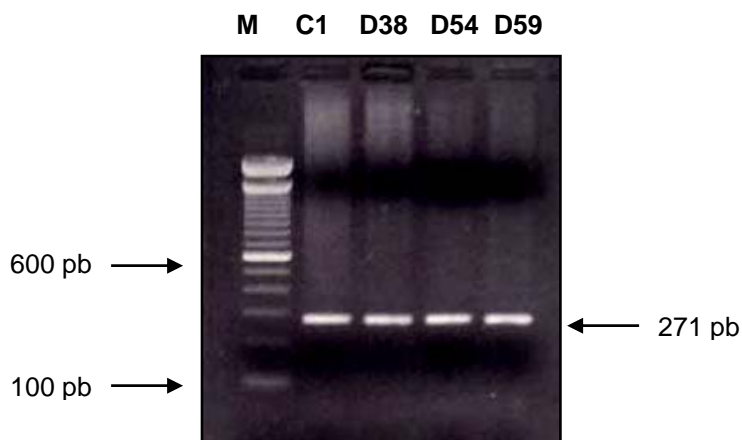
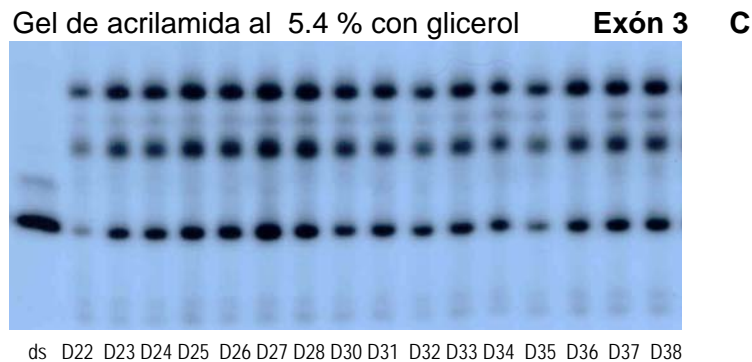
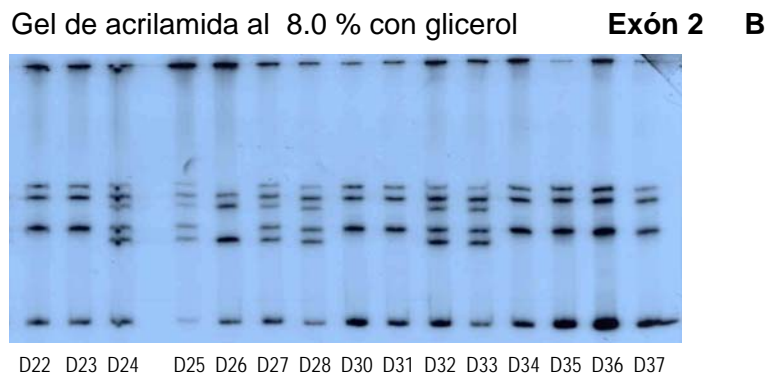
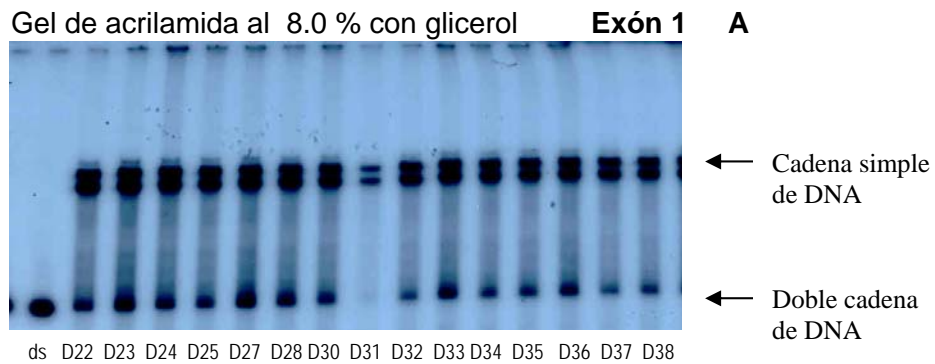
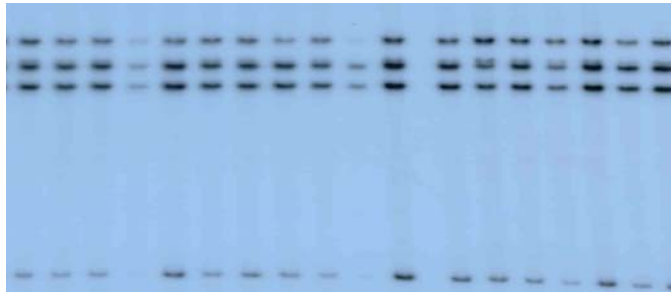


Fig. 12. PCR del exón 4 del gen HNF-4 α .
M: marcador 100 pb C1: sujeto no diabético, D38, D54 y D59: sujetos diabéticos.

Como ha sido mencionado para cada exón amplificado se realizaron cuatro SSCP, la figura 13 muestran al menos una de las cuatro placas radiográficas de aquellos exones en los que no se encontró ningún cambio. Donde la D representa a los pacientes diabéticos con el número de identificación asignado (D22, D23, D24, etc).

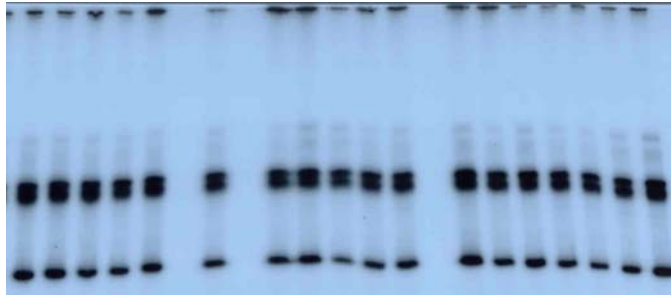


Gel de acrilamida al 5.4 % sin glicerol **Exón 5** **D**



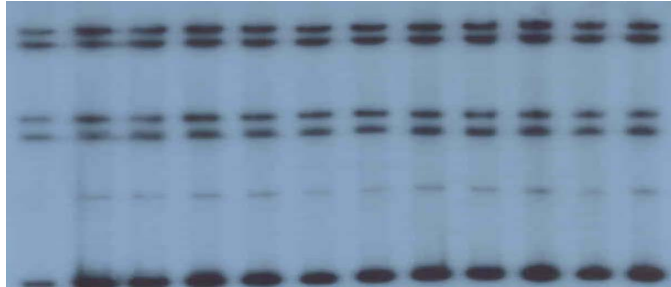
D22 D23 D24 D25 D26 D27 D28 D30 D31 D32 D33 D34 D35 D36 D37 D38 D39

Gel de acrilamida al 8.0 % con glicerol **Exón 6** **E**



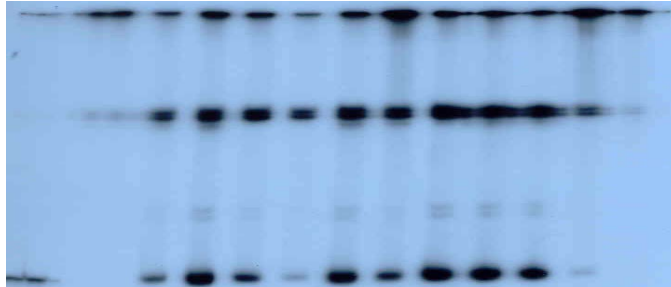
D22 D23 D24 D25 D26 D27 D28 D30 D31 D32 D33 D34 D35 D36 D37 D38 D39 D40

Gel de acrilamida al 8.0 % con glicerol **Exón 7** **F**



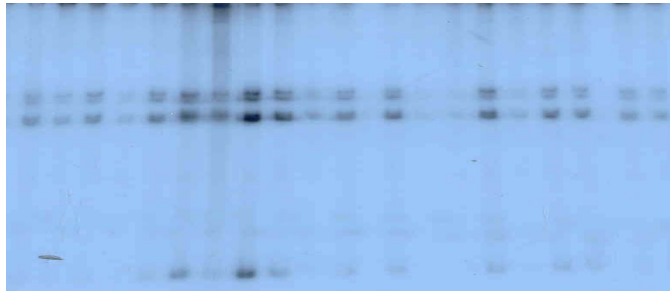
D22 D23 D24 D25 D26 D27 D28 D30 D31 D32 D33 D34

Gel de acrilamida al 5.4 % con glicerol **Exón 8** **G**



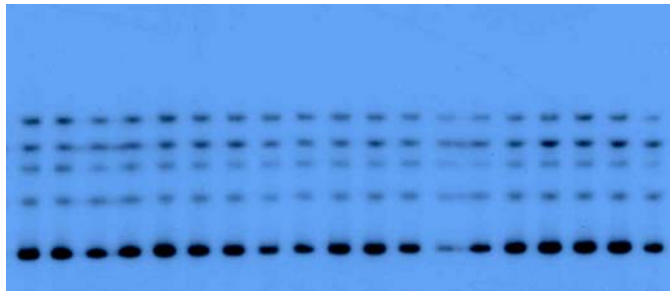
ds D22 D23 D24 D25 D26 D27 D28 D30 D31 D32

Gel de acrilamida al 8.0 sin glicerol **Exón 9 H**



D22D23D24D25D26D27D28 D30D31D32 D33 D34D35D36D37D38D39D40 D41

Gel de acrilamida al 5.4 con glicerol **Exón 10 I**



D22D23 D24D25 D26D27 D28 D30 D31 D32D33D34 D35 D36D37D38 D39D40 D41

Fig.13 Análisis por SSCP del gen HNF4 α en sujetos diabéticos. Los paneles A - I muestran todos los exones en los que no se encontró ningún cambio. El exón 2 (panel B) mostró diferencias en el patrón de migración.

En el panel B correspondiente al exón 2 se mostraron diferencias en el corrimiento electroforético de las muestras analizadas, la secuenciación automático reveló un cambio de secuencia dentro del intrón.

La figura 14 muestra las placas radiográficas de las cuatro SSCP efectuadas para el exón 4 de HNF-4 α .

En el panel A de la figura 14 se observan claramente tres muestras con un patrón de migración diferente (indicado por flechas), así los carriles correspondientes a las muestras de sujetos diabéticos D59, D25, D32 presentan una banda más que todas las demás muestras. En el panel B correspondiente a un gel de acrilamida al 8% se observa que las mismas muestras también presentan un corrimiento electroforético diferente, en ellas se aprecian tres bandas contra dos bandas de las otras muestras.

En el panel C y D no se observan cambios en el patrón de migración de las muestras.

La figura 15 muestra las fotografías de las placas radiográficas de la SSCP realizada en sujetos no diabéticos, un patrón electroforético diferente correspondiente a los sujetos no diabéticos CV2 y C13 puede observarse claramente en geles de acrilamida a concentraciones de 5.4% y 8.0% sin glicerol. En el corrimiento se observa una banda de más que no presentan las demás muestras debido al diferente acomodo que sufre la hebra del DNA cuando presenta pequeñas variaciones en su secuencia.

SSCP exón 4 HNF4- α en sujetos con diabetes

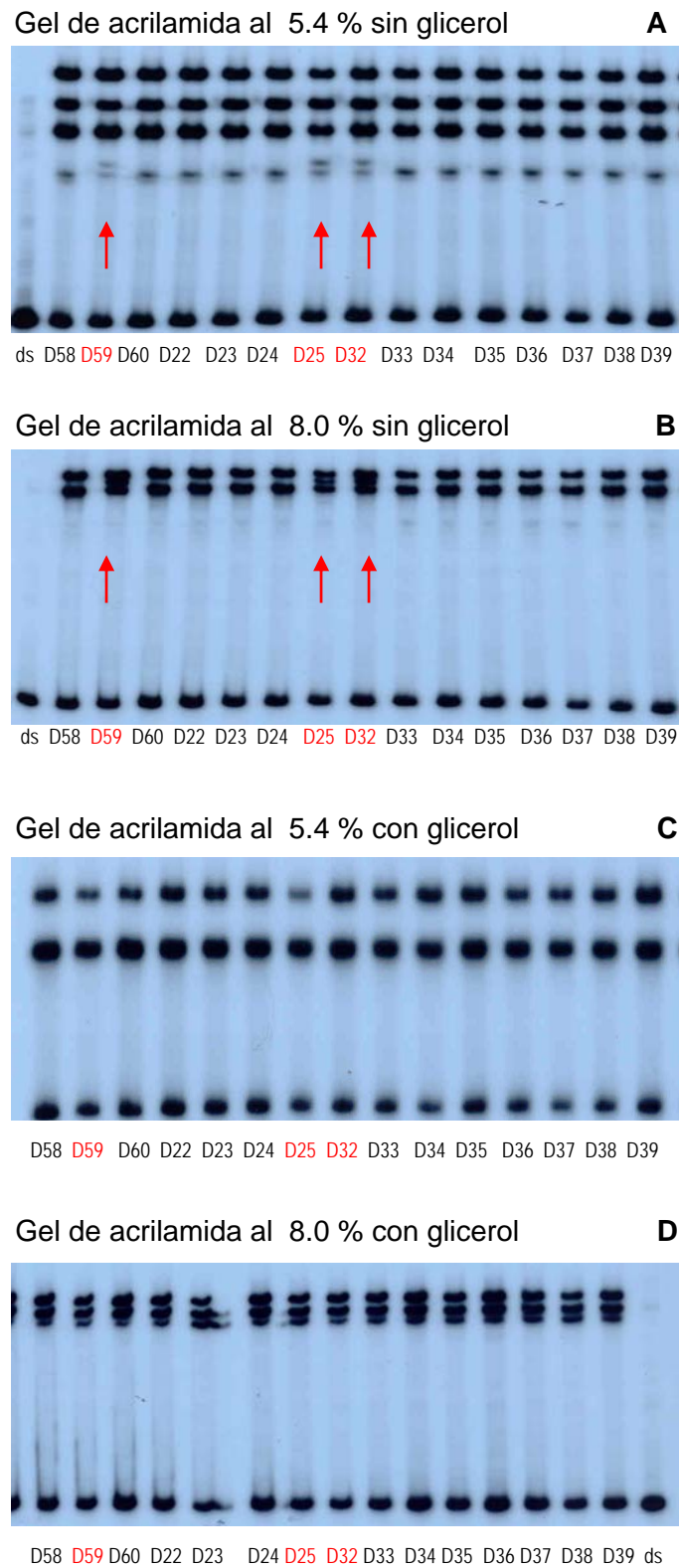


Fig.14 Análisis por SSCP del exón4 de HNF4 α en sujetos diabéticos. Las flechas indican los patrones de migración diferentes.

