

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA “IGNACIO  
CHÁVEZ”

*“Polimorfismos de la enzima convertidora de angiotensina  
(ECA) en población mexicana con Diabetes Mellitus No  
Insulino Dependiente”*

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN:

**NEFROLOGÍA**

PRESENTA:

*Dr. Francisco Rodríguez Illana*

TUTORES:

*Dr. Francisco Eugenio Rodríguez Castellanos*

*Dr. Gilberto Vargas Alarcón*

MÉXICO D.F. AGOSTO DE 2008.



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.

---

Dra. Martha Franco Guevara  
Jefe Departamento de Nefrología  
Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

---

Dr. Fernando Guadalajara Boo  
Director de Enseñanza e Investigación  
Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

---

Dr. Francisco Rodríguez Castellanos  
Tutor de Tesis  
Medico Adjuntos al Servicio de Nefrología  
Instituto Nacional Cardiología “Ignacio Chávez”

---

Dr. Gilberto Vargas Alarcón  
Tutor de Tesis  
Departamento de Biología Molecular  
Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

---

Dr. Francisco Rodríguez Illana  
Alumno de la Especialidad en Nefrología  
Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

## **\*DEDICATORIAS**

### **Viviana**

La poesía del hombre que no hace versos, la idea del hombre que no piensa y la novela del hombre que no escribe.

### **Mamá**

La más bella palabra en los labios de un hombre es la palabra madre, y la llamada más dulce: Madre mía.

### **Papá**

Si Dios te ha regalado un hijo... no solo serás su padre y su amigo, sino también serás su ejemplo.

### **Abuelo**

...Siempre a mi abuelo

## **\*AGRADECIMIENTOS**

### **Dr. Francisco Eugenio Rodríguez Castellanos**

El deseo de enseñar, y enseñar de corazón, crea en lo alumnos un agradecimiento, que constituye terreno idóneo para el apostolado.

### **Dr. Gilberto Vargas Alarcón**

Gracias a su invaluable apoyo fue posible la realización de esta Tesis, el interés mostrado fue fundamental. Y quiero recalcar que sin el apoyo económico simplemente no hubiéramos podido realizar el estudio. Espero poder continuar estas líneas de investigación así como generar nuevas.

### **Edgar y Héctor**

Gracias por la disposición, tiempo y esfuerzo.

### **Al Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez”**

Educar no es dar carrera para vivir, sino templar el alma para las dificultades de la vida.

## \*INDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>7</b>
<hr/> <hr/>	
<b>INTRODUCCION</b>	<b>10</b>
<hr/>	
<b>MANIFESTACIONES CLÍNICAS E HISTORIA NATURAL</b>	<b>11</b>
Estadio 1(microalbuminuria). Nefropatía incipiente	12
Estadio 2. Nefropatía establecida	12
Estadio 3. Enfermedad Renal Avanzada	13
<hr/>	
<b>PATOGENESIS DE LA NEFROPATIA DIABETICA</b>	<b>13</b>
Patogénesis de la Nefropatía Diabética: Papel de la glucosa	14
Patogénesis de la Nefropatía Diabética: Productos Finales de Glicosilación Avanzada (AGEs)	15
Patogénesis de la Nefropatía Diabética: Estrés Oxidativo y glicooxidativo	16
Patogénesis de la Nefropatía Diabética: Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA)	17
Patogénesis de la Nefropatía Diabética: Aspectos Genéticos	18
<hr/>	
<b>JUSTIFICACION</b>	<b>24</b>
<hr/> <hr/>	
<b>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>24</b>
<hr/> <hr/>	
<b>HIPOTESIS</b>	<b>25</b>
<hr/> <hr/>	
<b>OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
<hr/> <hr/>	
<b>MATERIAL Y METODOS.</b>	<b>26</b>
<hr/>	
<b>TIPO DE ESTUDIO</b>	<b>26</b>
<hr/>	
<b>PACIENTES</b>	<b>26</b>
Criterios de inclusión	26

Crterios de exclusi3n	27
<hr/> <i>VARIABLES Y MEDICIONES</i>	28
Variables cl3nicas	28
Variables bioqu3micas	33
Variables gen3ticas	36
<i>ESTADÍSTICA</i>	<b>37</b>
<hr/> <i>CONSIDERACIONES ETICAS Y ECONOMICAS</i>	<b>38</b>
<hr/> <i>DIAGRAMA DE FLUJO</i>	<b>39</b>
<hr/> <i>PROCEDIMIENTOS</i>	<b>40</b>
<hr/> <i>RESULTADOS</i>	<b>41</b>
<hr/> <i>DISCUSIÓN</i>	<b>49</b>
<hr/> <i>CONCLUSION</i>	<b>54</b>
<hr/> <i>CONSENTIMIENTO INFORMADO</i>	<b>55</b>
<hr/> <i>APENDICES</i>	<b>59</b>
<hr/> <i>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</i>	<b>61</b>

# *Polimorfismos de la enzima convertidora de angiotensina en población mexicana con Diabetes Mellitus No Insulino Dependiente*

## **\*RESUMEN**

La DM afecta actualmente a 246 millones de personas alrededor del mundo. En México la prevalencia en 2005 fue de 10.7% entre personas de 20-69 años de edad lo cual corresponde a 6.5-10 millones de personas (9° lugar en el mundo). Se estima que en nuestro país 14 de cada 100 diabéticos tienen nefropatía diabética (ND) y es la primera causa de insuficiencia renal crónica tanto en nuestro país como en el mundo.

Los costos anuales en USA son de 35 mil dólares por paciente en hemodiálisis.

Múltiples sistemas se encuentran involucrados en el desarrollo y progresión de la ND, sin embargo uno de los principales es el Sistema Renina-Angiotensina, no solo por los bien conocidos efectos hemodinámicos, sino por sus recientemente descubiertas propiedades a favor de hipertrofia, proliferación y diferenciación celular.

En general la literatura reporta que el 25% de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2) evolucionan a ND al cabo de 20 años de la enfermedad y de estos el 20% evolucionan a enfermedad renal avanzada, sin embargo existen poblaciones especialmente susceptibles al desarrollo de nefropatía diabética, por lo que factores ambientales así como genéticos están directamente involucrados.

*Objetivo:* Evaluar la posible asociación entre polimorfismos de la ECA y la evolución de la ND en población mexicana de pacientes con DM2.

*Hipótesis:* Si los polimorfismos de los genes que codifican para la enzima convertidora de angiotensina (ECA) se relacionan con un diferente grado de actividad de dichas moléculas,



entonces se esperaría un diferente patrón de evolución de la ND en relación con las variantes polimórficas investigadas.

*Material y Métodos:* Estudio transversal, de casos y controles, en el cual se incluyeron pacientes diabéticos tipo 2 y se dividieron en 2 grupos: un primer grupo (grupo 0) de pacientes con evolución esperada (>15 años de evolución sin nefropatía establecida) y un segundo grupo (grupo 1) que incluyó pacientes con progresión rápida de la enfermedad (pérdida de la filtración glomerular mayor a 5 ml/min/año). Se analizaron diferentes variables bioquímicas y clínicas así como el polimorfismo inserción/delección del gen que codifica para la ECA.

*Resultados:* No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en lo que respecta a las frecuencias alélicas de los alelos de inserción (I) o delección (D) ni en las frecuencias de los genotipos II, ID o DD al comparar el grupo total de pacientes diabéticos con controles sanos. Se encontró una mayor frecuencia (no significativa) de la presencia del alelo D en pacientes del grupo 0 en comparación con pacientes del grupo 1 y una mayor frecuencia (no significativa) del alelo I en este último grupo en comparación con los pacientes del grupo 0. La pérdida de función renal para cada una de las variantes polimórficas estudiadas fue de  $2.4 \pm 3.7$ ,  $2.8 \pm 2.9$  y  $2.44 \pm 4$  ml/min/año para los polimorfismos II, ID y DD respectivamente, lo cual correspondió a una pérdida porcentual de  $4.4 \pm 7.3\%$ ,  $7.2 \pm 8.6\%$  y  $5 \pm 6.9\%$  en el mismo orden según el polimorfismo con valor de  $p$  no significativo.

Al comparar los porcentajes de casos de cada polimorfismo entre los dos grupos de pacientes diabéticos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, correspondiendo para el polimorfismo II 21 casos (34.4%) en el grupo 0 vs 4 casos (6.6%) en el grupo 1, para el polimorfismo ID encontramos 17 casos (27.9%) en grupo 0 y 10 casos (16.4%) en el grupo 1 y finalmente, para el polimorfismo DD se detectaron 7 casos (11.5%) en el grupo 0 y 2 casos (3.3%) en el grupo 1. Asimismo se identificó un mayor IMC en la variante DD ( $29.2 \pm 3.38$  kg/m<sup>2</sup>) en comparación con el polimorfismo ID ( $25.81 \pm 2.6$  kg/m<sup>2</sup>) ( $p < 0.05$ ) y por otra parte, la presión arterial sistólica mostró una tendencia (no significativa) a ser mayor en el grupo

homocigoto para el alelo D ( $155 \pm 21.7$  mmHg) en comparación con las variantes ID ( $139 \pm 18$  mmHg) e II ( $150 \pm 17$  mmHg).

*Conclusión:* La presencia del alelo D se asoció a un perfil metabólico más adverso y a una tendencia a una mayor progresión del daño renal en pacientes diabéticos.