SSCP exón 4 HNF4- α en sujetos no diabéticos

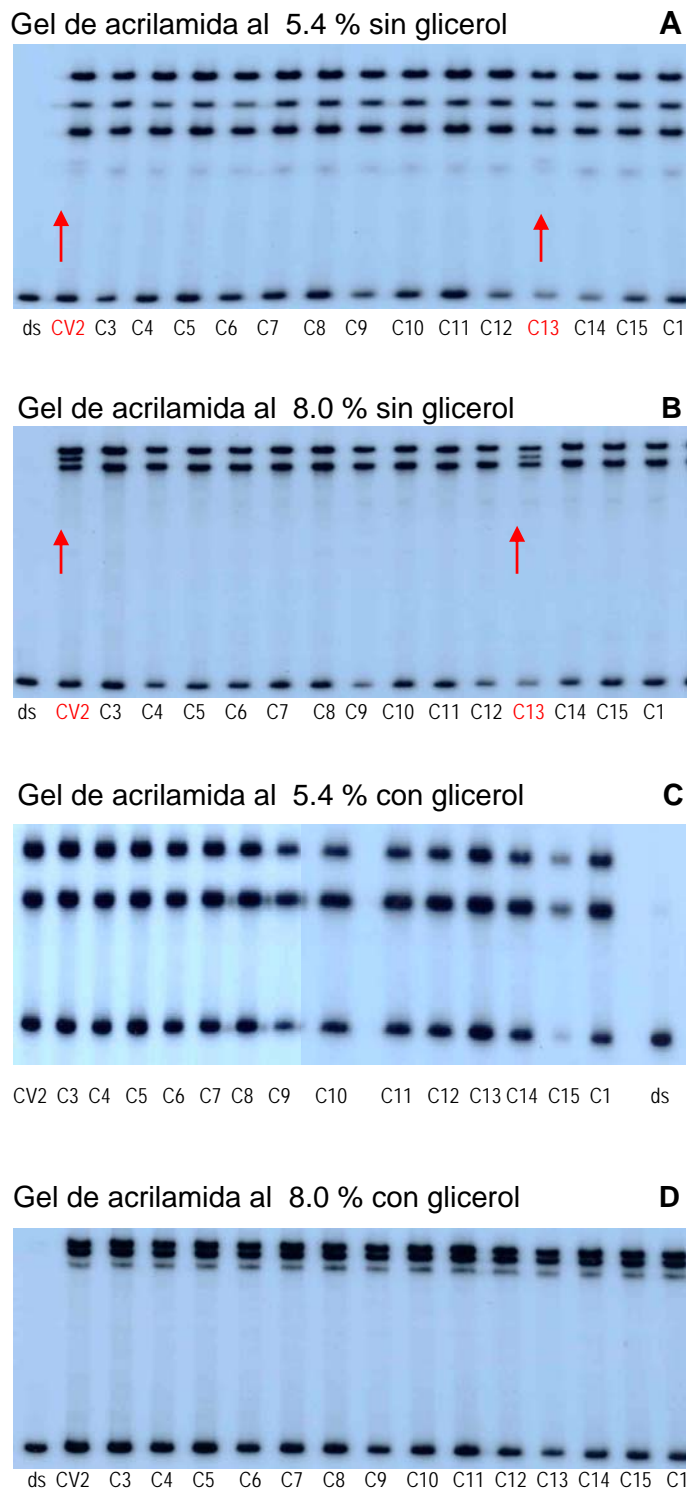


Fig.15 Análisis por SSCP del exón4 de HNF4 α en sujetos no diabéticos
Las flechas indican los patrones de migración diferentes.

Secuenciación manual

Las muestras con corrimiento electroforético diferente encontradas tanto en pacientes diabéticos como en sujetos no diabéticos fueron amplificadas nuevamente por PCR, y purificadas para su secuenciación manual y/o automática. La figura 16 muestra la secuenciación manual del exón 4 de un sujeto diabético (D59) y de un sujeto no diabético. En esta figura el panel “a” presenta la secuenciación de un sujeto no diabético que presenta el triplete ACT produciendo isoleucina (forma silvestre), el panel “b” presenta el triplete A ^C/_T T produciendo una treonina.

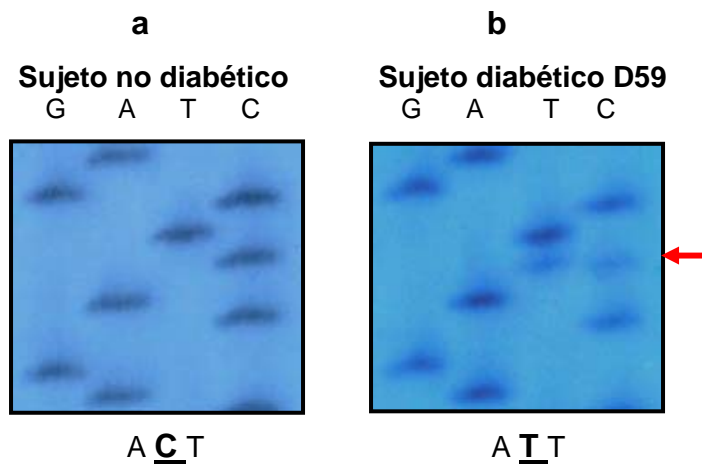


Fig. 16 Secuenciación manual de HNF-4 α exón 4, muestra D59. La flecha indica la presencia de citosina y timina en forma heterocigota.

Ambas secuencias fueron comparadas contra la secuencia de HNF-4 α reportada en el Genbank (numero de acceso AH005099), así la secuenciación de la muestra D59 permitió identificar el cambio de una citosina por una timina en el codón 130 (ACT por ATT) de manera heterocigota (flecha derecha), resultando en un cambio de aminoácido: treonina por isoleucina (T130I).

La secuenciación automática se llevo a cabo para confirmar los resultados obtenidos manualmente. La figura 17 muestra estas secuenciaciones.

Secuenciación automática

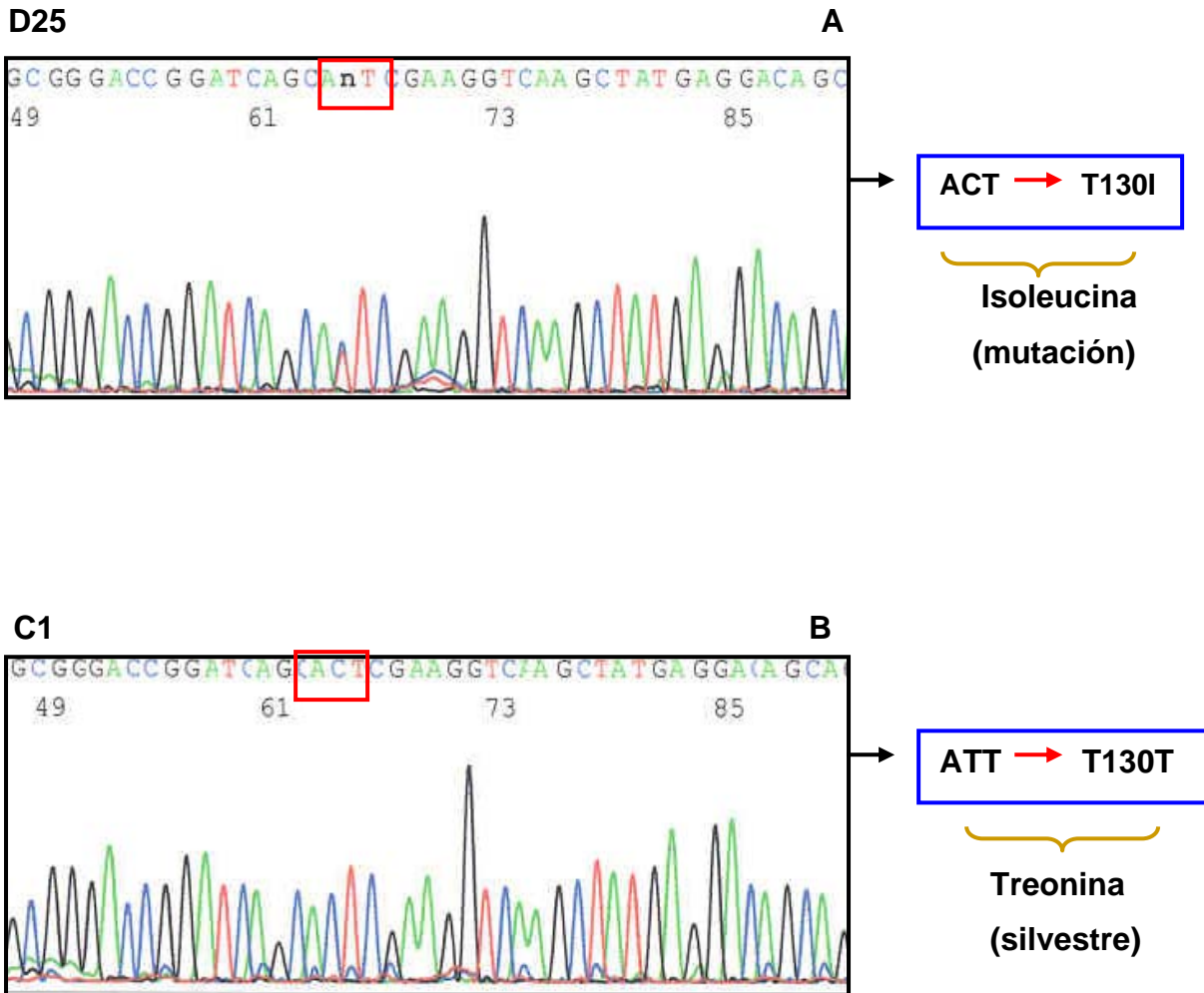
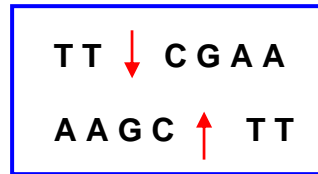


Fig.17 panel A secuenciación automática de la muestra de un sujeto diabético (D25), panel B secuenciación automática de la muestra de un sujeto no diabético. Los recuadros indican el cambio de base, la flecha a la derecha indica la variante y el aminoácido producido.

RFLP

La variante T130I genera un sitio de corte en presencia de la enzima Sfu I, la cual reconoce la secuencia:



Por tanto el producto de PCR de 271 pb en presencia de la enzima SfuI causa el corte del alelo ATT, generando dos fragmentos de 81 y 190 pb, de tal forma que los patrones ATT (isoleucina 81 + 190pb) y ACT (treonina 271 pb) pueden distinguirse fácilmente en un gel de agarosa al 3%. Con el reconocimiento de la enzima Sfu I a la variante encontrada, se pudo detectar de una forma rápida y sencilla la presencia y frecuencia de la T130I en los dos grupos estudiados.

La figura 18 muestra el análisis por RFLP del exón 4 de HNF-4 α en sujetos diabéticos y no diabéticos. Las flechas verticales indican las muestras que presentan la variante T130I (8 sujetos diabéticos D21, D25, D32, D42, D45, D52, D56 y D59 y 2 sujetos no diabéticos C13 y VC4), las flechas horizontales indican los fragmentos en pares de bases (pb) del marcador y de las muestras. Las muestras D45, D52, D56 y VC4 fueron corridas en otro gel de agarosa al 1%.

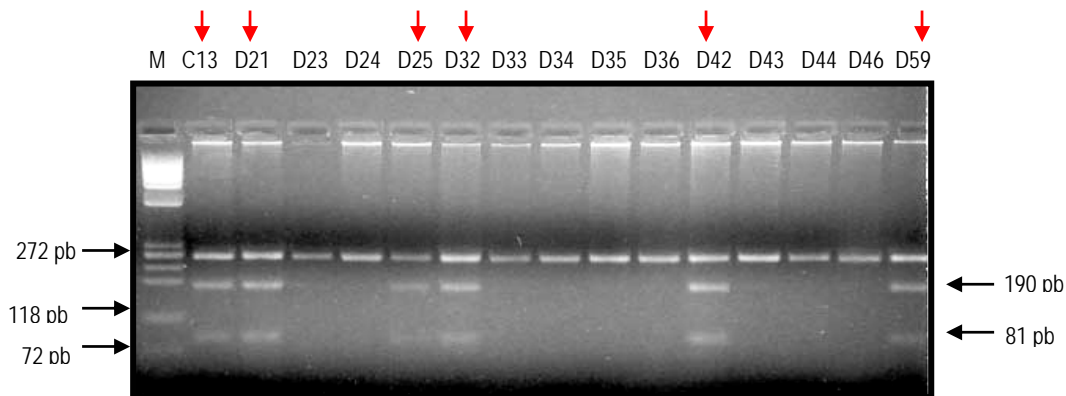


Fig. 18. RFLP de HNF-4 α exón 4 en sujetos diabéticos.
C: sujetos no diabéticos, D:sujetos diabéticos, M: marcador 100pb.

Así, la variante T130I tuvo una frecuencia del 16% en sujetos diabéticos y de 4% en sujetos no diabéticos.

La tabla 5 muestra los datos antropométricos, bioquímicos y hormonales de los sujetos diabéticos con presencia y ausencia de la variante T130I. Se observa, que hay una tendencia ($p = 0.078$) de aparición de la diabetes a edades más tempranas en aquellos pacientes con la variante T130I, por lo que a una edad similar entre sujetos diabéticos no portadores de la variante, los primeros presentarán mayor tiempo de evolución. El ICC y el ICE en sujetos diabéticos portadores de la variante T130I fue menor que en aquellos con alelo silvestre (ICC $p = 0.02$; ICE $p < 0.001$). No se encontraron diferencias significativas para el IMC, glucosa, colesterol, triglicéridos, insulina, glucagon y péptido C.

Las complicaciones diabéticas más frecuentes en los pacientes diabéticos portadores de la variante T130I fueron la retinopatía y la nefropatía con el 50 % cada una, seguido de la neuropatía con el 33.3%.

Tabla 5. Comparación de sujetos diabéticos con presencia y ausencia de la variante T130I.

Parámetro / Referencia	Alelo T130I n= 8	Alelo T130T n= 42	P*
Sexo (F/M)	7 / 1	31 / 11	
Edad	29 ± 7.7	30 ± 7.5	ns
Tiempo de evolución	9.1 ± 1.3	5.7 ± 0.78	0.078
IMC (Kg/m ²)	24 ± 3.5	27 ± 4.6	ns
ICC (M < 0.8, H < 0.9)	0.84 ± 0.08	0.9 ± 0.043	0.02
ICE (< 0.5)	0.58 ± 0.035	0.61 ± 0.007	< 0.001
Glucosa (70-110mg/dl)	174 ± 54	219 ± 75	ns
Colesterol (< 200 mg/dl)	205 ± 54	204 ± 52	ns
Triglicéridos (50 - 200mg/dl)	260 ± 130	254 ± 183	ns
Insulina (5 - 25mUI/ml)	12 ± 9.2	14 ± 11	ns
Glucagon (59 - 177 pg/ml)	112 ± 75	60 ± 38	ns
Péptido C (1.1 - 3.2ng/ml)	1.2 ± 0.95	0.97 ± 0.73	ns

Los datos mostrados son el resultado del promedio ± la DS
ns: no significativo * SPSS versión 10.0

La tabla 6 muestra los datos antropométricos, bioquímicos y hormonales de los sujetos no diabéticos que presentan la variante T130I y aquellos los sujetos no diabéticos sin esta variante. No se encontraron diferencias significativas para los sujetos

no diabéticos con presencia y ausencia de la variante T130I para todos los datos evaluados.

Tabla 6. Comparación de sujetos no diabéticos con presencia y ausencia de la variante T130I.

Parámetro / Referencia	Alelo T130I n= 2	Alelo T130T n= 48
Edad	57.5 ± 7.8	57 ± 10
Sexo (F/M)	0 / 2	29 / 19
IMC (Kg/m ²)	24.1 ± 1.48	25.6 ± 3.54
ICC (M < 0.8, H < 0.9)	0.95 ± 0	0.87 ± 0.065
ICE (< 0.5)	0.57 ± 0	0.55 ± 0.067
Glucosa (70-110mg/dl)	99.5 ± 21.9	95.4 ± 14.7
Colesterol (< 200 mg/dl)	189.2 ± 41.2	204 ± 32.4
Triglicéridos (50 - 200mg/dl)	193 ± 54.4	177 ± 86.6
Insulina (5 - 25mUI/ml)	7.65 ± 0.4	6.5 ± 4.5
Glucagon (59 - 177 pg/ml)	50.5 ± 10.5	71.3 ± 38.4
Péptido C (1.1 - 3.2ng/ml)	2.8 ± 3.1	2.0 ± 1.3

Los datos mostrados son el resultado del promedio ± la DS
SPSS versión 10.0

La variante T130I mostró una alta frecuencia en la población de estudio, la frecuencia génica y alélica se muestran a continuación:

Tabla 7. Frecuencia genotípica y alélica de la T130I

Cambio de aminoácido	Designación	Frecuencia genotípica		Frecuencia alélica		RM (95% IC)* X ² , p
		diabéticos	no diabéticos	diabéticos	no diabéticos	
Treonina ↓ Isoleucina	T 130 I	T/T:0(0%)	0 (0%)	0.08	0.02	4.57 (1.03,20.3) X ² =4, p= 0.045
		C/T: 8(16%)	2 (4%)			
		C/C:42(84%)	48 (96%)			

* SPSS versión 10.0

La forma heterocigota de la variante T130I tuvo una frecuencia génica del 16% y del 4% en diabéticos y no diabéticos respectivamente, mostrando una frecuencia alélica del 0.08 para sujetos diabéticos y 0.02 para sujetos no diabéticos con una razón de momios (RM) de 4.57 y una X²= 4.0 (p=0.045).

EVALUACION DEL GEN PAX-4

Verificación de talla

Se realizaron 40 amplificaciones por PCR para el gen Pax 4. La figura 19 muestra las fotografías tipo de la talla de los exones 7, 8 y 9 de 226, 259 y 205 pb respectivamente de acuerdo con el marcador de DNA usado. La talla de los 10 exones fueron las esperadas, de acuerdo a las reportadas por el Genbank (Proyecto Genoma Humano HUGO).

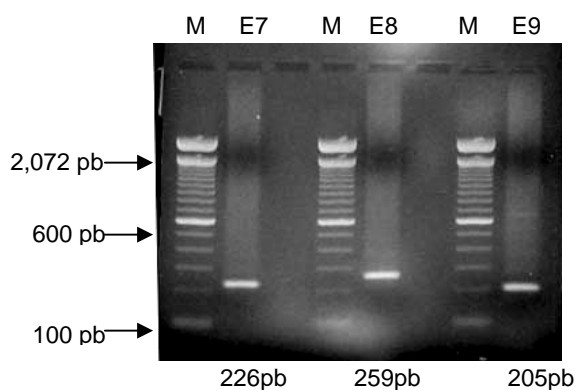


Fig. 19. Verificación de tallas del producto de PCR para Pax4 exónes 7, 8 y 9. M: marcador 100 pb. E: exón

SSCP

Una vez amplificadas las muestras de sujetos diabéticos y no diabéticos por PCR con [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP, se cargaron en geles de poliacrilamida para la realización de SSCP. La figura 20 muestra una fotografía tipo de la PCR para el exón 3 de Pax 4, la flecha que marca 165 pb indica la talla del exon amplificado, las flechas que marcan 100 y 600 pb indican las bandas correspondientes al marcador utilizado.

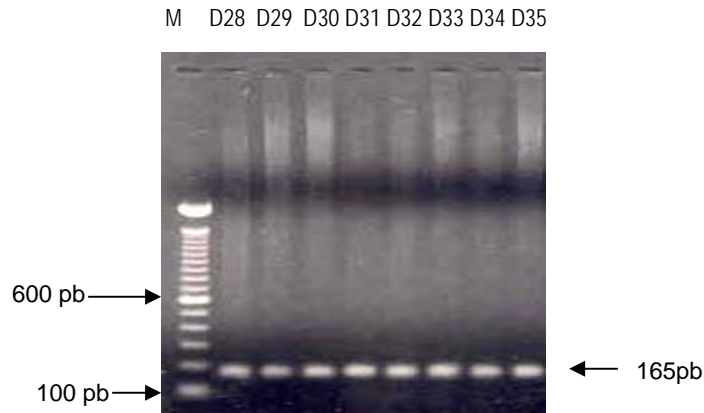
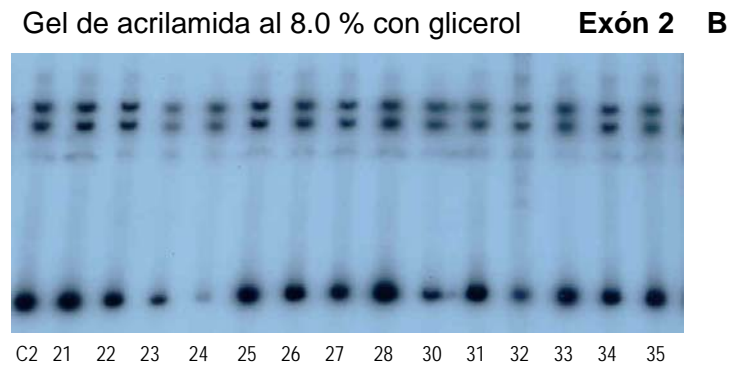
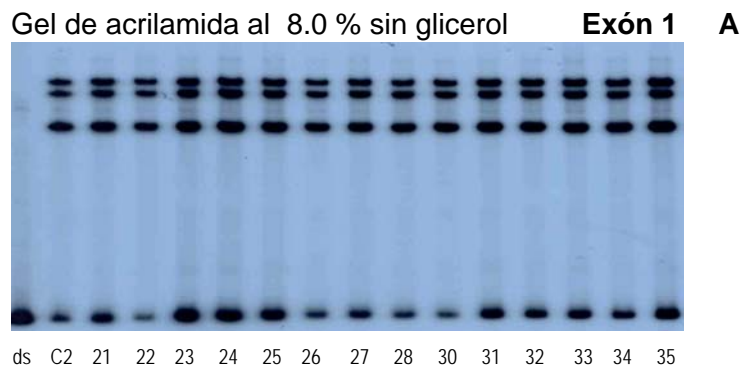
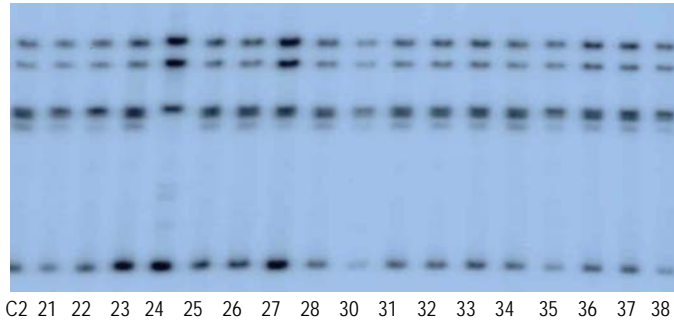


Fig.20. PCR del exón 3 de Pax-4
M: marcador 100 pb. D: diabético

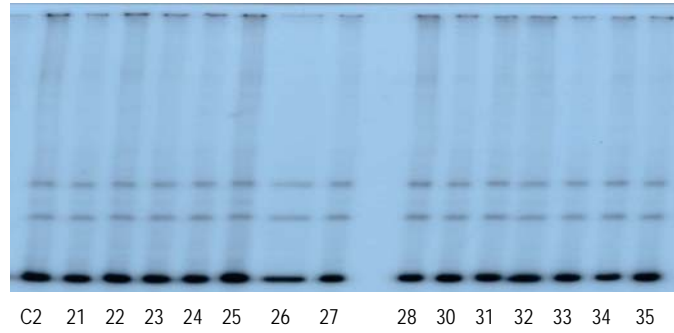
Para cada exón amplificado de Pax4 se realizaron cuatro análisis por SSCP, la figura 21 muestran al menos una de las cuatro placas radiográficas de aquellos exónes en los que no se encontró ningún cambio. La letra C corresponde a pacientes no diabéticos y los numero arábigos representan a los pacientes diabéticos.



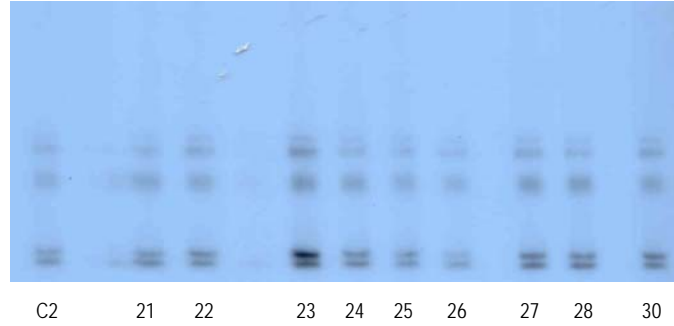
Gel de acrilamida al 8.0 % sin glicerol **Exón 4 C**



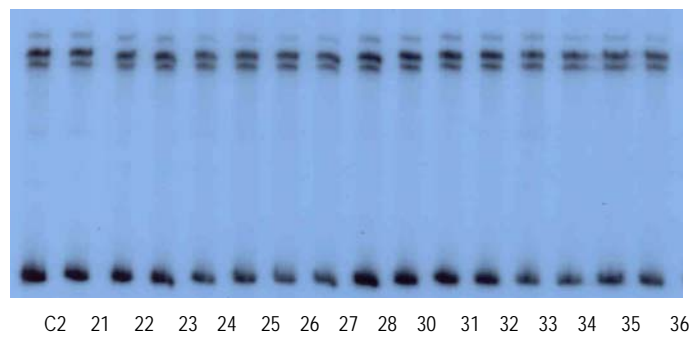
Gel de acrilamida al 8.0 % con glicerol **Exón 5 D**



Gel de acrilamida al 8.0 % con glicerol **Exón 6 F**



Gel de acrilamida al 8.0 % sin glicerol **Exón 7 G**



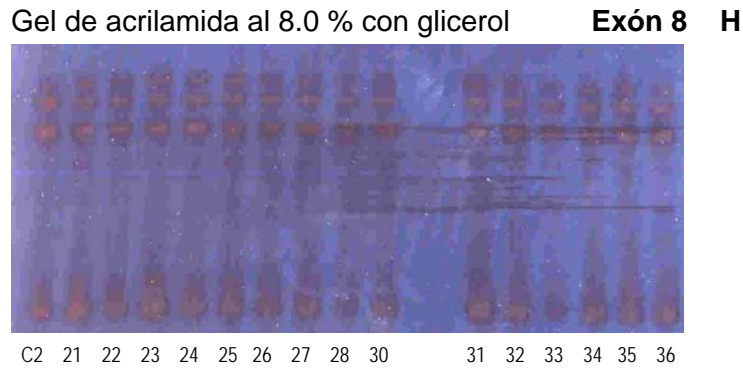


Fig.21 Análisis por SSCP del gen Pax4 en sujetos diabéticos. Los paneles A - H muestran todos los exones en los que no se encontró ningún cambio.

La figura 22 muestra las SSCP para el exón 3 de Pax4, en el panel A la flecha indica un patrón electroforético distinto a todas las demás muestras, correspondiente a una paciente con diabetes (muestra D33), la cual presenta dos bandas de más que pueden observarse claramente. En el panel B la misma muestra presenta también un corrimiento electroforético diferente comparada con las otras muestras.

En el panel C la muestra D33 no presenta cambios en su patrón de migración. En el panel D se aprecia que la muestra D33 también presenta un corrimiento electroforético diferente en el que se observa una banda adicional (parte superior indicada por la flecha).

La figura 23 muestra el corrimiento electroforético de muestras de sujetos no diabéticos, no se encontró ningún patrón de corrimiento diferente. La letra C indica los sujetos no diabéticos usados como control y los números arábigos representan a los pacientes diabéticos.