## \*INTRODUCCION

La diabetes mellitas (DM) afecta actualmente a 246 millones de personas alrededor del mundo (171 millones en el 2000<sup>1</sup>) y se espera que para el 2025 esta cifra incremente a 380 millones<sup>2</sup>. En 2007, los 3 países con más alta prevalencia fueron India (40.9 millones), China (39.8 millones), USA (19.2 millones) y en México la prevalencia en 2005 fue de 10.7% entre personas de 20-69 años de edad, lo cual corresponde a 6.5-10 millones de personas (9º lugar en el mundo). Es importante mencionar que la prevalencia en el mismo grupo de edad incrementa hasta un 15% en la frontera con USA<sup>3</sup>. La incidencia anual de diabetes a nivel mundial es de 7 millones y en México, en 2005 la incidencia fue de 400000.

La pandemia de DM tiene grandes repercusiones económicas a nivel mundial, la WHO ha estimado que el costo de la mortalidad por DM en China fue de aproximadamente 250 billones de dólares en el 2005, 225 billones de dólares en Rusia y 210 billones de dólares en la India en el mismo año<sup>2</sup>. En México, según el Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS), la principal causa de muerte en edad económicamente activa es DM, y tuvo un costo anual de 320 millones de dólares en el 2005, lo cual correspondió al 4.7% del gasto público de la SSA. Según datos del IMSS, en 2004 se destinaron 15000 pesos para la atención de cada derechohabiente con DM<sup>4</sup>.

Las alteraciones renales en pacientes con DM se reportaron por primera vez en el siglo 19, por médicos alemanes y franceses los cuales describieron hipertrofia renal y proteinuria en diabetes. En 1936 Kimmelstiel y Wilson describieron por primera vez las lesiones glomerulares y no fue sino hasta finales de los 60's cuando se comenzó a dar la verdadera importancia a la nefropatía diabética (ND) como causa de enfermedad renal crónica y de requerimientos de diálisis<sup>5</sup>.

En México se estima que 14 de cada 100 diabéticos tienen ND y es la primera causa de insuficiencia renal crónica tanto en nuestro país como en el mundo, en este último 35-40% de los casos nuevos de IRC son secundarios a nefropatía diabética. Los costos anuales en USA son de 35 mil dólares por paciente en hemodiálisis<sup>3</sup>. Dado lo anteriormente mencionado, no es difícil explicar que en los últimos años ha habido un incremento en la actividad científica, básica y clínica, de este problema y ha habido grandes avances en el entendimiento de la fisiopatología de la enfermedad y un área de especial desarrollo ha sido la investigación en ND.

## **MANIFESTACIONES CLÍNICAS E HISTORIA NATURAL**

La principal manifestación clínica que acompaña a los cambios ultraestructurales de los cuales hablaremos más adelante son: albuminuria, hipertensión arterial sistémica, disminución de la función renal llevando finalmente a la presencia de uremia y requerimiento de terapia sustitutiva de la función renal mediante las diferentes modalidades de diálisis o incluso trasplante renal.

Si bien en la historia natural de la disfunción renal en diabéticos tipo 2, no es común la división en estadios como es el caso de la nefropatía en diabéticos tipo 1, existen muchas similitudes y generalmente se reconocen 3 etapas. Inicialmente se consideraba la hiperfiltración glomerular únicamente en pacientes tipo 1 (estadios 1 y 2 de la clasificación de Mogensen), sin embargo en la actualidad se sabe que del 30-40% de los pacientes diabéticos tipo 2 de reciente diagnóstico se encuentran hiperfiltrando, lo cual se debe a un incremento en la presión intraglomerular y suele haber mejoría y normalización de la filtración glomerular una vez establecido el tratamiento adecuado<sup>6</sup>.

### **Estadio 1(microalbuminuria). Nefropatía incipiente**

Excreción de albúmina de 30-300 mg/día, en ausencia de situaciones clínicas las cuales pueden cursar con incremento de la albuminuria como hipertermia, insuficiencia cardiaca congestiva, ejercicio exhaustivo, alta ingesta proteica o infecciones de vías urinarias. Generalmente se presenta 6-15 años posteriores al diagnóstico con una incidencia anual de 2% una vez realizado el diagnóstico. Hay discreto incremento en cifras de tensión arterial y desaparece la caída fisiológica nocturna de la presión arterial. Sin el tratamiento médico adecuado, la caída en la filtración glomerular es de 0.8-1.1 ml/min/año<sup>6,7</sup>.

### **Estadio 2. Nefropatía establecida**

Generalmente se presenta después de 15-20 años de la enfermedad (el 25% de los pacientes con DM2 llegan a este estadio luego de 20 años de la enfermedad), la regla es la presencia de proteinuria (albuminuria mayor a 300 mg/día o proteinuria mayor a 500 mg/día) y prácticamente todos los pacientes tienen hipertensión arterial (prevalencia de hipertensión del 80%). Cerca del 90% de los pacientes con nefropatía establecida tienen retinopatía diabética y la prevalencia de retinopatía diabética proliferativa es del 58%. La proteinuria incrementa entre 15-40% anual con caída en la filtración glomerular de 10-11 ml/min/año en ausencia de tratamiento médico adecuado<sup>6,7</sup>.

### **Estadio 3. Enfermedad Renal Avanzada**

Generalmente se establece 7-10 años después de mantener proteinuria persistente, sin embargo difiere enormemente dependiendo el fondo genético, siendo la mayor

incidencia en los indios Pima, seguido de hispanos y afro-americanos. En los primeros la incidencia acumulada 10 años posteriores al establecimiento de proteinuria es de 40% y a 15 años del 61%, contrastando con la incidencia en caucásicos en los cuales la incidencia a 10 años es del 11% y a 15 años tan solo del 17%

Del 25% de los diabéticos tipo 2 que llegan a ND, solo el 20% progresa a estadio 3<sup>6,7</sup>.

## **PATOGENESIS DE LA NEFROPATIA DIABETICA**

La ND se caracteriza por una serie de cambios ultraestructurales prácticamente en todo el riñón, los cuales incluyen engrosamiento de la membrana basal glomerular, hipertrofia glomerular y tubular, acumulación de matriz extracelular (ECM) y expansión mesangial, glomeruloesclerosis y fibrosis túbulo-intersticial. La expansión mesangial a nivel glomerular así como la fibrosis túbulo-intersticial ocasionan al paso del tiempo insuficiencia renal<sup>9</sup>. 10-20% de los pacientes con DM no insulino dependiente desarrollan ND y esta puede desarrollarse en algunos pacientes pese a un adecuado control glicémico y en otros puede no desarrollarse a pesar de descontrol metabólico de larga evolución.

Muchos años de estudio han mostrado que los mecanismos involucrados en el desarrollo de ND son variados, complejos y se interrelacionan unos con otros, sin embargo se considera que el pobre control metabólico así como la duración de la enfermedad son 2 de los principales factores involucrados. Se han realizado grandes esfuerzos para tratar de identificar las vías inducidas por la hiperglucemia a nivel renal, sin embargo, como se mencionó previamente, estos mecanismos son complejos e involucran no solo la hiperglucemia *per se*, sino también la generación de productos glicosilados y/o polioles, la activación de vías y sistemas como el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), la interacción entre los múltiples sistemas como el

SRAA, Redox, polioles, etc., así como la estimulación de diversos factores y proteínas entre ellos el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ )<sup>6</sup>.

### **Patogénesis de la Nefropatía Diabética: Papel de la glucosa**

La hiperglucemia como tal ha sido involucrada en el desarrollo de hiperfiltración mediante dilatación arteriolar aferente secundaria a liberación de factores como el factor de crecimiento parecido a insulina tipo 1, óxido nítrico, glucagón y prostaglandinas. La estimulación de factores como el factor de crecimiento parecido a la insulina 1 (IGF-1), el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de crecimiento epidérmico y el TGF- $\beta$ , están también implicados en la hipertrofia renal que se observa en los pacientes diabéticos<sup>10</sup>.

Concentraciones altas de glucosa extracelular estimulan la sobre expresión de los transportadores de glucosa GLUT1 a nivel de las células mesangiales, lo cual ocasiona incremento en la captura y metabolismo de glucosa en estas células condicionando un incremento en la producción de matriz extracelular mediante activación persistente de la vía de proteína quinasa C (PKC). Otro mecanismo mediante el cual se sobre expresan estos receptores es debido al “estiramiento” de las células mesangiales secundarias al incremento de la presión intraglomerular<sup>11</sup>.

En presencia de hiperglucemia crónica el 30% de la glucosa es canalizada hacia la vía de los polioles, la cual consta de 2 enzimas, la aldosa reductasa, la cual reduce glucosa en sorbitol en presencia de NADPH y la sorbitol deshidrogenasa, la cual convierte sorbitol en fructosa en presencia de NAD. La acumulación de sorbitol produce por un lado estrés osmótico y por otro el consumo del co-factor NADPH, el cual se requiere también para la regeneración del glutatión, disminuyendo la capacidad antioxidante celular, favoreciendo estrés oxidativo<sup>8</sup>.

## **Patogénesis de la Nefropatía Diabética: Productos Finales de Glicosilación Avanzada (AGEs)**

La hiperglicemia crónica puede ocasionar glicosilación no enzimática de aminoácidos, proteínas y lípidos. Estos AGEs se encuentran en el suero del paciente así como en tejidos renales. Ejemplos de ellos tenemos la pentosidina, carboximetilisina (CML) y piralinas, siendo la CML uno de los principales involucrados en las complicaciones micro y macrovasculares en la DM. El receptor de estos productos derivados de la glicosilación avanzada (RAGE) se encuentra en niveles mínimos en estado de homeostasis e incrementa de manera muy importante en estados de DM. A nivel renal, el principal sitio de expresión de estos receptores es el podocito. El RAGE traduce los efectos de diferentes ligandos, entre ellos y uno de los principales es el s100/calgranulina. Dicha interacción incrementa muchas respuestas inflamatorias no sólo en pacientes diabéticos sino en múltiples entidades patológicas que se caracterizan por inflamación crónica. Las interacciones entre ligando-RAGE activan a las células mesangiales, lo cual lleva a la formación de citoquinas y proteínas proinflamatorias y profibróticas. Otra de las células a nivel renal que cuentan con dichos receptores son las células endoteliales, lo cual puede contribuir de manera importante a las alteraciones vasculares a nivel glomerular<sup>12</sup>.

## **Patogénesis de la Nefropatía Diabética: Estrés Oxidativo y glicooxidativo**

Las reacciones de reducción/oxidación (Redox) han sido implicadas en vías de señalización celular que llevan a la producción y liberación de TGF- $\beta$  y en células mesangiales, en respuesta a hiperglucemia, angiotensina II y AGE hay incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos agonistas, a nivel de las células mesangiales activan el NF- $\kappa$ B, incrementan la proteína quimiotrayente de



monocitos y/o PAI-1 mediante mecanismos que involucran al sistema Redox, respuestas que pueden ser inhibidas por antioxidantes.

Múltiples vías se encuentran involucradas en el incremento del potencial Redox y glicooxidativo en la DM entre ellas están las siguientes: 1) incremento en el transporte de electrones a nivel mitocondrial inducido por hiperglicemia, 2) actividad alterada de eNOS produciendo radicales superóxido en lugar de óxido nítrico, 3) incremento de la autooxidación de la glucosa, 4) producción de AGE's y activación de sus receptores, 5) depresión de antioxidantes endógenos como vitaminas A,C y E, ácido lipoico, así como de enzimas antioxidantes.

Dentro de las consecuencias del incremento del superóxido a nivel renal, tenemos la inactivación del óxido nítrico y la producción incrementada de peroxinitrito. Además del potencial citotóxico del peroxinitrito, la reducción en la disponibilidad del óxido nítrico, origina cambios hemodinámicos intrarenales y puede además, influir en la generación de matriz extracelular por parte de las células mesangiales<sup>13</sup>.

### **Patogénesis de la Nefropatía Diabética: Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA)**

El concepto clásico de la angiotensina II como un agente vasoactivo el cual participa únicamente en la regulación hemodinámica local y sistémica es actualmente modificado, llegándola a considerar una verdadera citosina, la cual juega un papel muy importante en la ND.

La angiotensina II regula el crecimiento, proliferación e hipertrofia de las células renales mesangiales, incrementa la expresión de proteínas de la matriz mesangial tales como laminina, colágena y fibronectina y al mismo tiempo, mediante la sobrerregulación de proteasas inhibitoras, como los inhibidores tisulares de metaloproteinasas y PAI-1,

promueve una menor capacidad para degradar la matriz extracelular. A nivel túbulointersticial, angiotensina II tiene la capacidad de promover la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, los cuales penetran en los espacios peritubulares y pericapilares favoreciendo el desarrollo de fibrosis en estos sitios<sup>14</sup>.

Angiotensina II tiene la capacidad además, de activar células inflamatorias directamente mediante quimiotaxis y por producción de mediadores proinflamatorios.

Infiltrado mononuclear, ya sea a nivel glomerular o intersticial ocurre en prácticamente todas las enfermedades renales progresivas, como en la ND y tiene un papel relevante con respecto al pronóstico y evolución.

Angiotensina II, vía el receptor de angiotensina 1, activa diferentes factores de transcripción nuclear como la proteína activada-1, el NF- $\kappa$ B. Las principales vías de señalización activadas son la PKC, MAPK, PTK, las cuales son vías de señalización sensibles a Redox. El resultado final de la estimulación de estas vías de señalización y factores nucleares es la producción y activación del sistema del TGF- $\beta$ <sup>14</sup>.

Datos recientemente publicados sugieren a la aldosterona como un factor, independiente de angiotensina II, que impacta directamente en las enfermedades renales progresivas ya sea mediante los bien conocidos efectos hemodinámicos (hipertensión, retención de sodio) así como por tener propiedades profibróticas<sup>15</sup>. Diversos estudios experimentales como los de Rocha y colaboradores, han demostrado disminución de proteinuria en ratas “stroke-prone” espontáneamente hipertensas a las cuales se les administro espironolactona en comparación con placebo, de igual forma se encontraron menor número de lesiones nefroangioescleróticas y fibrosis intersticial en los estudios histopatológicos. El hecho de que estos cambios ocurrieran en ausencia de cambios relevantes en la presión arterial habla de otros mecanismos directamente involucrados además de los hemodinámicos. En la actualidad sabemos que aldosterona puede

estimular la expresión de TGF- $\beta$ , del factor de crecimiento derivado de tejido conectivo, del factor de crecimiento derivado de plaquetas y del inhibidor del activador del plasminógeno, efectos que han mostrado ser independientes de angiotensina II<sup>16, 17</sup>.

### **Patogénesis de la Nefropatía Diabética: Aspectos Genéticos**

A pesar de la dramática mejoría en el pronóstico de la ND en los últimos 25 años, la pérdida de la filtración glomerular en pacientes diabéticos es aun 4-5 veces mayor que en personas sanas, con un rango muy amplio que va de 0-24 ml/min/año. Como consecuencia de esto, habrá pacientes que requieran diálisis a pocos años de establecida la ND y otros que mueran con función renal preservada. Evidencia de influencia genética en la progresión de la ND fue observada por primera vez en 1989 por Seaquist, el cual estudió una pequeña familia en la cual 12 de 29 hijos de padres con trasplante renal debido a nefropatía diabética, eran portadores también de insuficiencia renal avanzada. Los avances en la última década (el mapeo completo del genoma humano y desarrollo de métodos avanzados de investigación) han resultado en un gran número de estudios genéticos en relación a DM y sus complicaciones, así como en estudios de las interacciones genéticas específicas con la respuesta a ciertos fármacos (farmacogenética)<sup>18</sup>.

Siendo el SRAA uno de los principales sistemas involucrados en la fisiopatología de la ND, se han estudiado polimorfismos de los diversos componentes del SRAA con resultados muy diversos dependiendo de las poblaciones estudiadas.

La enzima convertidora de angiotensina (ECA), perteneciente a la familia de las zinc metalopeptidasas, tiene un papel central en este sistema, convirtiendo la angiotensina I (decapeptido inactivo) en la angiotensina II (octapéptido activo), el cual, como ya se ha mencionado previamente, no sólo es un potente vasoconstrictor, sino que posee

propiedades profibróticas. La ECA tiene además un papel importante en el sistema de las kininas, las cuales tienen efectos contrarios a angiotensina II.

El gen que codifica para la ECA se encuentra en el brazo largo del cromosoma 17 (17q23), tiene una longitud de 21 kilo bases y comprende 26 exones y 25 intrones. Actualmente se encuentran registrados en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) más de 160 polimorfismos de este gen, de los cuales la gran mayoría son polimorfismos de un solo nucleótido y sólo 34 se encuentran en regiones codificadoras<sup>19</sup>.

El polimorfismo inserción/delección, se refiere a la presencia (inserción, I) o ausencia (delección, D) de una secuencia de 287 pares de bases de DNA en el intrón 16 del gen. Dicho polimorfismo fue descubierto en 1990 por Rigat y colaboradores, reportando además que la actividad de la ECA es al menos 2 veces mayor en las personas con el genotipo DD en comparación con la variante II<sup>20</sup>.

Dada la importancia de esta enzima, así como la relevancia de los hallazgos de Rigat, numerosos estudios han puntualizado el papel de los polimorfismos inserción / delección (I/D) en la ND. Cabe mencionar que este polimorfismo es tal vez uno de los más estudiados en diversas patologías no solamente en DM<sup>19</sup>.

La gran mayoría de los estudios se han realizado en pacientes con DM tipo 1 y en poblaciones asiáticas así como caucásicas, por lo que a continuación se mencionarán algunos resultados relevantes. Un meta-análisis efectuado de los estudios realizados de 1994 a 1997<sup>21</sup> reportó que en población caucásica no se observó diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la presencia del alelo D en pacientes con o sin nefropatía diabética. Cuatro de los 5 estudios analizados fallaron en reportar un incremento en el riesgo de desarrollar ND en pacientes con genotipo DD o II (OR 1.10, 95% IC: 0.83 a 1.45). De manera contraria, el análisis de estudios asiáticos encontró una

frecuencia del alelo D en pacientes con ND significativamente mayor en comparación a los que no desarrollaron ND y un incremento en el riesgo relativo de desarrollar ND en pacientes con alelo D comparación al genotipo II.

Otro meta-análisis más reciente<sup>22</sup>, fue realizado en estudios publicados entre 1994 y 2004, con un total de 14727 pacientes, el cual reportó un riesgo de desarrollar ND 22% menor en homocigotos para el alelo I comparado con portadores de alelo D (OR=0.78, 95% IC: 0.69-0.88), siendo más pronunciada la asociación en pacientes asiáticos con diabetes tipo 2 (OR=0.65, 95% IC: 0.51-0.83).

Inspirado en los estudios de los polimorfismos I/D de la ECA se han investigado otras variantes génicas de los demás componentes del SRAA. Una mutación en el gen del angiotensinógeno, lo cual lleva a la codificación del aminoácido treonina en lugar de metionina (angiotensinógeno-M235T) se ha asociado con niveles de angiotensinógeno incrementados así como con hipertensión arterial. El mecanismo propuesto es que el polimorfismo se encuentra en una región promotora del gen lo cual influye directamente en la tasa de transcripción. Sin embargo, la asociación de este polimorfismo con hipertensión arterial sistémica esencial ha sido posteriormente puesto en duda. Incluso un estudio demostró que los pacientes hipertensos con el alelo T tiene mejor respuesta al tratamiento con un inhibidor de la ECA.