SSCP exón 3 de Pax4 en sujetos diabéticos

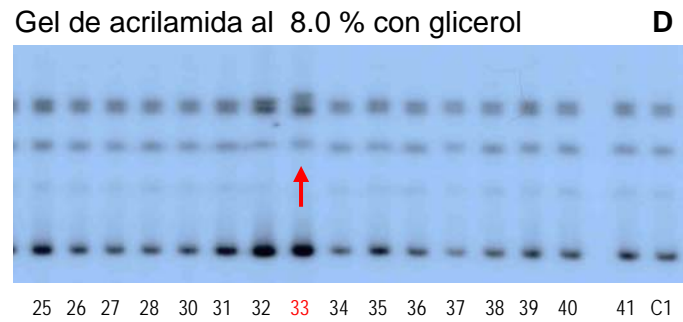
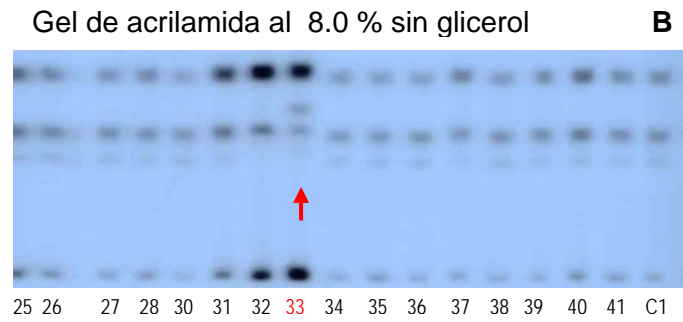
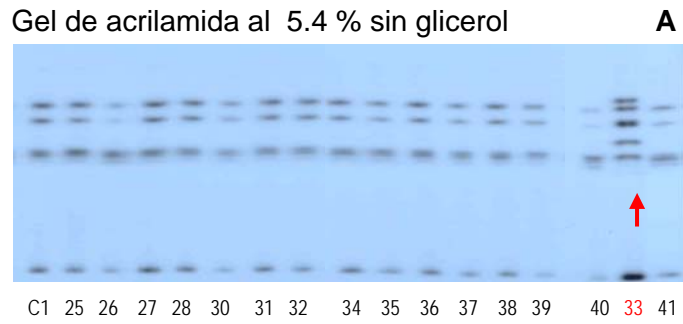


Fig.22 Análisis por SSCP del exón 3 de Pax 4 en sujetos diabéticos. Las flechas indican el patrón de migración diferente de la muestra D-33.

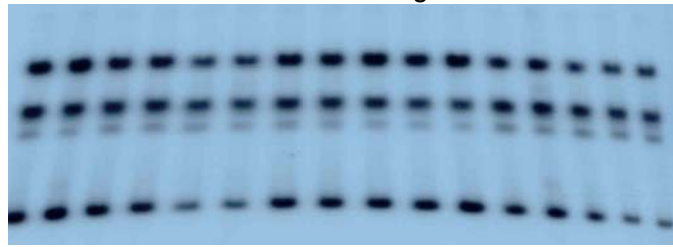
SSCP exón 3 de Pax4 en sujetos no diabéticos

Gel de acrilamida al 5.4 sin glicerol **A**



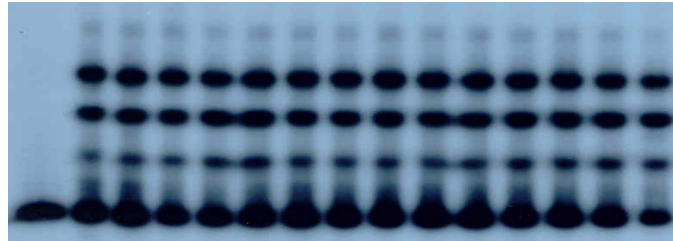
C1 C2 C3 C4 C5 C6 C7 C8 C9 C10 C11 C12 C13 C14 C15

Gel de acrilamida al 8.0 % sin glicerol **B**



C1 C2 C3 C4 C5 C6 C7 C8 C9 C10 C11 C12 C13 C14 C15 C16

Gel de acrilamida al 5.4 % con glicerol **C**



Ds C1 C2 C3 C4 C5 C6 C7 C8 C9 C10 C11 C12 C13 C14

Gel de acrilamida al 8.0 % con glicerol **D**



C1 C2 C3 C4 C5 C6 C7 C8 C9 C10 C11 C12 C13 C14 C15

Fig.23 Análisis por SSCP del exón 3 de Pax 4 en sujetos no diabéticos.

Secuenciación automática

La muestra D33 con un corrimiento electroforético diferente fue amplificada por PCR y purificada para su secuenciación automática. La figura 24 muestra la secuenciación de la muestra D33 y de la muestra de un sujeto no diabético. La comparación de las dos secuenciaciones realizadas contra la secuencia reportada por el Genbank (base de datos HUGO) para el gen Pax4 permitió identificar la sustitución de una citosina por una timina (**CGG** por **TGG**) en el codón 133 de forma heterocigota, cambiando un aminoácido aromático: triptofano por uno con carga positiva: arginina designándose a la variante como R133W.

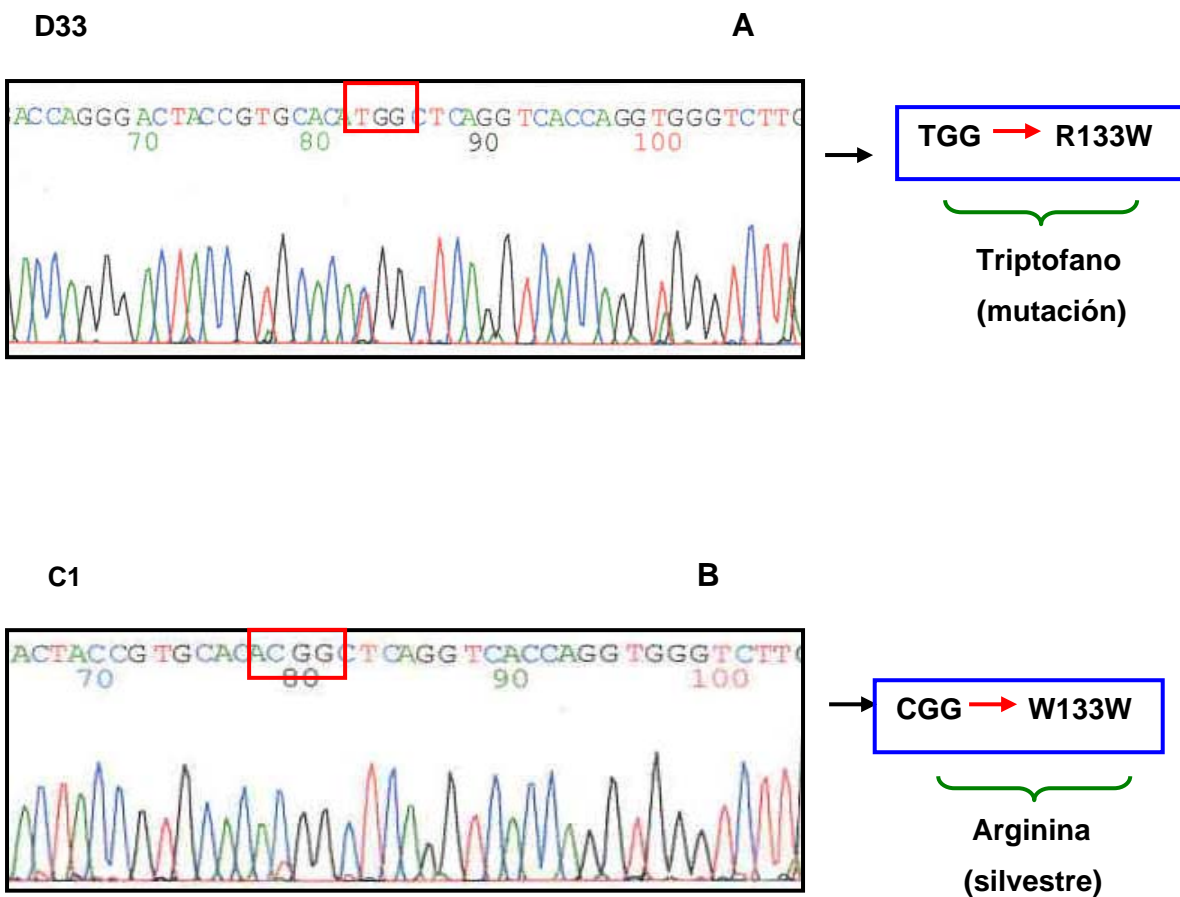
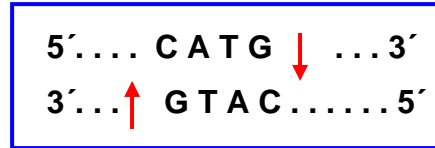


Fig.24 panel A secuenciación de la muestra de un sujeto diabético (D33). Panel B secuenciación de un sujeto no diabético. Los recuadros indican el cambio de base, las flechas indican la variante y aminoácido producido.

RFLP

La variante R133W genera un sitio de restricción con la enzima Hsp92II la cual reconoce la secuencia:



Así del producto de PCR de 165 pb en presencia de la enzima Hsp92II resulta en el corte del alelo con el codón TGG, generando dos fragmentos de 109 y 56 pb, generando dos patrones TGG (triptofano 109 + 56 pb) y CGG (arginina 165 pb) que pueden distinguirse en un gel de agarosa al 3%. Con el reconocimiento de la enzima Hsp92II a la variante R133W se realizó el análisis por RFLP para todos los sujetos diabéticos y no diabéticos de este estudio. No se encontró ninguna otra muestra con la variante R133W.

La fig. 25 muestra el corte específico con la enzima Hsp92 II generado por la variante R133W, las flechas indican los fragmentos en pares de bases (pb) del marcador (flechas izquierdas) y de las muestras (flechas derechas).

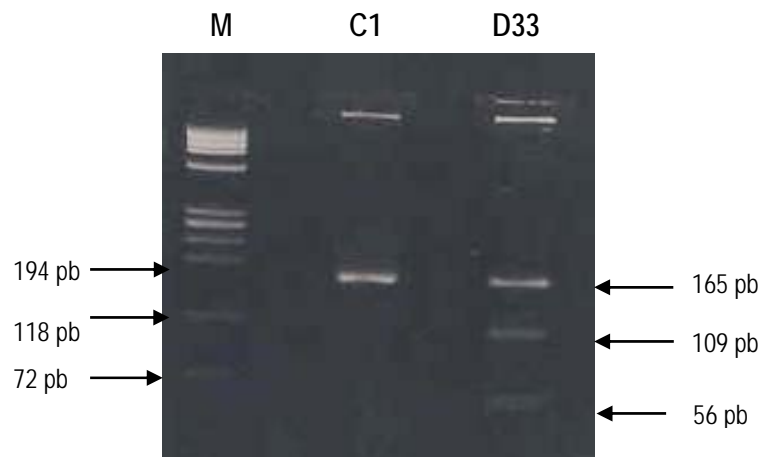


Fig. 25 RFLP de la muestra D-33.
M: marcador Φ X174, C: control, D:diabético

La mutación R133W, se encontró en una sola familia con diabetes de inicio temprano de las 50 familias evaluadas y no se encontró en ninguno de los 50 sujetos no diabéticos utilizados como control. El sujeto propósito fue una mujer de 41 años de edad, reveló que en su segundo embarazo a la edad de 25 años presentó diabetes gestacional, a los 32 años edad acudió al hospital por presentar fatiga generaliza donde se diagnosticó diabetes mellitus y fue tratada con hipoglucemiantes orales (glibenclamida y metformina) hasta la fecha. Sus características bioquímicas y metabólicas se muestran en la tabla 8.

Los datos bioquímicos indican que el nivel glucémico es alto, los niveles de colesterol y triglicéridos se encuentran también incrementados. Las concentraciones hormonales son normales.

Tabla 8. Características clínicas de la paciente con la variante R133W

Parámetro (Referencia)	Resultado
Genotipo	R133W
Género	Femenino
Edad	41
Edad al diagnóstico	32
Patrón de herencia	Autosómica dominante
IMC (< 25 kg/m ²)	24.0 kg/mt ²
ICC (M< 0.8, H< 0.9)	0.92
ICE (< 0.5)	0.56
Glucosa (70-110mg/dl)	212 mg/dl
Colesterol (< 200 mg/dl)	273 mg/dl
Triglicéridos (50 - 200mg/dl)	266 mg/dl
Insulina (5 - 25mUI/ml)	7.7 uU/ml
Glucagon (59 - 177 pg/ml)	187.8 pg/ml
Péptido C (1.1 - 3.2ng/ml)	1.22 ng/ml
Tratamiento	Hipoglucemiantes orales
Complicaciones	Neuropatía diabética

La variante R133W ha sido reportada como específica de población originaria de África, se caracteriza por generar diabetes propensa a la cetosis, un subtipo raro de diabetes en la que se observa deficiencia de insulina (Mauvis y cols 2004).

El familiograma mostró que su abuela materna, su madre y dos primos maternos presentan diabetes mellitus, de los cuales todos con excepción de su abuela materna han sido diagnosticados a edades tempranas.

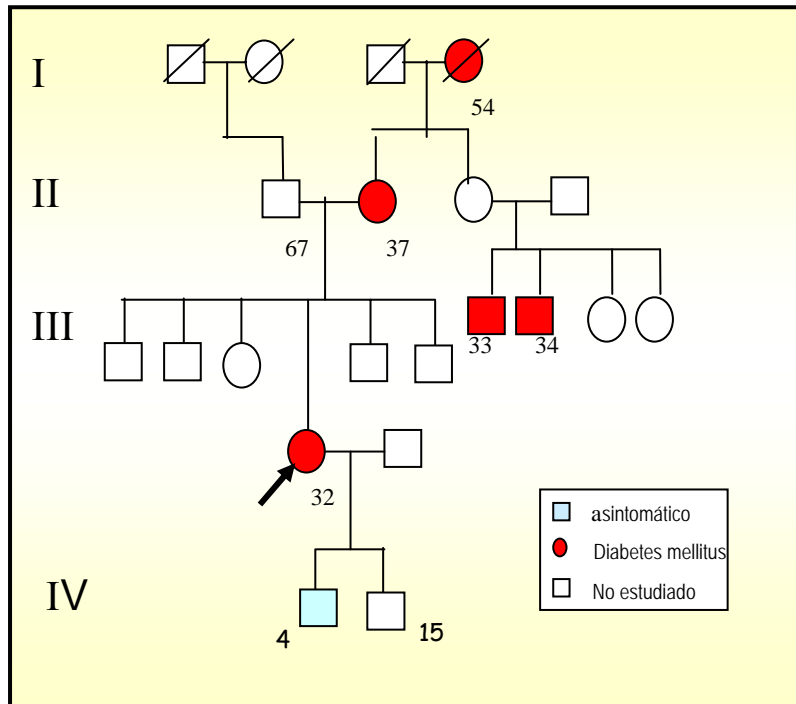


Fig. 26 Familiograma de la paciente D33

La paciente D33 tiene 2 hijos varones, a los dos se les realizó un análisis por RFLP con la enzima Hsp92II para conocer si eran portadores de la variante R133W. Actualmente el hijo mayor tiene 15 años (H1) y el menor 4 (H2). La figura 27 muestra los resultados obtenidos:

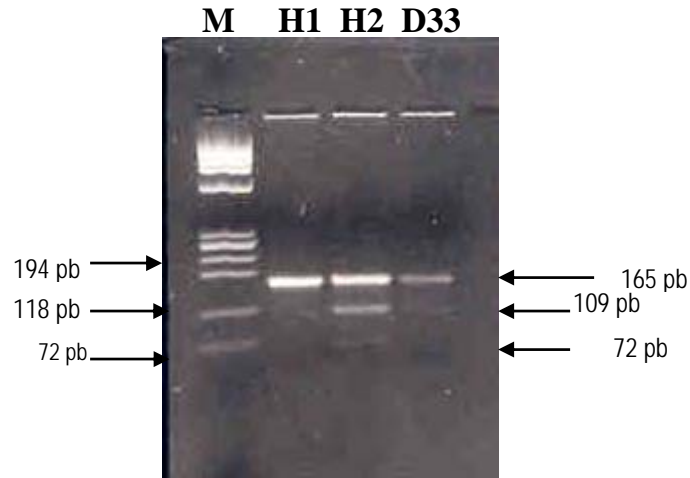


Fig. 27. RFLP de los hijos de la paciente D33.
M: marcador Φ 174. H1: hijo mayor H2: hijo menor.