Con respecto a la progresión de la nefropatía diabética, hasta la fecha no hay evidencia convincente del efecto de un solo gen sobre la pérdida de la función renal en la ND.

La mayoría de los efectos deletéreos de la angiotensina II son mediados a través del receptor de angiotensina II tipo 1 (receptor AT1), cuyo gen contiene 5 exones y 4 intrones, del cual se han encontrado 5 polimorfismos, de los cuales sólo la variante de sustitución de A por C en la región + 1166 ha sido significativamente más común en pacientes hipertensos. Hasta la fecha sólo un estudio demostró una relación entre el

polimorfismo C y la progresión de ND en un pequeño grupo de mujeres japonesas, sin embargo, aún se encuentra pendiente el poder demostrar una asociación entre el polimorfismo del receptor AT1 y su traducción clínica.

El polimorfismo C-344T de la sintasa de aldosterona ha sido estudiado de manera extensa en pacientes con hipertensión arterial sistémica, hipertrofia concéntrica del ventrículo izquierdo, falla cardiaca crónica y cardiopatía isquémica. La consecuencia de dicho polimorfismo es un incremento en la actividad de dicha enzima afectando de manera positiva (sobreregulación) la síntesis de aldosterona. Un meta-análisis de estudios realizados hasta febrero del 2006, analizó 42 publicaciones (poblaciones caucásicas, asiáticas, 1 estudio con población afroamericana y 1 con población latina) encontrando asociación significativa entre hipertensión arterial y el polimorfismo C-344T. También se demostró que el alelo -344C se asoció a un menor riesgo de desarrollar hipertensión arterial sistémica. Existen en la actualidad muy pocos estudios con respecto a este polimorfismo en pacientes diabéticos. Un trabajo publicado en el 2006 no encontró asociación entre dicho polimorfismo y el inicio y/o progresión de la enfermedad en diabéticos tipo 1, sin embargo, si se encontraron cifras más elevadas de presión arterial sistólica y diastólica en pacientes con el alelo T. Otro estudio investigó si el polimorfismo de la sintasa de aldosterona influye en la respuesta hipotensora, disminución en la albuminuria y en la preservación de la filtración glomerular durante el tratamiento con losartán en pacientes diabéticos hipertensos tipo 1, sin poder concluir que los diferentes genotipos del gen de la sintasa de aldosterona pudiesen influir en la respuesta al tratamiento con bloqueadores de receptores de angiotensina.

Es importante recalcar que los estudios de polimorfismos han sido realizados principalmente en poblaciones Caucásicas y Orientales y sólo unos pocos han sido llevados a cabo en poblaciones americanas, tanto mestizas como indígenas<sup>23, 24</sup>. La

población mexicana constituye un grupo étnico que ha sido estudiado desde el punto de vista genético utilizando una cantidad importante de marcadores ubicados en diversos cromosomas. Dichos estudios establecen que nuestra población esta constituida por 56% de genes indígenas, 40% de genes Caucásicos y 4% de genes negroides<sup>25</sup>. Debido a esta mezcla genética, los estudios reportados en otros grupos étnicos no son aplicables a la población mexicana, por lo que es de gran importancia el determinar las frecuencias alélicas y genotípicas en nuestra población y establecer su papel como marcador genético de susceptibilidad.

## \*JUSTIFICACION

La ND es la principal causa de insuficiencia renal crónica avanzada en nuestro país reportándose 14 casos de ND por cada 100 diabéticos con morbi-mortalidad muy importante. Diversos mecanismos se encuentran implicados en la patogénesis de la ND, siendo los más importantes el SRAA y los productos de la glicosilación avanzados. El hecho de que la prevalencia se encuentre incrementada en ciertas regiones así como en ciertas razas, tanto de nuestro país como en otras partes del mundo, subraya la importancia de factores ambientales así como genéticos en la patogenia de la enfermedad.

Recientemente se ha estudiado la asociación de polimorfismos de los genes que codifican para el sistema RAA con la evolución de la ND, encontrando resultados contradictorios, principalmente en países asiáticos y europeos. Definitivamente el fondo genético de nuestra población, dada nuestra naturaleza mestiza es diferente a las poblaciones previamente mencionadas, por lo que sería de gran utilidad conocer si en nuestra población existe un perfil genético, en lo que a polimorfismos del gen de la enzima convertidora de angiotensina se refiere, asociado con diferentes patrones de evolución de la ND.



## \*PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe asociación entre variantes polimórficas del gen que codifica para la ECA con los diferentes patrones de evolución del daño renal mediado por DM?

## \*HIPOTESIS

Si los polimorfismos del gen que codifica para la ECA se relacionan con un diferente grado de actividad de dicha enzima, entonces podría esperarse un diferente patrón de evolución de la ND en relación con las variantes polimórficas descritas.

## **\*OBJETIVOS**

Evaluar la posible asociación entre polimorfismos del gen que codifica para la ECA con la evolución de la ND y comparar la frecuencia de dichos polimorfismos en dos grupos de pacientes con DM con evolución esperada y con evolución de rápida progresión.

## **\*MATERIAL Y METODOS.**

### **TIPO DE ESTUDIO**

Según la clasificación de Kleinbaum desde el punto de vista de direccionalidad (secuencia de observación entre exposición y enfermedad) se trata de un estudio no direccional (transversal). Desde el punto de vista de temporalidad (relación cronológica entre el inicio del estudio y la ocurrencia de exposición o enfermedad) corresponde a un estudio de casos y controles.

### **PACIENTES**

#### **Criterios de inclusión**

Se incluirán pacientes con DM tipo 2 pertenecientes al servicio de nefrología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, que reúnan las siguientes condiciones:

1. Pacientes adultos (de cualquier edad y sexo).
2. Pacientes diabéticos tipo 2 sin importar el tipo de terapia a que estén sometidos (hipoglicemiantes orales y/o insulina).
3. Insuficiencia renal estadio I a IV atribuible a ND diagnosticada en base clínica y/o histopatológica.
4. Pacientes diabéticos de < 15 años de evolución con rápido deterioro de la función renal en el último año (rápido deterioro de la función renal se refiere a una caída en la filtración glomerular de 5-10 ml/min/año) y retinopatía diabética y/o pacientes

diabéticos de < 15 años de evolución con proteinuria en rangos nefróticos (con o sin síndrome nefrótico) y retinopatía diabética sin respuesta a tratamiento médico (definido como la asociación de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina [IECA's] y bloqueadores del receptor de angiotensina [BRA's] a dosis convencionales).

5. Para grupo control se incluirán pacientes con DM de más de 15 años de evolución sin tener ND establecida

### **Criterios de exclusión**

1. DM tipo 1.
2. IRC estadio V y/o con terapia de sustitución de la función renal.
3. Nefropatía no diabética diagnosticada por biopsia renal o en base clínica.
4. Deterioro agudo de la función renal de cualquier etiología.
5. Hipertensión Arterial Sistémica de etiología secundaria.
6. Pacientes trasplantados o donadores renales.
7. Pacientes con cáncer o uropatía obstructiva.

## VARIABLES Y MEDICIONES

### Variables clínicas

Se obtendrán del expediente clínico al momento de ingresar al estudio:

#### 1. Edad al momento de entrada al estudio (años).

*Variable potencialmente confusora, numérica continua, de razón.*

\*Definición conceptual: Tiempo de existencia desde el nacimiento.

\*Definición operacional: Años cumplidos al momento de ingreso al estudio.

#### 2. Género.

*Variable potencialmente confusora, nominal.*

\*Definición conceptual: Conjunto, grupo con características comunes.

\*Definición operacional: Indica el sexo de la persona.

#### 3. Peso.

*Variable independiente, numérica continua, de razón.*

\*Definición conceptual: Medida de la fuerza gravitatoria actuando sobre un individuo siendo siempre proporcional a su masa.

\*Definición operacional: Indica los kilogramos que pesa un paciente medido con una báscula de pie debidamente calibrada.

#### 4. Talla.

*Variable independiente, numérica continua, de razón.*

\*Definición conceptual: Es la longitud vertical o en dirección de la gravedad de un paciente.

\*Definición operacional: Indica los metros que mide el paciente medido con cinta métrica.

#### 6. Índice de Masa Corporal (IMC).

*Variable independiente, numérica continua, de razón.*

\*Definición conceptual: Relación entre la masa corporal de una persona y su estatura.

\*Definición operacional: Número que se obtiene a partir de la siguiente ecuación:

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

#### 7. Presión Arterial Sistólica (PAS).

*Variable independiente, numérica continua, de razón.*

\*Definición conceptual: Corresponde al valor máximo de la presión arterial en la sístole cardíaca y se refiere a la presión que ejerce la sangre eyectada sobre la pared de los vasos sanguíneos.

\*Definición operacional: Registro reportado en mmHg al escuchar la primera fase de los ruidos de Korotkoff mediante esfigmomanómetro de columna de mercurio y estetoscopio.

#### 8. Presión Arterial Diastólica (PAD).

*Variable independiente, numérica continua, de razón.*

\*Definición conceptual: Valor mínimo de la presión arterial en la diástole cardiaca y se refiere al efecto de distensibilidad de la pared de las arterias.

\*Definición operacional: Registro reportado en mmHg que se obtiene al dejar de escuchar los ruidos de Korotkoff mediante un esfigmomanómetro de columna de mercurio y estetoscopio.

#### 9. Tiempo de Evolución de DM (TED).

*Variable independiente, numérica continua, de razón.*

\*Definición conceptual: Época durante la cual el paciente ha vivido con el diagnóstico de DM.

\*Definición operacional: Indica el número de años desde el diagnóstico de DM hasta el momento presente.

#### 10. Complicaciones crónicas de Diabétes Mellitus.

*Variables potencialmente confusoras, nominales.*



\*Definición conceptual: Conjunto de padecimientos o enfermedades las cuales se presentan después de cierto tiempo (años) de evolución de la enfermedad y que puede afectar diferentes órganos y sistemas.

\*Definición operacional: Indica las enfermedades que padece el enfermo en diversos aparatos o sistemas como consecuencia de DM de larga evolución.

## 11. Síndrome Nefrótico.

*Variable dependiente, nominal, binaria.*

\*Definición conceptual: Síndrome caracterizado por proteinuria en rangos nefróticos y anormalidades clínicas y metabólicas secundarias a la pérdida urinaria de proteínas.

\*Definición operacional: Presencia de estos 4 elementos: Proteinuria  $>3.5$  g/día, albumina  $<3.5$  g/l, hiperlipidemia (hipercolesterolemia y/o hipertrigliceridemia) y edema.

## 12. Tasa de Filtración Glomerular (TFG).

*Variable dependiente, numérica continua, de razón.*

\*Definición conceptual: Índice que refleja la función renal y es determinado por la alta presión hidrostática a través de los capilares glomerulares y es facilitado por la permeabilidad hidráulica de la pared del capilar glomerular.

\*Definición operacional: Número reportado en ml/min el cual se obtiene de la formula MDRD:

$$FG = 170 \times CrS - 0.999 \times edad - 0.180 \times 1.178(\text{raza negra}) \times 0.755(\text{mujeres}) \\ \times BUN - 0.170 \times albumina + 0.318$$

### 13. Pérdida de la Acelerada de la Función Renal (PAFR).

*Variable dependiente, nominal, binaria.*

\*Definición conceptual: Corresponderá a aquellos casos que hubiesen mostrado una pérdida de la filtración glomerular mayor a 5 ml/min por año en el año previo a la inclusión al estudio.

\*Definición operacional: Representará una diferencia mayor o igual en términos absolutos de 5 ml/min de caída de la filtración glomerular en el año previo a la inclusión al estudio.

### 14. Tratamiento.

*Variables potencialmente confusoras, nominales.*

\*Definición conceptual: Conjunto de medios de cualquier clase cuya finalidad es la curación o alivio e las enfermedades o síntomas.

\*Definición operacional: Indica los medicamentos prescritos al paciente durante la última consulta.

## **Variables bioquímicas**

Muestras de sangre serán obtenidas para medir:

### 1. Creatinina sérica (mg/dl).

*Variable dependiente, numérica continua, de razón.*

\*Definición conceptual: Producto de desecho derivado del metabolismo de la creatina muscular. Considerado un marcador práctico de función renal.

\*Definición operacional: Cantidad de creatinina presente en suero medida por medio de autoanalizador y expresada en miligramos por cada decilitro.

### 2. Glucosa (mg/dl).

*Variable independiente, numérica continua, de razón.*

\*Definición conceptual: Compuesto orgánico (azúcar) que por sus características bioquímicas es un monosacárido, una hexosa (contiene 6 átomos de carbono), una aldosa (el grupo carbonilo esta en el extremo de la molécula) y es fuente principal de energía celular.

\*Definición operacional: Miligramos de dicho monosacárido presentes por cada decilitro de sangre medidos por un autoanalizador.

### 3. HbA1c o Glicohemoglobina (%).

*Variable independiente, numérica continua, de razón.*

\*Definición conceptual: Heteroproteína que resulta de la unión de la hemoglobina con carbohidratos libres, unidos a cadenas carbonadas con funciones ácidas en el carbono 3 y 4.

\*Definición operacional: Porcentaje de hemoglobina glicosilada en sangre determinada mediante ensayo inmunológico fotométrico y expresado en porcentaje.

### 4. Colesterol.

*Variable independiente, numérica continua, de razón.*

\*Definición conceptual: Esterol lípido cuyo nombre procede del griego *kole* (bilis) y *esteros* (sólido) y es una molécula de ciclopentanoperhidrofenantreno constituida por cuatro carbociclos condensados.

\*Definición operacional: Cantidad de colesterol presente en el suero medido mediante un autoanalizador y expresado en miligramos por cada decilitro.

### 5. Triglicéridos.

*Variable independiente, numérica continua, de razón.*

\*Definición conceptual: Acilgliceroles formados por una molécula de glicerol y tres grupos hidroxilos esterificados por tres acidosis grasos ya sean saturados o insaturados.

\*Definición operacional: Cantidad de triglicéridos presentes en el suero, medido por un autoanalizador y expresado en miligramos por cada decilitro.

## 6. Ácido Úrico.

*Variable independiente, numérica continua, de razón.*

\*Definición conceptual: Ácido débil derivado del metabolismo de las purinas, trioxipurina con oxígeno en las posiciones 2, 6 y 8 del anillo de oxipurina.

\*Definición operacional: Cantidad de ácido úrico presente en el suero, medido por un autoanalizador y expresado en miligramos por cada decilitro.

## 7. Albúmina sérica (g/dl).

*Variable potencialmente confusora, numérica continua, de razón.*

\*Definición conceptual: proteína natural simple, animal o vegetal, que se disuelve en agua y se coagula por el calor. Indicador del estado nutricional en seres humanos.

\*Definición operacional: cantidad de albúmina presente en suero medida por medio de autoanalizador y expresada en gramos por cada 100 ml.

## 8. Índice Proteinuria / Creatinuria (g/g).

*Variable dependiente, numérica continua, de razón.*

\*Definición conceptual: formula mediante la cual se estima la proteinuria ajustada a la excreción urinaria de creatinina medida en muestra de orina la azar.

\*Definición operacional: resultado de la división de la proteinuria expresada en mg/dl entre la creatinuria expresada en mg/dl y expresado en g/g.

## **Variables genéticas**

Muestras de sangre serán obtenidas para medir:

1. Polimorfismo inserción/delección de la enzima convertidora de angiotensina.

*Variable independiente, nominal.*

\*Definición conceptual: presencia (inserción, I) o ausencia (delección, D) de una secuencia de 287 pares de bases de DNA en el intrón 16 del gen que codifica para la ECA.

\*Definición operacional: la presencia de los diversos genotipos: inserción/ inserción (II), inserción/delección (ID) o delción/delección (DD) obtenidos mediante el método de reacción en cadena de polimerasa.

## \*ESTADÍSTICA

**Calculo de tamaño de muestra:** en base a una formula para diferencia de medias con una probabilidad de error tipo 1 de 0.05 y una probabilidad de error tipo 2 de .20, se requeriràn de 15 casos por grupo.

**Análisis:** Los resultados se expresarán como promedio  $\pm$  DS o bien como proporciones, según corresponda.

Las comparaciones se harán empleando  $X^2$  para proporciones o con la prueba exacta de Fisher.

La comparación de medias se efectuará con prueba de T de student para muestras independientes o bien con su alternativa no paramétrica (U de Mann-Whitney). En el caso de comparación de màs de dos grupos (de acuerdo a los 3 polimorfismos estudiados) se llevó a cabo mediante ANOVA de 1 vía.

Las Frecuencias de los alelos y genotipos serán obtenidos por conteo directo. Se establecerá si las poblaciones estudiadas están en equilibrio de Hardy-Weinberg para el polimorfismo analizado utilizando el programa estadístico ARLEQUIN.

## \*CONSIDERACIONES ETICAS Y ECONOMICAS

A todos los pacientes se les informo de manera verbal y sin dejar alguna duda la naturaleza del estudio, los beneficios, los cuales no son obtenidos de manera directa, sino más bien la posibilidad de contribuir para poder generar un conocimiento el cual pudiera en un futuro generar beneficios tangibles. Por otro lado se les dio una hoja de consentimiento informado.

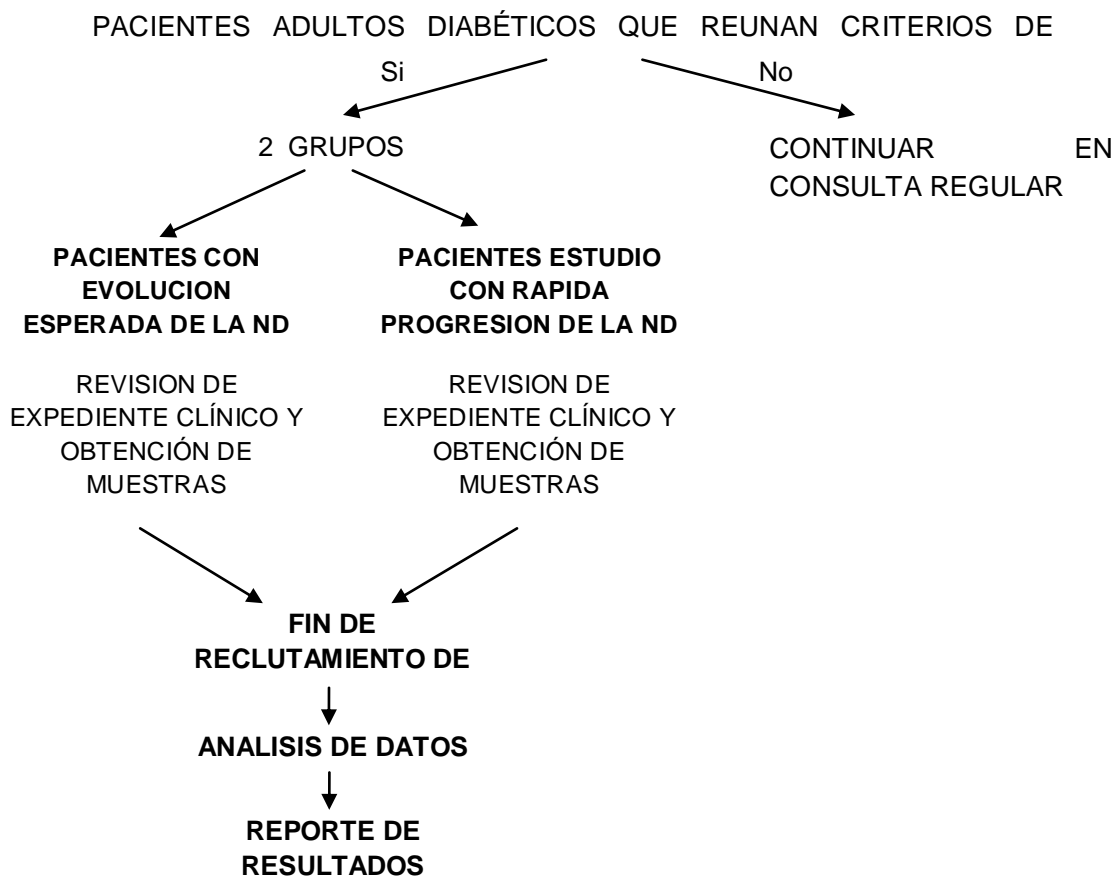
A la única intervención a la que fueron sometidos los pacientes fue a la toma de muestra de sangre (20 ml) para la extracción del DNA, lo cual se llevó a cabo en el departamento de nefrología área de investigación clínica. Se explico que las complicaciones como hematoma en el sitio de punción, infección, flebitis, son mínimas y generalmente resuelven sin necesidad de realizar alguna intervención relevante al cabo de 3-4 días.