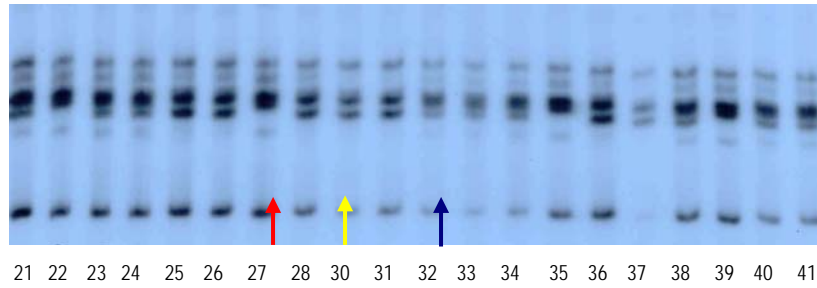
Se identificó la variante R133W en el hijo menor de la paciente D33, sus datos bioquímicos no muestran ninguna alteración (glucosa 79mg/dl, colesterol 109mg/dl, triglicéridos 77mg/ml).

Por otro lado la evaluación por SSCP del exón 9 permitió la identificación de otra variante. La figura 28 muestra las SSCP de sujetos diabéticos con tres diferentes patrones de corrimiento (indicados por flechas), estos mismos patrones se observan en el patrón de migración de sujetos no diabéticos como lo muestra la figura 29 (flechas). La letra C indica aquellos sujetos no diabéticos utilizados como control, los numero arábigos representan a los pacientes diabéticos estudiados.

SSCP exón 9 de Pax4 en sujetos diabéticos

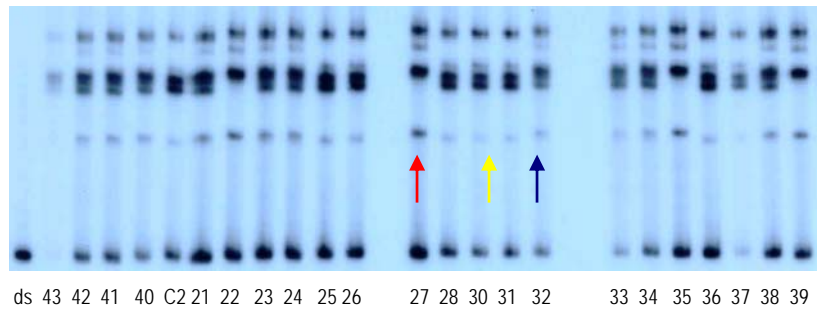
Gel de acrilamida al 5.4 % sin glicerol

A



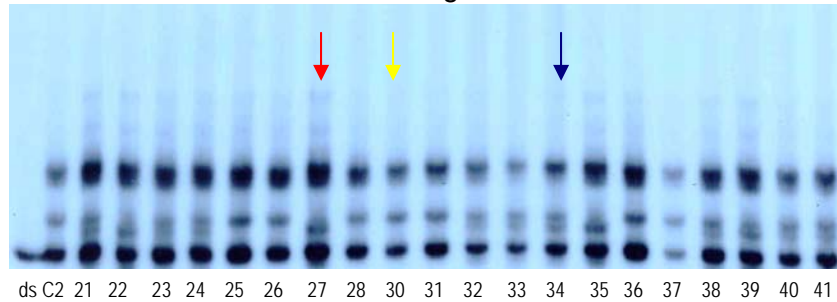
Gel de acrilamida al 8.0 % sin glicerol

B



Gel de acrilamida al 5.4 % con glicerol

C



Gel de acrilamida al 8.0 % con glicerol

D

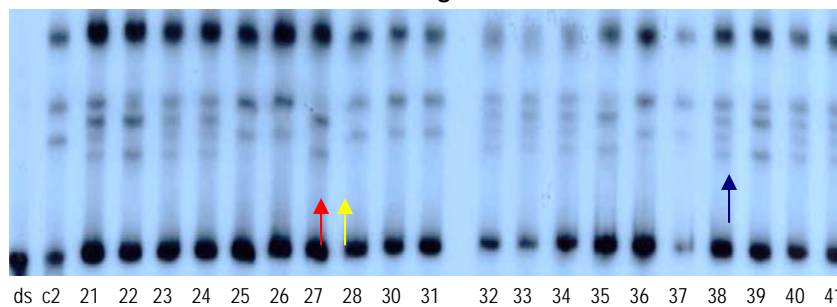
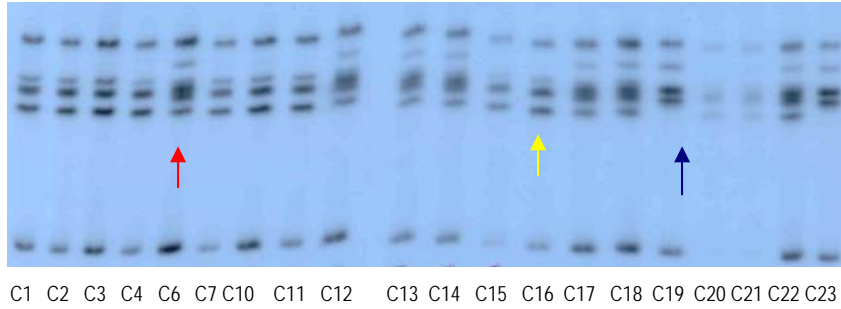


Fig.28 Análisis por SSCP del exón 3 de Pax 4 en sujetos diabéticos. Las flechas indican los diferentes patrones de migración observados

SSCP exón 9 de Pax4 en sujetos no diabéticos

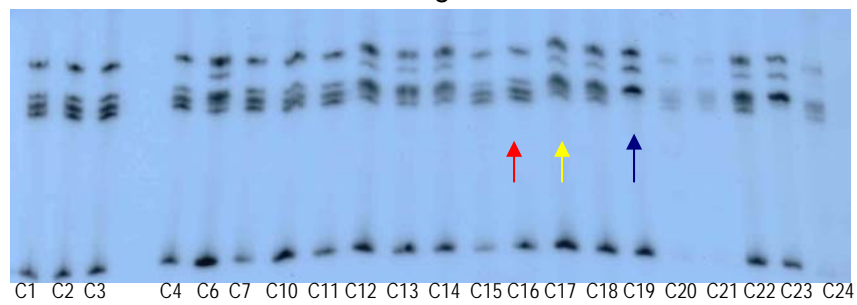
Gel de acrilamida al 5.4 % sin glicerol

A



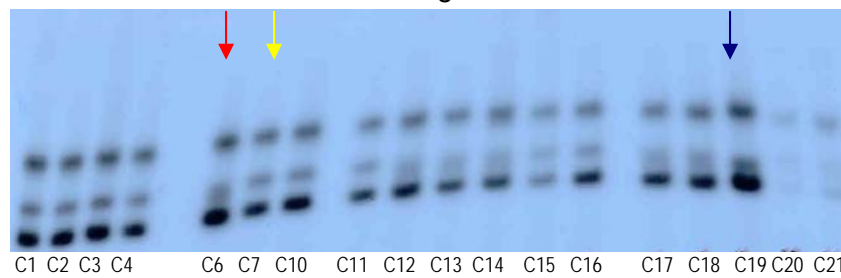
Gel de acrilamida al 8.0 % sin glicerol

B



Gel de acrilamida al 5.4 % con glicerol

C



Gel de acrilamida al 8.0 % con glicerol

D

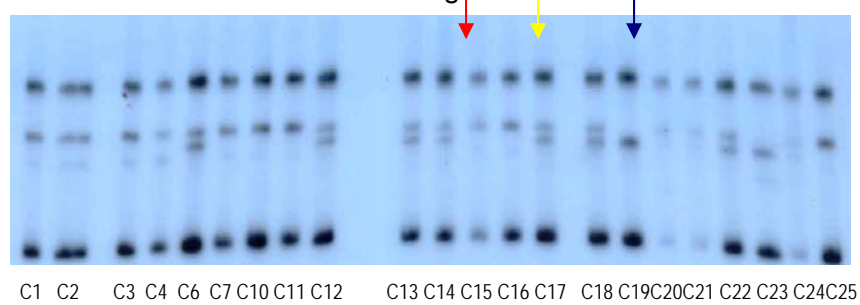


Fig. 29 Análisis por SSCP del exón 3 de Pax 4 en sujetos no diabéticos. Las flechas indican los diferentes patrones de migración observados

Secuenciación manual

La muestra de un sujeto no diabético (C2,) y de 3 sujetos diabéticos (D34, D35, D38), con un corrimiento electroforético diferente entre ellas se amplificaron por PCR, se purificaron y se secuenciación de forma manual y automática para su confirmación. La figura 28 muestra la secuenciación manual de la muestras con corrimiento electroforético diferente.

La comparación de las dos secuenciaciones realizadas contra la secuencia reportada por el Genbank para el gen Pax4 permitió identificar la sustitución de una base citosina por una adenina (CCC por CAC) en el codón 321 de forma homocigoto y heterocigoto tanto en sujetos diabéticos como no diabéticos generando el cambiando de prolina por histidina, designándose a la variante como P321H. La figura 31 muestra la secuenciación automática de las muestras D35, D38 y C2.

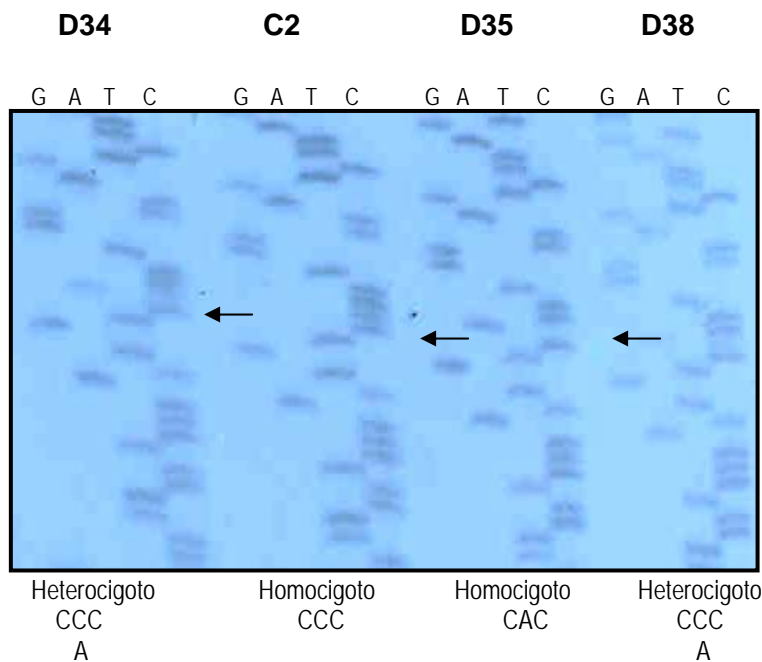
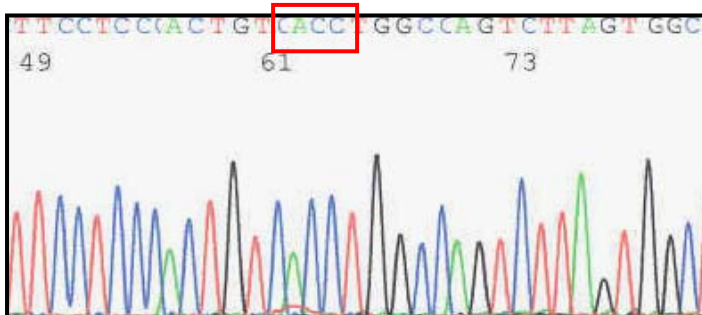


Fig. 30. Secuenciación manual de Pax4 exón 9.
Las flechas indican el cambio de citosina por adenina.

Secuenciación automática

Muestra D-35:

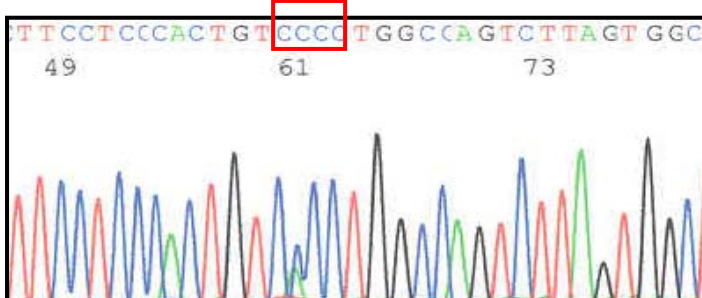


CAC → H321H



Histidina (homocigota)
alelo mutado

Muestra D38:

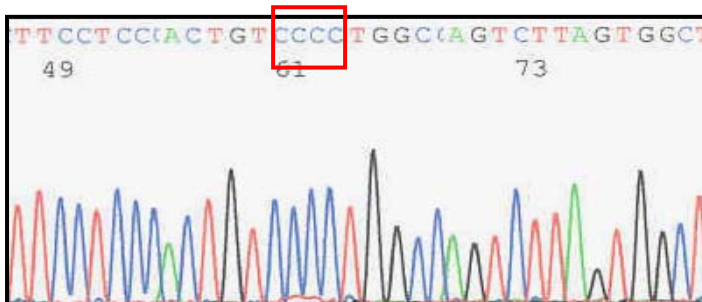


CCC → P321H
A



Histidina (heterocigota)
alelo mutado

Muestra C2:



CCC → P321P



Prolina (homocigota)
alelo silvestre

Fig. 31 Secuenciaciones automáticas de Pax4 exón 9

La siguiente tabla muestra las frecuencias alélicas para los sujetos diabéticos y no diabéticos estudiados:

Tabla 9. Frecuencia alélica y genotípica de la variante P321H

Población	Genotipos			Frecuencia alélica 321 H	RM (95% IC) X ² , Valor de p*
	P / P	P / H	H / H		
Sujetos con DM	33.3%	47.6%	19%	0.428	1.25 (0.65, 2.42)
Sujetos Control	43.4%	47.8%	8.7%	0.326	X ² =0.47 p=0.49

* SPSS versión 10.2

La frecuencia alélica para el grupo con diabetes fue de 0.428 y para los sujetos no diabéticos de 0.326, con una razón de momios (RM) de 1.25, una $\chi^2 = 0.47$ y un valor de $p = 0.49$.