Obviamente se explico a los pacientes y familiares que los resultados serían estrictamente confidenciales.

A los pacientes no se les solicitó estudio extra a los que se solicitan de manera rutinaria en la consulta de seguimiento de nefrología, por lo que no se generaron gastos extraordinarios al paciente por otro lado, los estudios de los polimorfismos de la ECA se realizaron gracias al invaluable apoyo del departamento de Fisiología de nuestro instituto a cargo del Dr. Gilberto Vargas Alarcón, los gastos generados por este concepto fueron cubiertos por dicho departamento, por lo que nuevamente no se generaron gastos para los pacientes.



**\*DIAGRAMA DE FLUJO**



## \*PROCEDIMIENTOS

1. El estudio se llevará a cabo en los departamentos de nefrología y fisiología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.
2. El reclutamiento de los pacientes y la revisión del expediente clínico para obtener las variables clínicas se harán por parte del investigador principal (Dr. Francisco Rodríguez Illana).
3. La toma de muestras para la medición de las variables genéticas será responsabilidad del investigador principal.
4. Una vez tomadas las muestras se transportarán al departamento de fisiología donde se almacenarán y se realizará la extracción del DNA como se describe en el apéndice 1.
5. La determinación de los alelos de inserción y deleción se realizará como se describe en el apéndice 2.
6. Fecha de inicio del estudio: 1 de abril del 2008.
7. Fecha de conclusión del estudio: 26 de julio del 2008.

## \*RESULTADOS

Se estudiaron en total 63 pacientes diabéticos tomando en cuenta cualquier tipo de evolución de la misma. En este grupo 41 casos correspondieron al género masculino (65.1%) y 21 casos al género femenino (33.3%).

Las frecuencias alélicas y genotípicas se compararon con 100 controles sanos. La tabla 1 muestra la distribución de dichas frecuencias, las cuales correspondieron a 80 alelos de inserción en el grupo con DM (63.4%) y 125 (62.5%) en el grupo control ( $p=NS$ ), 46 alelos de delección en el grupo DM (36.5%) y 75 (37.5%) en el grupo control ( $p=NS$ ). Cuando se analizaron los genotipos, encontramos 26 homocigotos para el genotipo I/I (41.2%) en el grupo pacientes comparado con 38 (38%) en grupo control ( $p=NS$ ). Finalmente en lo que respecta al estado homocigoto para el alelo de delección (D/D) encontramos una frecuencia de 9 casos en el grupo DM (14.2%) y 13 (13%) en el grupo control ( $p=NS$ ).

		<b>Pacientes</b>		<b>Controles</b>		<b>P</b>
		<b>n=63</b>		<b>n= 100</b>		
<b>Alelo</b>	<b>N</b>	<b>fa</b>	<b>N</b>	<b>Fa</b>		
<b>I</b>	80	.6349	125	.625	NS	
<b>D</b>	46	.3650	75	.375	NS	
<b>Genotipo</b>	<b>N</b>	<b>fg</b>	<b>N</b>	<b>fg</b>		
<b>II</b>	26	.412	38	.380	NS	
<b>ID</b>	28	.444	49	.490	NS	
<b>DD</b>	9	.142	13	.130	NS	

Tabla 1. Frecuencias alélicas y genotípicas en el grupo de diabéticos y controles sanos

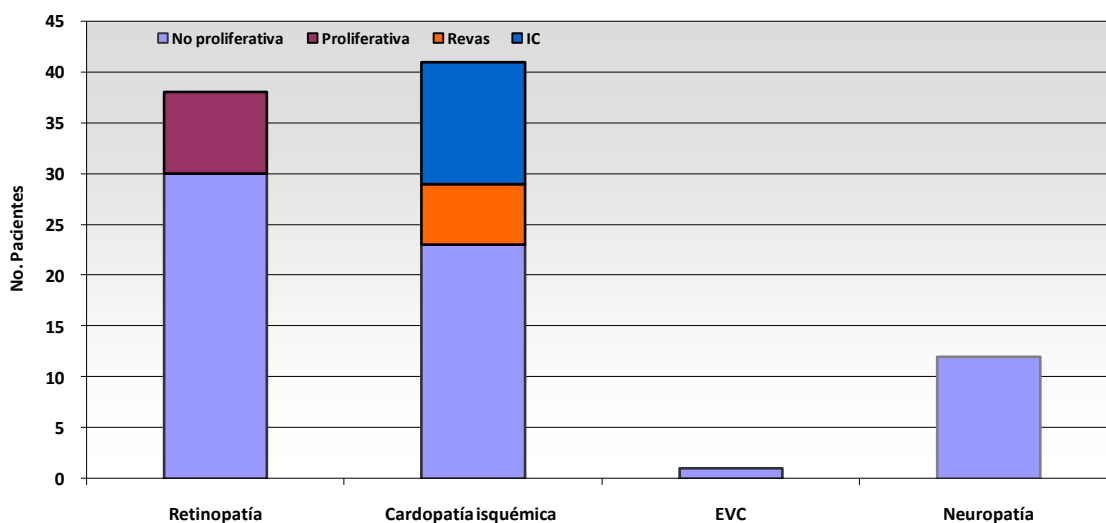
Evaluando la distribución de variables numéricas en el grupo de pacientes diabéticos (sin importar el patrón de evolución clínica) y analizando un total de 63 pacientes, encontramos una edad promedio de  $69 \pm 8.9$  años (rango de 47 a 87 años), el peso promedio fue de  $68.87 \pm 9.64$  kg (rango de 40 a 95 kg), talla de  $1.6 \pm 0.8$  (rango 1.33 a 1.75), IMC de  $26.69 \pm 3.35$  (rango de 19.6 a 34.9).

El promedio de la presión arterial sistólica fue de  $146 \pm 19$  mmHg (rango de 100 a 200 mmHg) y la presión arterial diastólica tuvo un promedio de  $78 \pm 10$  mmHg (rango de 60 a 100 mmHg). Desde el punto de vista del tiempo de evolución de la enfermedad a partir del diagnóstico, encontramos un promedio de  $21.5 \pm 8$  años (rango de 1 a 42 años).

En lo que se refiere al análisis de variables bioquímicas, en el grupo total de diabéticos, se encontró una tasa de filtración glomerular promedio de  $50.4 \pm 18$  ml/min (rango de 18 a 89 ml/min), una pérdida de función renal promedio de  $2.6 \pm 3.4$  ml/min/año (rango 0 a 17 ml/min), lo cual correspondió a una pérdida porcentual promedio de  $5.93 \pm 7.86\%$  (rango de 0 a 32.6%). La creatinina sérica promedio fue de  $1.52 \pm .62$  mg/dl (rango de .64 a 3.65), el promedio de glucosa fue de  $154 \pm 65$  mg/dl (rango de 67 a 366 mg/dl), la hemoglobina glicosilada promedio fue de  $9.19 \pm 2.87$  (rango de 6.3 a 20%), el colesterol sérico de  $164 \pm 39$  mg/dl (rango de 93 a 293 mg/dl), triglicéridos  $190 \pm 92$  mg/dl (rango de 68 a 428 mg/dl), ácido úrico  $6.5 \pm 1.5$  mg/dl (rango de 2.8 a 9.9 mg/dl) y finalmente la albúmina tuvo un promedio de  $4.19 \pm .4$  g/dl (rango de 3.1 a 4.9 g/dl). El índice de proteinuria/creatinuria fue en promedio de  $1.16 \pm 2$  g/g (con un rango de 0.5 a 9.6 g/g).

El grupo DM mostró las siguientes frecuencias de complicaciones (figura 1): treinta casos (47.6%) presentaban retinopatía diabética no proliferativa, 8 casos (12.7%) tenían

retinopatía proliferativa. Subdividiendo al grupo de diabéticos en pacientes con ND establecida (proteinuria mayor a 300 mg/24 hrs) (n= 18) y sin ND establecida (n= 42), encontramos que 17 pacientes con nefropatía presentaban algún tipo de retinopatía (94.4%), de los cuales 7 era del tipo proliferativo. Sólo 21 pacientes sin ND (50%) presentaban retinopatía y un solo caso correspondió al tipo proliferativo. 41 casos (tuvieron antecedentes de cardiopatía isquémica (66%), de los cuales 6 tenían historia de cirugía de revascularización coronaria. Doce casos mostraron manifestaciones de insuficiencia cardiaca. Un caso había presentado un episodio de enfermedad vascular cerebral y doce casos (19%) mostraban algún tipo de neuropatía. Al momento de inclusión al estudio, identificamos 5 casos de síndrome nefrótico (7.9%).