En resumen este trabajo muestra 3 variantes de secuencia encontradas, la variante T130I (HNF4- α) y P321H (Pax4) encontrada tanto en sujetos diabéticos y no diabéticos y la variante R133W encontrada solamente en una paciente con diabetes. La tabla 11 muestra estos cambios:

Tabla 10. Variantes encontradas en la población de estudio.

Gen	Localización	Codón	Cambio de nucleótido	Designación
HNF-4 α	exón 4	130	ACT(Thr) \rightarrow ATT(Ile)	T 130 I
PAX4	exón 3	133	CGG(Arg) \rightarrow GG(Trp)	R 133 W
	exón 9	321	CCC(Pro) \rightarrow CAC(His)	P 321 H

DISCUSION

En este trabajo se estudiaron los factores transcripcionales HNF-4 α y Pax4 para conocer la existencia de variantes de secuencia que pudieran conferir susceptibilidad a padecer diabetes en sujetos mexicanos. Los sujetos propósito de las familias seleccionadas tuvieron una edad de diagnóstico menor a 35 años, tres generaciones de personas con diabetes (preferentemente por una sola línea), y sin obesidad.

En los dos grupos estudiados (sujetos diabéticos y no diabéticos) los datos antropométricos muestran que hay tendencia al sobrepeso y al acumulo de grasa en la zona abdominal en la población en general. Estudios relacionados a obesidad y sobrepeso han mostrado que el patrón de distribución del tejido adiposo en población mexicana se concentra mayormente en el tronco y en el segmento superior del cuerpo (Ríos y cols 2005).

La diabetes mellitus es una enfermedad compleja en la que están implicados mecanismos celulares, bioquímicos y genéticos que contribuyen a la presencia constante de hiperglucemia, resultando en un desequilibrio metabólico que hace difícil su control, y que favorece la aparición de complicaciones (Brownlee, 2001, Méndez, 2003). En este contexto los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que solo el 20% de los sujetos diabéticos tuvieron un control glucémico adecuado (8% < 110 mg/dl, 12% < 125 mg/dl), no así el 80 % restante, en donde la glucosa estuvo en concentraciones elevadas (> 126 mg/dl).

La importancia de mantener un valor glucémico menor a 126 mg/dl radica en que a esta concentración se generan los primeros daños vasculares que propician las complicaciones diabéticas (Expert Comitte 2003). Asimismo, es claro que el problema no es solo controlar los niveles séricos de glucosa sanguínea, sino que también es importante la educación del paciente y de su familia así como el manejo óptimo de dislipidemias, control de peso y el fomento del autocontrol (González y León 2002).

Los elevados niveles de glucosa en los pacientes estudiados indican que ellos no recibieron un tratamiento adecuado o bien que el cumplimiento dietético y farmacológico no se llevó a cabo como fue prescrito. El alto porcentaje de descontrol glucémico concuerda con el estudio de UKPDS donde establece que el comportamiento progresivo de la enfermedad produce fallas en el tratamiento con monodrogas, inclusive insulina, después de seis años de iniciado el esquema terapéutico lo que contribuye a la pronta aparición de complicaciones diabéticas y a una expectativa de vida menor (UKPDS 1998).

Así en este trabajo la complicación más frecuente dentro de la población diabética estudiada fue la retinopatía con 37.0 %, seguida por la nefropatía y neuropatía con el 19.0% cada una, la dislipidemia estuvo presente en un 14.8% de la población diabética. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Rodríguez y cols donde la retinopatía también ocupa el primer lugar con 10.9%, seguido de la nefropatía con 9.1% en población diabética del Estado de México (Rodríguez y cols 2003). Otros estudios realizados en población mexicana con diabetes indican que el 14 % desarrolla nefropatía, el 10 % neuropatía, 7-10 % pie diabético y del 2-5 % retinopatía (Vázquez y cols 2006).

Los resultados de este trabajo sugieren que los sujetos mexicanos con diabetes poseen una especial predisposición a padecer oftalmopatías como principal complicación diabética. Estudios sobre retinopatía diabética sugieren que los pacientes mexicanos con diabetes mellitus poseen genes localizados dentro del complejo mayor de histocompatibilidad clase II relacionados con la susceptibilidad para el desarrollo de retinopatía diabética proliferativa como es el DR6, ese mismo estudio indica que también hay variantes de los genes que se relacionan con su protección como son DR9, DR10 y DR5 (De Anda-Turati y cols, 2000).

Por otro lado debido a que HNF-4 α regula la expresión de genes involucrados en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas es probable que la presencia de mutaciones en este gen provoquen alteraciones en la expresión de distintos genes y función de varios órganos (Cereghini 1996, Herman y cols 1997, Bagwell y cols 2004).

Así las complicaciones diabéticas más frecuentes en los pacientes diabéticos portadores de la variante T130I son la retinopatía y la nefropatía con el 50 % cada una, seguido de la neuropatía con el 33.3%. No se encontraron diferencias significativas (retinopatía $p = 0.63$; nefropatía $p = 0.30$, neuropatía $p = 0.30$) con los diabéticos no portadores.

También se observó que las mujeres diabéticas portadoras de la variante T130I presentan una frecuencia mayor de alteraciones ginecológicas como trastornos menstruales, amenorrea, miomatosis uterina y vulvovaginitis, sin embargo al compararlas con las no portadoras no se encontraron diferencias significativas (diabéticas portadoras 42.9 %, diabéticas no portadoras 22.2 %, $p = 0.30$), no obstante sería interesante conocer la relación que existe entre estas alteraciones con el gen HNF-4 α .

Los resultados hormonales mostraron que en el grupo diabético las concentraciones séricas de insulina fueron mayores que en el grupo no diabético ($p = 0.0001$) debido muy probablemente a la administración de insulina que el 66.7 % de los sujetos diabéticos realiza como parte de su tratamiento, no obstante la concentración promedio de péptido c en sujetos diabéticos estuvo disminuida, indicando una pobre secreción de insulina y por tanto un defecto secretor de la célula beta pancreática ($p < 0.0001$ entre los dos grupos evaluados).

Los estudios moleculares para el gen HNF-4 α determinaron la existencia de la variante T130I con una frecuencia génica que a la fecha es la más alta reportada en el mundo, así se encontró que en sujetos no diabéticos la T130I estuvo presente en el 4% y en sujetos diabéticos la T130I estuvo presente en el 16% de ellos. La misma variante ha sido encontrada con una frecuencia menor en distintas poblaciones: japonesa: sanos 0.8%, diabéticos 3.5% (Zhu y cols 2003), danesa: sanos 1.9%, diabéticos 4.7%, sueca: sanos 5.1%, diabéticos 5.4% (Moller y cols 1997) y Checa: sanos 0.98%, diabéticos 0.02% (Pruhova y cols 2003).

En otras poblaciones la T130I no se ha encontrado, como es el caso de la población china donde no se encontró ninguna mutación para este gen (Yu y cols 2005). En familias españolas (Costa y cols 2000, Barrio y cols 2002), y francesas (Bulman y cols 1997) con diabetes tipo MODY, tampoco se reportaron la variante T130I, sugiriendo que esta variante pudo ser parte del fondo genético de la población mesoamericana aun antes de la llegada de los conquistadores españoles a América.

La existencia de la variante T130I se reportó por primera vez en sujetos norteamericanos no diabéticos con un frecuencia génica del 5% (Yamagata y cols 1996). En otros estudios realizados en población caucásica americana con diabetes de inicio temprano la T130I tuvo una frecuencia alélica similar entre sujetos diabéticos: 0.04 y sujetos no diabéticos: 0.03 (Malecki y cols 1998a), en los dos estudios la T130I se consideró como un polimorfismo. En un tercer reporte realizado en población caucásica americana la variante T130I fue relacionada a diabetes mellitus de inicio tardío con una frecuencia génica en el grupo control de 3.0 % y en el grupo diabético de 2.2 %, concluyendo que la variante T130I no tenía impacto sobre la susceptibilidad al desarrollo de diabetes tipo 2 (Malecki y cols 1998b).

Diferentes estudios han asociado la diabetes tipo 2 con la región cromosómica donde se localiza el gen HNF-4 α (cromosoma 20 q12-q13.1), tales estudios se han realizado en distintas poblaciones del mundo (Bowden y cols 1997, Ji y cols 1997, Ghosh y cols 1999, Lindner y cols 1997, Kupla y cols 2000, Permut y cols 2001) y dado el papel de HNF4 α como regulador en páncreas e hígado entre otros órganos, podría ser uno de los genes involucrados en el desarrollo de diabetes.

El análisis estadístico realizado en este trabajo mostró que la variante T130I se asocia con un riesgo mayor de padecer diabetes (RM 4.57, $p = 0.045$). Los resultados concuerdan con los obtenidos en población japonesa y danesa, donde el alelo 130I también estuvo asociado a la enfermedad (Zhu y cols 2003, Ek y cols 2005).

La T130I es una mutación localizada en el dominio D, por lo que afecta al dominio de unión al DNA, localizado en la región llamada box-A, la cual es importante para la homodimerización y la unión al DNA con alta afinidad. El residuo treonina es conservado en humano, rata, ratón y *Xenopus*.

Los estudios funcionales han mostrado que la T130I es una mutación con pérdida de la función ya que su actividad transcripcional disminuye en un 46.2 % en células HepG2 y en cultivo primario de hepatocitos de ratón comparada con la HNF-4 α silvestre, así como en células COS7 donde la actividad disminuye en un 76% (Zhu y cols. 2003, Ek y cols 2005). Con base a estos antecedentes, es de esperarse que la mutación T130I participe en la patogénesis de la diabetes, sin embargo, dado que en nuestro estudio todos los sujetos portadores fueron heterocigotos, el impacto de la mutación es de alguna manera parcial o compensada por el alelo silvestre.

Por otro lado, los índices ICC e ICE revelaron una disminución significativa entre los sujetos diabéticos portadores y no portadores de la variante T130I (ICC 0.84 ± 0.08 y 0.9 ± 0.043 respectivamente con un valor de $p = 0.02$, ICE 0.58 ± 0.035 y 0.61 ± 0.007 respectivamente con un valor de $p < 0.001$). Este resultado puede ser explicado con base en el tiempo de evolución de la enfermedad en los diabéticos con la T130I, ya que el tiempo promedio de evolución entre los sujetos diabéticos portadores y no portadores de la variante fue de 9.1 ± 1.3 años y 5.7 ± 0.78 años respectivamente, con un valor de $p = 0.078$, si bien no hubo una diferencia significativa, los datos sugirieron que los portadores de la variante presentan la enfermedad a una edad más temprana que los no portadores.

La concentración de triglicéridos en los sujetos diabéticos con la mutación T130I estuvieron incrementadas, contrario a los reportado en la literatura donde la presencia de mutaciones en el gen HNF-4 α se asocia a bajas concentraciones de triglicéridos debido a una expresión alterada de lipoproteínas hepáticas (Shih y cols 2000).

Tales discrepancias pueden explicarse por la presencia de otras variantes o polimorfismos sobre el gen HNF-4 α u otros genes con los que este interactúe y que pudieran producir diferentes impactos sobre los niveles funcionales de los genes blanco que regulan (Gragoli y cols 2004).

A la fecha se han detectado más de 20 variantes de secuencia sobre HNF-4 α en el mundo asociados a diabetes tipo MODY. En México se han identificado 3 variantes: la T130I encontrada en este trabajo y las variantes N126H/Y y R154Q (Aguilar-Salinas y cols 2000), sugiriendo que HNF-4 α tiene pocas variantes de secuencia en la población

mexicana, a diferencia de otras poblaciones en las que el gen HNF-4 α es altamente polimórfico (Yamagata y cols 2003).

El segundo gen evaluado fue Pax4 el cual participa en la morfogénesis pancreática en etapa embrionaria y funcionamiento de las células beta en edad adulta (Berry 2002). Dada su participación dentro del metabolismo de la glucosa y la presencia de mutaciones reportadas en familias diabéticas con características MODY se concibió la idea de buscar variantes polimórficas sobre este gen en sujetos mexicanos con diabetes de inicio temprano. La evaluación de los 9 exones que conforman el gen mostró la presencia de 2 variantes de secuencia: R133W y P321H.

La variante R133W en el gen Pax4 se encontró en una sola familia mexicana con diabetes de inicio temprano. Debido a que ninguna otra variante fue identificada en pacientes diabéticos ni en sujetos control, probablemente se trate de una mutación.

Los datos bioquímicos indicaron un descontrol metabólico en la paciente portadora de este cambio de secuencia, ya que las concentraciones de glucosa, colesterol y triglicéridos se encontraron arriba del valor de referencia.

Las concentraciones de insulina y péptido c se encontraron en valores normales pero cercanas al límite inferior de referencia, sugiriendo que la variante R133W podría estar implicada en la disminución de la secreción de insulina. Así realización de la técnica del “Modelo mínimo” sería interesante para observar la sensibilidad a la insulina cuando se administra una carga de glucosa por vía intravenosa (Bergman y cols 1987). También debe tomarse en cuenta que la mutación se presenta en forma heterocigota, por lo que el alelo silvestre podría reducir el daño provocado por el alelo mutado y así evitar una severa deficiencia de insulina.

La variante R133W se encuentra localizada entre el *paired domain* y el homeodominio, los estudios funcionales han demostrado que la mutación R133W causa una disminución de aproximadamente el 37% de la función represora normal de Pax4, pudiendo ser resultado de un deterioro en la especificidad de unión, o por una interacción alterada con otros factores transcripcionales (Mauvis y cols 2004).

Pax4 ha sido propuesto como un gen represor, específicamente de células alfa productoras de glucagon a través del homeodominio y extremo carboxilo terminal de la molécula (Smith y cols 1999), por tanto al no tener una función represora normal, no

reprimirá del todo a las células alfa, permitiendo un incremento en la síntesis de glucagon por parte de estas células (Smith y cols 2000) lo cual pudiera explicar el incremento de 20 unidades sobre el nivel máximo normal de glucagon que presenta la paciente con la variante R133W.