**Figura 1. Complicaciones crónicas**

En relación al tratamiento antiproteinúrico que recibía el total de pacientes diabéticos, este se dividió en 37 casos únicamente con IECA (58.7%), 10 casos recibían bloqueador de receptores de angiotensina (15.9%), tratamiento combinado (IECA + ARA) 12 casos (19%) y 3 pacientes no recibían ninguno de estos tipos de tratamiento (4.8%).

Al efectuar un análisis por subgrupos de pacientes diabéticos, dividiéndolos en pacientes con evolución habitual (grupo 0) y en aquellos con rápida progresión (pérdida de la función renal  $\geq 5$  ml/min/año) (grupo 1), encontramos las siguientes diferencias estadísticamente significativas (tabla 2): Edad ( $70.8 \pm 8.2$  vs  $65 \pm 9.7$  años para grupo 0 y 1 respectivamente,  $p= 0.04$ ), tiempo de evolución ( $23 \pm 7.9$  vs  $17.6 \pm 7.5$  años para grupo 0 y 1 respectivamente,  $p= 0.02$ ), tasa de filtración glomerular al momento de inclusión al estudio ( $53.7 \pm 18$  vs  $40.8 \pm 15.4$  ml/min para grupo 0 y 1 respectivamente,  $p= 0.01$ ), creatinina sérica al momento de inclusión al estudio ( $1.42 \pm .57$  vs  $1.84 \pm .7$  mg/dl para grupo 0 y 1 respectivamente,  $p= 0.04$ ), índice proteinuria/creatinuria ( $.5 \pm .93$  vs  $2.83 \pm 3$  g/g para grupo 0 y 1 respectivamente,  $p= 0.008$ ) y finalmente albúmina sérica ( $4.28 \pm .3$  vs  $3.9 \pm .5$  g/dl para grupo 0 y 1 respectivamente,  $p= 0.02$ ). No se encontró diferencia significativa en el resto de las variables numéricas analizadas.

En lo que se refiera a la presencia de complicaciones en ambos subgrupos de diabéticos no se encontró diferencia significativa en la proporción de pacientes con retinopatía no proliferativa o retinopatía proliferativa, en el número de casos con cardiopatía isquémica, EVC o neuropatía periférica, ni en la proporción de pacientes con historia de revascularización coronaria y/o insuficiencia cardiaca. Únicamente encontramos diferencia significativa al comparar la proporción de pacientes con síndrome nefrótico entre ambos subgrupos (0 vs 8.2% para grupos 0 y 1 respectivamente,  $p= .001$ ).

Al analizar las frecuencias alélicas entre grupos de diabéticos, encontramos 62 casos para el alelo de inserción (66%) en grupo 0 y 18 casos en grupo 1 (57),  $p= NS$ . La distribución

del alelo de delección fue de 32 casos (34%) en el grupo 0 y 14 casos (43%) en el grupo 1,  $p=NS$  (tabla 2).

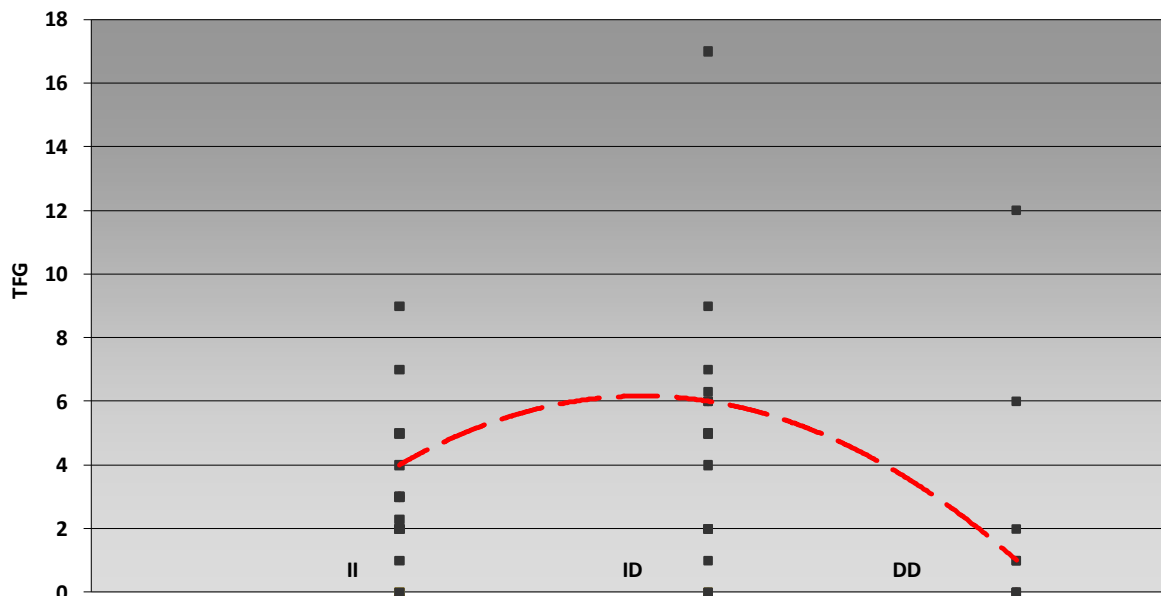
	<b>Grupo 0 n=47</b>	<b>Grupo 1 n=16</b>	<b>P</b>
<b>Características clínicas<sup>+</sup></b>			
<b>Edad</b>	70.8 ± 8.2	65 ± 9.7	0.04
<b>Tiempo evolución diabetes</b>	23 ± 7.9	17.6 ± 7.5	0.02
<b>TFG</b>	53.7 ± 18	40.8 ± 15.4	0.01
<b>CrS</b>	1.42 ± .57	1.84 ± .7	0.04
<b>Prot/creat</b>	.5 ± .93	2.83 ± 3	0.008
<b>Frecuencias alélicas<sup>#</sup></b>			
<b>I (%)</b>	62 (66%)	18 (57%)	NS
<b>D (%)</b>	32 (34%)	14 (43%)	NS
<b>Genotipo<sup>&amp;</sup></b>			
<b>II (%)</b>	22 (48%)	4 (24%)	NS
<b>ID (%)</b>	18 (37%)	10 (63%)	NS
<b>DD (%)</b>	7 (15%)	2 (13%)	NS

<sup>+</sup>Expresado en media ± DS    <sup>#&</sup>Expresado en totales (porcentaje)

**Tabla 2. Características clínicas, frecuencias alélicas y genotípicas entre pacientes con evolución esperada y rápida progresión de nefropatía diabética**

Es interesante mencionar que aunque no encontramos diferencia significativa al comparar la pérdida de la función renal entre los tres polimorfismos, la presencia del alelo D mostró una tendencia a mayor pérdida de función renal en comparación con la ausencia de dicho alelo ( $2.4 \pm 2.9$ ,  $2.8 \pm 3.7$  y  $2.44 \pm 4$  ml/min/año para los genotipos II, ID y DD

respectivamente), lo cual correspondió a una pérdida porcentual de  $5 \pm 7.3$ ,  $7.2 \pm 8.6$  y  $4.4 \pm 6.9$  % en el mismo orden según cada polimorfismo (figura 2).



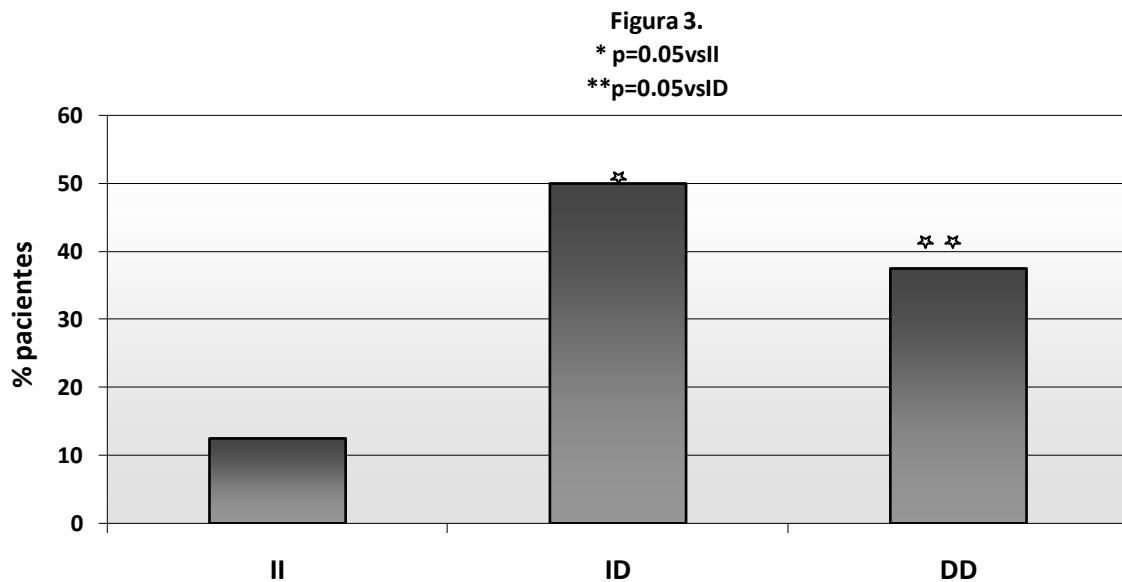
**Figura 2. Pérdida de filtración glomerular por año según genotipo**