La mutación R133W se ha reportado como específica de población africana, encontrándose asociación con el riesgo de padecer diabetes propensa a cetosis (KPD), que representa un subgrupo poco frecuente de diabetes tipo 2 caracterizada por una severa deficiencia de insulina (Mauvis y cols 2004). La R133W no ha sido encontrada en población francesa (Dupont y cols 1999), ni japonesa (Shimajiri y cols 2001, Kanatsuka y cols 2002), pero fue reportado el caso de un paciente Finlandés con diabetes mellitus tipo 1 que tenía esta variante (Hermann y cols 2005).

La variante R133W puede ser un factor predisponente a la diabetes de inicio temprano debido a que: 1) Pax4 es un gen que participa en el desarrollo y funcionamiento de las células beta-pancreáticas, 2) el cambio de un aminoácido con un grupo cargado positivamente (arginina) por uno con anillo aromático (triptofano) cambia la estructura de la proteína y por tanto altera su función, y 3) los estudios funcionales muestran que la variante R133W provoca una disminución en la función normal del gen, además en este trabajo se demuestra que la variante R133W no es exclusiva de población africana.

La segunda variante encontrada en el gen Pax4 fue la P321H, presente tanto en forma homocigota como heterocigota con alta frecuencia en los dos grupos estudiados, los resultados son similares a los encontrados en población japonesa (Shimajiri y cols 2001), francesa (Dupont y cols 1999), africana (Mauvis y cols 2004), finlandesa y húngara (Hermann y cols 2005). Pese a que no se han realizado las pruebas funcionales para conocer si se genera alteración en la unión al DNA, variación en la asociación con otros factores transcripcionales, o si hay una disminución en la función de la proteína producida, su frecuencia similar en los dos grupos estudiados sugiere que se trata de un polimorfismo.

En resumen, este trabajo muestra que la población mexicana posee la mayor frecuencia reportada en el mundo de la variante T130I en el gen HNF-4 α , el análisis estadístico asocia a la variante T130I con riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 de inicio

temprano. Debido a su alta frecuencia en pacientes con diabetes, la T130I podría usarse como un indicador de susceptibilidad a padecer la enfermedad aunado al estudio de otras variantes genéticas de susceptibilidad en la población mexicana.

Respecto al gen Pax4, este trabajo muestra que la variante R133W forma parte del fondo genético mexicano, por lo que no es propia de población originaria de África, además debido a que la variante R133W genera una disminución en la función represora del gen puede participar en el desarrollo de la diabetes.

La variante P321H encontrada con alta frecuencia, indica que su contribución al desarrollo de la diabetes puede ser menor y, que dependerá de la suma de otras variantes existentes en el mismo u otros genes que junto a factores ambientales y estilo de vida generen el desarrollo de diabetes en estos sujetos.

Finalmente, podemos decir que la existencia de mutaciones con pérdida de la función de un alelo en presencia de un alelo silvestre, permitirá el desarrollo de enfermedades, así los factores de transcripción con alelos mutados pueden actuar como predisponentes y, aunque se ha establecido una jerarquía de factores transcripcionales implicados en la diferenciación, proliferación y función de las células beta pancreáticas, los factores extracelulares y las señales intracelulares en que se basan estos procesos son aún desconocidas.

Asimismo, debido a que del 10-20% de la diabetes de inicio temprano es generada por mutaciones en genes aun no conocidos (Velho y cols 2004) se espera que su descubrimiento provea nueva información sobre el desarrollo y función de la célula beta-pancreática así como de la heterogeneidad genética y clínica de la diabetes. Dada la importancia de esta enfermedad, el impacto social que tiene y la demostración de la participación de genes que contribuyen al desarrollo de la diabetes, es importante establecer las bases moleculares de este padecimiento para el diseño de pruebas pronósticas y por tanto de un buen manejo terapéutico.

CONCLUSIONES

1. La población mexicana presenta la variante T130I en el gen HNF-4 α con la frecuencia más alta reportada en todo el mundo.
2. La variante T130I del gen HNF-4 α esta asociada al riesgo de desarrollar diabetes mellitus de inicio temprano en sujetos mexicanos.
3. El estudio molecular del gen Pax4 reveló la presencia de la variante R133W en una familia de la población estudiada. Debido a que esta variante genera una disminución en la actividad biológica de la proteína de Pax4, es probable que participe en el desarrollo de la diabetes tipo 2 en este paciente.
4. La variante P321H en el gen Pax4 se encontró con alta frecuencia en la población estudiada, por lo que de participar en el desarrollo de la diabetes su contribución dependerá de la presencia de otras variantes y/o polimorfismos que aunados a los factores ambientes propicien el inicio de la enfermedad.

11

ANEXOS

ANEXO 1

Carta de consentimiento informado



HOSPITAL JUÁREZ DE MEXICO

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN, LAB. DE ENDOCRINOLOGÍA MOLECULAR

CARTA CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN LA INVESTIGACIÓN:

EVALUACIÓN MOLECULAR DE PACIENTES CON DIABETES MELLITUS NO INSULINO DEPENDIENTE.

México D.F. _____

A quien corresponda:

Yo, el/la abajo suscrito/a _____ de _____ años de edad, en forma libre y voluntaria acepto participar en el estudio **“Evaluación Molecular de pacientes ,con Diabetes Mellitus No Insulino Dependiente”** que se llevara a cabo en el el Hospital Juárez de México y la Facultad de Química de la UNAM, cuyo objetivo es identificar los genes responsables de la Diabetes Mellitus No Insulino Dependiente tipo MODY en familias mexicanas.

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 del Paciente _____ Expediente _____

Nombre y firma del Testigo _____

Dirección _____

Nombre y firma del Testigo _____

Dirección _____

Firma del Investigador _____

ANEXO 2

Cuestionario aplicado a los paciente



Evaluación Molecular de Pacientes con Diabetes Mellitus No Insulino Dependientes

Cuestionario

Fecha _____

PACIENTE PROPÓSITO:

Nombre: _____ N°Expediente: _____

Edad: _____ años. Sexo: _____ Ocupación: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____ Origen étnico: _____

Evolución del Padecimiento:

Edad al diagnóstico _____

Forma en que inició el padecimiento _____

Poliuria _____ Polidipsia _____ Polifagia _____ Infecciones _____

Peso actual: _____ kg Talla _____ m IMC _____

Cintura _____ cm Cadera _____ cm ICC: _____

Datos de laboratorio:

Glucosa (ayuno) _____ mg/dl Triglicéridos: _____ mg/dl Colesterol _____ mg/dl.

Complicaciones:

Pérdida de peso: _____ Obesidad _____ Presión arterial _____

Dislipidemias _____ Renales _____ visuales _____

oído _____ hipersensibilidad _____ dentales _____ Otros: _____

Observaciones:

Ingiera alcohol frecuentemente: _____ toma refresco _____

marca _____ fuma _____ Cirugías _____

Tratamiento:

Dieta: _____ Ejercicio: _____ Insulina: _____

Hipoglicemiantes: _____ Notas: _____

ANTECEDENTES HEREDOFAMILIARES

Abuelos: Maternos (F) (M)

Abuelos Paternos (F) (M)

Padres: Padre _____ Madre _____ Hermanos _____

Cúantos hermanos presentan DM _____ Mujeres _____ Hombres _____

Hijos _____ Cuantos presentan DM _____ Otros: Tíos _____ Primos _____

Sobrinos _____

Observaciones: _____

BIBLIOGRAFIA

- Aguilar-Salinas C, Reyes-Rodríguez E, Ordóñez-Sánchez, Arellano M, Ramírez-Jiménez S, Domínguez-López A, Martínez-Francois J, Velasco-Pérez M, Alpizar M, García-García E, Gómez-Pérez F, Rull J, Tusié-Luna MT. 2000. **Early onset type 2 Diabetes: Metabolic and Genetic characterization in the Mexican population.** JCE & M. 86: 220 - 226.
- Aguilar-Salinas C, Velázquez O, Gómez-Pérez F, González A, Lara A, Molina V, Rull-Rodrigo J, Tapia R. 2003. **Characteristics of patients with type 2 diabetes in México.** Diabetes Care 26(7): 2021 - 2026.
- Alberti K, Zimmet P. WHO Consultation Group. 1998. **Definition, Diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications.** Diabetic Med. 15: 539 - 553.
- Alberts, Bray, Lewis, Ruff, Roberts, Watson. 1994. **Biología Molecular de la célula.** 3ª Edición, Editorial Omega.
- Bagwell A, Bailly A, Mychaleckiy J, Freedman B, Bowden D. 2004. **Comparative genomic analysis of the HNF-4 α transcription factor gene.** Molecular genetics and Metabolism 81: 112 - 121.
- Barrio R, Bellanné-Chantelot C, Moreno C, Morel V, Calle H, Alonso M y Mustieles C. 2002. **Nine Novel mutations in maturity onset diabetes of the young (MODY) candidate genes in 22 spanish families.** J Clin Endocrinol Metab 87(6): 2532 - 2539.
- Beato M, Eisfeld K. 1997. **Transcription factor access to chromatin.** Nucleic acids Res.25: 3559 - 3563.

- Bergman R, Prager R, Volund A, Olefsky J. 1987. **Equivalence of insulin sensitivity index in man derived by minimal model method and euglycemic glucose clamp.** J Clin Invest 79: 790-800.
- Berry C. 2002. **Development and pathology: The Pax gene.** J. Pathol. 197: 279 - 280.
- Brink C, Chowdhury K, Gruss P. 2001. **Pax4 regulatory elements mediate beta cell specific expression in the pancreas.** Mech Dev. 100: 37 - 43.
- Bowden D, Howard T, Qadri A, Spray B, Rothschild C, Akots G, Rich S, Freedman B. 1997. **Linkage of genetic markers on human chromosomes 20 and 12 to NIDDM in Caucasian sib pairs with a history of diabetic nephropathy.** Diabetes. 46: 882 – 886.
- Brownlee M. 2001. **Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications.** Nature 414: 813 - 820.
- Brun T, Franklin I, St-Onge L, Biason-Lauber A, Schoenle E, Wollheim C, Gauthier B. 2004. **The diabetes-linked transcription factor PAX4 promotes β -cell proliferation and survival in rat and human islets.** JCB. 167(6): 1123 - 1135.
- Buffone G, Darlington G. 1985. **Isolation of DNA from biological specimens without extraction with phenol.** Clinical Chemistry. 31(1):164 - 165.
- Bulman M, Dronsfield M, Fraylin T, Appleton M, Ellard S, Hattersley A. 1997. **A missense mutation in the hepatocyte nuclear factor 4 alpha gene in a UK pedigree with maturity-onset diabetes of the young.** Diabetologia. 40: 859 – 862.
- Carpenter M, Coustan D. 1982. **Criteria for screening tests for gestacional diabetes.** Am J Obstet Gybecol 144: 768 – 773.
- Cereghini S. 1996. **Liver - enriched transcription factor and hepatocyte differentiation.** FASEB Journal 10: 267 - 282.
- Chen W, Weinstein D, Duncan S, Plump A, Prezioso V, Bachvarova R, Darnell J. 1994. **Disruption of the HNF-4 α gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos.** Genes Dev. 8: 2466 - 2477.
- Consenso Nacional de Obesidad.** 1997. Fundación Mexicana para la Salud.
- Costa A, Bescós M, Velho G, Chevre j, Vidal j, Sesmilo G, Bellanné-Chantelot C, Froguel P, Casamitjana R,, Rivera-Fillat F, Gomis R, Conget I. 2000. **Genetic and clinical characterization of maturity-onset diabetes of the young in Spanish families.** European Journal of Endocrinology. 142: 380 - 386.

- De Anda-Turati M, Granados J, Quiroz H. 2000. **Marcadores genéticos en retinopatía diabética proliferativa en mexicanos portadores de diabetes mellitus no insulino dependiente.** An Med Asoc Med Hosp. ABC 45(2): 61 – 64.
- Dhe-Paganon S, Dufa K, Iwamoto M, Chi Y, Shoelson S. 2002. **Crystal structure of the HNF-4 α ligand binding domain in complex with endogenous fatty acid ligand.** J Biol Chem 277: 37973 – 37976.
- Dohrmann C, Gruss P, Lemaire I. 2000. **Pax genes and the differentiation of hormone producing endocrine cells in the pancreas.** Mech Dev. 92: 47 - 54.
- Dupont S, Vionnet N, Chevre J, Gallina S, Dina C, Seino Y, Yamada Y, Froguel P. 1999. **No evidence of linkage or diabetes-associated mutations in the transcription factors BETA2/NEUROD1 and PAX4 in type II diabetes in France.** Diabetologia, 42: 480 - 484.
- Dynan W. 1989. **Modulatory in promoters and enhancers.** Cell . 58:1 - 4.
- Ek J, Shack C, Packert D, Glümer C, Borch K, Jorgensen T, Pedersen O, Hansen T. 2005. **The functional Thr120Ile and Val255Met polymorphism of the hepatocyte nuclear factor-4 α (HNF-4 α) gene associate with type 2 diabetes and altered β -cell function among Danes.** J Clin Endocrinol Metab. 90(5): 3054 – 3069.
- Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 2003. **Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.** Diabetes Care 26 (supl 1): S5 - S20.
- Fajans S, Bell G, Bowden D, Halter J, Polansky K. 1994. **Minireview: Maturity onset diabetes of the young.** Life Sci 55: 413 - 422.
- Ferranini E. 1995. **Physiological and metabolic consequences of obesity.** Metabolism. 44:15 - 17.
- Frayling T, Evans J, Bulma M, Pearson E, Allen L, Owen K, Bingham C, Hanneman M, Shepard M, Ellard S, Hattersley A. 2001. **Beta-cell genes and diabetes: molecular and clinical characterization of mutations in transcription factors.** Diabetes 50: S94 - S100.
- Froguel P, Velho G. 1999. **Molecular genetics of maturity-onset diabetes of the young.** Trends Endocrinol Metab. 10: 142 - 146.
- Ghosh S, Watanabe R, Hauser E. **Type II diabetes: evidence for linkage on chromosome 20 in 716 Finnish affected sib pairs.** 1999. Proc Natl Acad Sci USA 96: 2198 - 2203.

- Glavac D, Dean M. 1995. **Comparison of the Sentitivity of single-strand conformational polymorphism and heteroduplex methods.** *Methodos in Neurosciences.* 26: 194 - 209.
- González M, León P. 2002. **Perspectivas en el tratamiento de la diabetes mellitus,** *Rev Med Hosp. Gen Mex.* 65 (3): 173 - 177.
- Gragnoli C, Menzinger G, Habener J. 2004. **Triple genetic variation in the HNF-4 α gene is associated with early-onset type 2 diabetes mellitus in a philippino family.** *Metabolism* 53 (8): 959 – 963.
- Groop L. 2000. **Genetic and metabolic heterogeneity of diabetes.** *International Diabetes Monitor.* 12(4):1 - 6.
- Guzmán J, Madrigal B. 2003. **Revisión de las características clínicas, metabólicas y genéticas de la diabetes mellitus.** *Bioquímica.* 28 (2):14 - 23.
- Haber J, Soffers D. 1998. **A newly discovered role of transcription factors involved in pcreas development and the pathogenesis of diabetes mellitus.** *Pross Asocc physicians* 110(19):12 - 21.
- Hadzopouou M, Kistanova E, Evagelopoulou C, Zeng S, Cladaras C, Ladias J. 1997. **Functional domains of the nuclear receptor Hepatocyte Nuclear Factor 4.** *J Biol Chem.* 272: 539 - 550.
- Hermann R, Mantere J, Lipponen K, Veijola R, Soltesz G, Otonkoski T, Simell O, Knip M, Ilonon J. 2005. **Lack of association of PAX4 gene with type 1 diabetes in the finnish and Hungarian populations.** *Diabetes* 54: 2816 -2819.
- Herman W, Fajans S, Smith M, Polonsky K, Bell G, Halter J. 1997. **Disminished insulin an glucagons secretory responses to arginina in nondiabetic subject with a mutation in the hepatocyte nuclear factor- 4 α / MODY1 gene.** *Diabetes* 46: 1749 - 1754.
- Hernández-Ronquillo L, Téllez J, Garduño E, González E. 2003. **Factors associated with therapy noncompliance in type 2 diabetes patients.** *Sal Public Mex.* 45: 191 – 197.
- Hsiang-Po H, Ming-Jer T. 2000. **Transcription Factors involved in Pancreatic Islet Development.** *J Biomed Sci.* 7: 27 - 34.
- Iyemere V, Davies N, Brownlee G. 1998. **The activation function 2 domain of hepatic nuclear factor 4 is regulated by a short C-terminal praline rich repressor domain.** *Nucleic Acids Res* 26: 2098 - 2104.
- Kupla T, Malecki M, Pezsolesi M. 2000. **Further evidence for a susceptibility locus for type 2 diabetes on chromosome 20q13.1-13.2** *Diabetes* 49 : 2212 - 2216.

- Ji L, Malecki M, Warram J, Yang Y, Rich S, Krolewski A. 1997. **New susceptibility locus for NIDDM is localized to chromosome 20q.** Diabetes 46: 876 - 881.
- Jiang G, Nepomuceno L, Yang Q, Sladek F. 1997. **Serine / Threonine phosphorylation of orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4.** Arch Biochem Biophys. 340: 1 - 9.
- Kanatsuka A, Tokuyama Y, Nozaki O, Matsui K, Egashira T. 2002. **β -cell dysfunction in late-onset diabetes subjects homozygous mutation in transcription factors NeuroD1 and Pax4.** Metabolism 51 (9): 1161 – 1165.
- Ladias J, Hadzopoulou-Cladaras M, Kardassi D. 1992. **Transcriptional regulation of human apolipoprotein genes ApoB, ApoCIII and ApoyA by members of the steroid hormone receptor superfamily HNF-4, ARP-1, EAR-2 and EAR-3.** J.Biol. Chem. 267:15849 – 15860.
- Lee Y, Sauer B, González F. 1998. **Laron dwarfism and non-insulin-dependent diabetes mellitus in the HNF-1 α knockout mouse.** Molecular and Cellular Biology 18: 3059 - 3068.
- Lemaigre F, Rousseau G. 1994. **Transcriptional control of genes that regulate glycolysis and gluconeogenesis in adult liver.** Biochem J 303: 1 - 14.
- Letho M, Bitzen P, Isomaa B, Wipemo C, Wessman Y, Forsblom C, Toumi T, Taskinen M, Groop L. 1999. **Mutation in the HNF-4 α gene affects insulin secretion and trygliceride metabolism.** Diabetes. 48: 423 – 425.
- Lindner T, Gagnoli, FurutaH, Cockburn B, Petzold C, Rictzsch H. 1997. **Hepatic function in a family with a nonsense mutation (R154X) in the hepatocyte nuclear factor-4 α /MODY1 gene.** J. Clin Invest.100: 1400 - 1405.
- Luque J, Herráez A. 2001. **Biología Molecular e Ingeniería genética.** Harcourt.
- Malecki M. 2005. **Genetics of type 2 diabetes mellitus.** Diabetes Research and Clinical Practice 68S1: S10 - S21.
- Malecki M, Yang Y, Antonellis A, Curtis S, Warram J, Krolewski A. 1998a. **Identification of new mutations in the hepatocyte nuclear factor 4 α gene among families with early onset type 2 diabetes mellitus.** Diabetic Medicine 16: 193 - 200.
- Malecki M, Antonellis A, Casey P, Linong J, Wantman M, Warram J, Krolewski A. 1998b **Exclusion of the hepatocyte nuclear factor 4 α as a candidate gene for late-onset NIDDM linked with chromosome 20q.** Diabetes. 47: 970 - 972.
- Maniatis T, Goodbourn S, Fischer J. 1987. **Regulation of inducible and tissue-specific gene expression.** Science. 236:1237-1245.

- Mansouri A, Hallonet M, Gruss P. 1996. **Pax genes and their role in cell differentiation and development.** *Curr Opin Cell Biol.* 8: 851 - 857.
- Mansouri A, St-Onge L, Gruss P. 1999. **Role of genes in endoderm-derived organs.** *Trends Endocrinol Metab* 10(4): 164 - 167.
- Martin B, Warram J, Krolewski A. 1992. **Role of glucose and insulin-resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study.** *Lancet.* 340: 925 - 929.
- Mauvis J, Smith S, Le May C, Leal S, Gautier J, Molokhia M, Riveline J, Rajan A, Kevorkian J, Zhang S, Vexiau P, German M, Vaisee C. 2004. **Pax 4 gene variations predispose to ketosis-prone diabetes.** *Hum Mol Gen* 13(24): 3151 - 3159.
- Méndez D. 2003. **Productos finales de glucosilación avanzada y complicaciones crónicas de la diabetes mellitus.** *Gac Med Méx* 139(1): 49 - 55.
- Mitchell J, Tjian R. 1989. **Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins.** *Science.* 245: 371 - 378.
- Miura N, Tanaka T. 1993. **Analysis of the hepatocyte nuclear factor HNF-1 α gene promotor: synergistic activation by HNF-4 α and HNF-1 α proteins.** *Nucleic Acids Res* 21: 3731 - 3736.
- Moller A, Urhammer S, Dalgaard L, Reneland R, Berglund L, Hansen T, Clausen J, Lithell H, Pedersen O. 1997. **Studies of the genetic variability of the coding region of the hepatocyte nuclear factor-4 α in Caucasians with maturity onset NIDDM.** *Diabetología,* 40 (8): 980 - 983.
- Moreno L. 2001. **Epidemiología y diabetes.** *Rev Fac Med UNAM.* 44(1): 35 - 37.
- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. 1989. **Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms.** *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 86: 2766 - 2770.
- Owen K, Hattersley A. 1998. **Maturity-onset diabetes of the young: clinical heterogeneity explained by genetic heterogeneity.** *Diabet. Med.* 15:15 - 24.
- Owen K, Hattersley A. 2001. **Maturity-onset diabetes of the young: from clinical description to molecular genetic characterization.** *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 15: 309 – 323.
- Pabo C, Sauer R. 1992. **Transcriptions factors: structural factors and principles of DNA recognition.** *Annu. Rev. Biochem.* 61:1053 - 1095.
- Permutt M, Wasson J, Suarez B. 2001. **A genome scan for type II diabetes susceptibility loci an a genetically isolated population.** *Diabetes* 50: 681 - 685.

- Pillay T, Langlois W, Olfesky J. 1995. **The genetics of non-insulin diabetes mellitus.** Adv. Genet 32: 51 - 97.
- Pruhova S, Ek J, Lenl J, Sumnik Z, Saudek F, Andel M, Pedersen O, Hansen T. 2003. **Genetic epidemiology of MODY in the Czech republic: new mutations in the MODY genes HNF-4 α , GCK and HNF-1 α .** Diabetologia 46: 291 - 295.
- Ptashne M. 1988. **How eukaryotic transcriptional activators work.** Nature 335: 683 - 689.
- Ptashne M, Gann A. 1997. **Transcriptional activation by recruitment.** Nature. 386: 569 - 577.
- Ríos O, Legorreta S. 2005. **Distribución de grasa corporal en diabético tipo 2.** Rev Med IMSS, 43(3): 199 - 204.
- Rodríguez M J, López C J, Rodríguez P J, Jiménez M J. 2003. **Características epidemiológicas de pacientes con diabetes en el de Estado de México.** Rev Med IMSS 41(5): 383 - 392.
- Sánchez-Reyes L, Fanghänel G, Márquez-Cid M, Salazar R, Labastida-Sánchez C, Solís-Pérez A, Tusié T. 2001. **Actualización en los diferentes subtipos de diabetes tipo "MODY".** Revista de Endocrinología y Nutrición. 9 (1): 5 - 11.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson A. 1977. **DNA sequencing with changes determining inhibitors.** Proceedings of the National Academy of Sciences 74: 5463 - 6467.
- Secretaría de Salud. 2000. **Proyecto de modificación a la norma oficial mexicana NOM 015 SSA2 1994 para la prevención, tratamiento y control de la diabetes.** Rev Med IMSS 38(6): 477 - 495.
- Shih D, Dansky H, Fleisher M, Assmann G, Fajans S, Stoffel M. 2000. **Genotype/Phenotype relationships in HNF-4 α /MODY1. Haploinsufficiency is associated with reduced apolipoprotein (AII), apolipoprotein (CIII), lipoprotein (a) and triglyceride levels.** Diabetes 49: 832 -837.
- Shimajiri Y, Sanke T, Furuta H, Hanabusa T, Nakagawa T, Fujitani Y, Kajimoto Y, Takasu N, Nanjo K. 2001. **A missense mutation of Pax4 Gene (R121W) is associated with type 2 diabetes in Japanese.** Diabetes 50: 2864 - 2868.
- Slack J. 1995. **Development biology of the pancreas.** Development 121: 1569 - 1580.
- Sladek F, Zhong W, Lai E, Darnell J. 1990. **Liver-enriched transcription factor HNF-4 α is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily.** Genes Dev. 4: 2353 - 2365.

- Smith S, Connors J, German M. 1999. **Paired homeodomain transcription factor PAX4 acts as a transcriptional repressor in early pancreatic development.** Mol. Cell. Biol. 19: 8272 - 8280.
- Smith S, Watada H, Scheel D, Mrejen C, German M. 2000. **Autoregulation and Maturity Onset Diabetes of the Young Transcription Factors Control the Human PAX4 Promoter.** The Journal of Biological Chemistry, 275(47): 36910 - 36919.
- Sosa-Pineda B. 2004. **The Pax4 gene is an essential regulator of β -cell development.** Mol Cells. 18 (3): 289 – 294.
- Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Torres M, Oliver G, Gruss P. 1997. **The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas.** Nature. 386: 399 - 402.
- Stoffel M, Duncan S. 1997. **The maturity-onset diabetes of the young (MODY 1) transcription factor HNF-4 α regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism.** Proc Natl Acad Sci USA. 94: 13209 - 13214
- St-Onge L, Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Mansouri A, Gruss P. 1997. **Pax6 is required for differentiation of glucagons-producing α -cells in mouse pancreas.** Nature. 387: 406 - 409.
- Thomas H, Jaschkowitz K, Bulman M, Fraylin T, Mitchell S, Roossen S, Lingott A, Tack C, Ellard S, Ryffel G, Hattersley A. 2001. **A distant upstream promoter of the HNF-4 α connects the transcription factors involved in maturity-onset diabetes of the young.** Hum Mol Genet 10: 2089 - 2097.
- UKPDS Group 33. 1998. **Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes.** Lancet. 352: 837 - 852.
- Vázquez J, Gómez H, Fernández S. 2006. **Diabetes mellitus en población adulta del IMSS. Resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2000.** Rev Med Inst Mex Seguro Soc 44 (1): 13 - 26.
- Velho G, Beilanné C, Timsit J. 2004. **Heterogeneidad de MODY y conducta clínica ¿diferentes genes como guía de distintos enfoques?** Endocrinol Nutr. 51 (supl 2): 22 – 30.
- Velho G, Froguel P. 1998. **Genetic metabolic and clinical characteristics of maturity onset diabetes of the young.** Eur. J. Endocrinol. 138: 233 - 239.

- Wang J, Elghazi L, Parker S, Kizilocak H, Asano M, Sussel L, Sosa-Pineda B. 2004. **The concerted activities of Pax4 and Nkx2.2 are essential to initiate pancreatic beta-cell differentiation.** Dev. Biol. 266: 178 - 189.
- Winter W. 2000. **Molecular and biochemical analysis of the MODY syndromes.** Pediatric Diabetes 1: 88 – 117.
- Yamagata K. 2003. **Regulation of pancreatic β -cell function by the HNF transcription Network: Lessons from Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY).** Endocrine Journal 50(5): 491 - 499.
- Yamagata K, Furuta H, Oda N, Kaisaki P, Menzel S, Cox N, Fajans S, Signorini S, Stoffel M, Bell G. 1996. **Mutations in the hepatocyte nuclear factor 4 alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY 1).** Nature 384: 458 - 460.
- Yamaoka T, Itakura M. 1999. **Development of pancreatic islet (review).** Int J Mol Med (39): 247 - 261.
- Yki-Järvinen H. 1994. **Patogénesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus.** Lancet 343: 91 - 95.
- Yu J, Hong Q, Chan V, Wat N, Tam S, Cheung S, Fai K, Chung S, Wo M, Ming L, Wah K, Lam K. 2005. **Genetic and clinical characteristics of maturity-onset diabetes of the young in Chinese patients.** European Journal of Human Genetics. 13: 422 - 427.
- Zhang Y, Warren-Perry PJ, Saker A. 1995. **Candidate gene studies in pedigrees with maturity-onset diabetes of the young not linked with glucokinase.** Diabetología. 38: 1055 - 1060.
- Zhu Q, Yamagata K, Miura A, Shihara N, Horikawa Y, Takeda J, Miyagawa J y Matsuzawa Y. 2003. **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 46: 567 - 573.