Al comparar las diferentes variables clínicas y bioquímicas de acuerdo al genotipo de la ECA, encontramos una diferencia estadísticamente significativa en el índice de masa corporal entre la variante ID ( $25.81 \pm 2.6 \text{ kg/m}^2$ ) vs la variante DD ( $29.2 \pm 3.38 \text{ kg/m}^2$ ), así mismo aunque no alcanzó diferencia significativa ( $p=0.07$ ), la presión arterial sistólica mostró una tendencia a ser mayor en el grupo homocigoto para el alelo D ( $155 \pm 21.7 \text{ mmHg}$ ) vs el genotipo ID ( $139 \pm 18 \text{ mmHg}$ ) y los homocigotos para el alelo I ( $150 \pm 17 \text{ mmHg}$ ). Se encontró además diferencia significativa en los niveles de colesterol y triglicéridos, siendo los valores para colesterol de acuerdo a la variante polimórfica de  $180 \pm 45 \text{ mg/dl}$  para el genotipo II,  $152 \pm 31 \text{ mg/dl}$  para el genotipo ID y  $153 \pm 27 \text{ mg/dl}$  para el genotipo DD y en lo que respecta a los niveles séricos de triglicéridos encontramos un promedio de  $219 \pm 91 \text{ mg/dl}$  para el polimorfismo II,  $167 \pm 84 \text{ mg/dl}$  para el ID y  $170 \pm$



105 mg/dl para el polimorfismo DD. El resto de las variables bioquímicas analizadas no mostraron diferencia significativa al comparar los tres genotipos.

Con respecto a las complicaciones crónicas, una vez más, resaltó que la presencia del alelo D se asoció con una mayor frecuencia de retinopatía proliferativa, correspondiendo a 12.5%, 50% y 37.5%, para las variantes II, ID y DD respectivamente ( $p= 0.05$ ). El resto de las complicaciones crónicas no mostró diferencia significativa al comparar sus respectivas proporciones de acuerdo a los tres genotipos (figura 3).



De acuerdo a observaciones ya conocidas, en el sentido de que la ND raramente se presenta en pacientes antes de 15 años de diagnóstico, dividimos nuestro grupo de pacientes de la siguiente manera: ND antes de 15 años de evolución posterior al diagnóstico y pacientes sin nefropatía después de 15 años de diagnóstico, encontrando un tendencia, si bien, no estadísticamente significativa, de presentar con mayor frecuencia el alelo D en los pacientes

con ND antes de 15 años de diagnóstico y el alelo I en los pacientes con DM de larga evolución y sin nefropatía.

Finalmente se intento un análisis multivariado del tipo de la regresión logística binaria, tomando como variables blanco el patrón de evolución (esperada o rápida progresión) o bien el tiempo de evolución (menor de 15 años o  $\geq$  a 15 años), sin embargo dicho análisis no identifico ningún factor de riesgo para dichos desenlaces, debido muy probablemente al reducido tamaño muestral y a una baja relación evento/parámetro.

## \*DISCUSIÓN

El objetivo principal de nuestro estudio fue el de conocer si las diferentes variantes polimórficas del gen que codifica para la ECA se asocian a diferentes patrones de evolución de la ND. Encontramos una tendencia aunque no significativa en ese sentido, ya que la presencia del alelo D se asoció a una mayor pérdida de función renal. Asimismo se observó con mayor frecuencia el genotipo II en pacientes con larga evolución de la enfermedad y sin ND y si bien nuestro estudio no es el primero en tratar de encontrar una asociación entre ND y polimorfismos de la ECA, si lo es en lo que respecta a la asociación con patrones de progresión de la enfermedad en pacientes mexicanos.

Como es bien sabido la ND establecida raramente aparece antes de 15 años de establecido el diagnóstico de DM, posterior a lo cual la pérdida en la tasa de filtración glomerular puede ser muy variada (5-20 ml/min/año) dependiendo de varios factores (tratamiento médico, nivel de presión arterial, etc.).

El aspecto genético es una de las áreas más investigadas y recientemente se ha estudiado el polimorfismo I/D de la ECA en diversas poblaciones, predominando estudios en pacientes con DM tipo 1. Los resultados son contrastantes dependiendo de la población estudiada. Algunos de estos estudios han encontrado asociación entre el genotipo DD y deterioro más rápido de la función renal así como con una mayor mortalidad<sup>26</sup>. Otros trabajos han reportado una incidencia incrementada tanto del alelo D como del genotipo DD en pacientes diabéticos en terapia de sustitución de la función renal, controlando para tiempo de evolución de la enfermedad, entre otras variables, lo cual propone a dicho alelo o polimorfismo como factor de progresión hacia enfermedad renal avanzada.<sup>27</sup>

A diferencia del estudio recientemente publicado por Ortega y colaboradores<sup>28</sup> en el que se encontró una frecuencia mayor del genotipo DD en pacientes con ND ya sea establecida o incipiente en comparación con pacientes control, nosotros no pudimos corroborar dicha diferencia, si bien si se identificó un mayor porcentaje de alelo I en pacientes sin ND, así como del alelo D en pacientes con evolución acelerada de la enfermedad, lo cual no alcanzó significancia estadística pero consideramos que seguramente esto se debe al tamaño reducido de nuestra muestra.

La población mexicana mestiza tiene una frecuencia de aproximadamente 40% de genes caucásicos (especialmente españoles)<sup>29</sup> y los estudios en población caucásica, a comparación con estudios en asiáticos, son menos concluyentes y más contrastantes con respecto a tratar de encontrar una asociación entre la ND y los polimorfismos de la ECA, por lo que tal vez esta sea una probable explicación a la falta de asociación contundente entre la evolución de la enfermedad y los polimorfismos en nuestros pacientes mestizos. Otra explicación es la menor frecuencia del alelo D en población indígena en comparación con la población en general, como se reporta en el estudio de Foy y colaboradores en indios Pima<sup>23</sup>, en el que se encontró una frecuencia del alelo D de 0.29% vs 0.52% comparándolo con pacientes caucásicos. Teniendo nosotros un 60% de genes de origen indígena esta podría ser otra posible causa de la no asociación contundente entre los polimorfismos de la ECA y los diferentes patrones de evolución de la enfermedad.

Ahora bien, definitivamente en el desarrollo y progresión de la ND se encuentra involucrado todo el sistema renina angiotensina aldosterona, en incluso recientemente se ha reportado el papel de la aldosterona como profibrótica y proalbuminúrica, independientemente de sus efectos hemodinámicos. Esto puede guiar hacia nuevas líneas de

investigación en nuestros pacientes, evaluando posibles asociaciones de la ND con polimorfismos del resto del sistema o incluso con otros mediadores independientes del SRAA, como por ejemplo el factor de crecimiento transformante B.

Nosotros encontramos una asociación entre el genotipo DD y mayores niveles de la presión arterial sistólica entre pacientes con evolución esperada de la enfermedad en comparación con pacientes con evolución rápida, por lo que en un futuro se podría investigar la presencia de polimorfismos del sistema renina angiotensina aldosterona los cuales se han encontrado asociados en otros grupos de estudio a hipertensión arterial, como es el caso del gen que codifica para angiotensinógeno y el gen que codifica para la sintasa de aldosterona y dado que la hipertensión arterial sistémica es uno de los principales factores que influyen en la progresión de la ND, pudieran entonces estar involucrados dichos polimorfismos en formas más agresivas de evolución de esta entidad.

Estudios previos en nuestra población han podido encontrar asociaciones relevantes entre la frecuencia del alelo D y el genotipo DD con cardiopatía isquémica. Vargas-Alarcon y colaboradores<sup>31</sup> encontraron una mayor frecuencia del alelo D entre pacientes con enfermedad coronaria comparándolo contra controles sanos (54.1% vs 37.5%,  $p= 0.0005$ , OR = 1.96, IC 95%, 1.34-2.88) y una menor frecuencia del alelo I (45.9% vs 62.5%,  $p= 0.0005$ , OR = 0.51, IC 95%, 0.35-0.75) en dichos grupos. Asimismo describieron una mayor frecuencia y riesgo de enfermedad coronaria asociada al genotipo DD. En este estudio no encontramos asociación entre el genotipo o alelo D y la presencia de cardiopatía isquémica, probablemente también debido al tamaño muestral, dado que esta asociación (alelo D y/o genotipo DD y cardiopatía isquémica) ha sido ampliamente encontrada en

diferentes grupos étnicos, incluyendo asiáticos y caucásicos, por lo que debido a nuestro fondo genético esperaríamos encontrar dicha relación en nuestros pacientes.

Dato relevante es que se encontró una mayor frecuencia de los genotipos involucrando al alelo D (ID y DD) en casos con retinopatía diabética proliferativa en comparación con aquellos casos con el genotipo II (12.5% vs 50% entre II vs ID,  $p=0.05$  y 12.5% vs 37.5% entre II vs DD,  $p= 0.05$ ). En este sentido, la presencia del alelo D y del genotipo DD se asocia con un incremento de hasta 40% en la actividad de la enzima convertidora de angiotensina<sup>20</sup>, lo cual puede traducir mayor actividad del sistema y por lo tanto, mayor producción de factores profibróticos, como por ejemplo TGF- $\beta$ , PAI-1, etc., lo cual lleva a un desequilibrio entre la producción de matriz y la degradación de la misma, a favor de lo primero, así como a angiogénesis, que clínicamente se manifestaría como proliferación a nivel retiniano.

Dado que la proteinuria es el punto cardinal en la evolución de la nefropatía diabética, valoramos si la presencia del alelo D o algún genotipo que incluyera dicho alelo, se asociaba a mayor proteinuria o a síndrome nefrótico, no encontrando diferencia significativa entre los diferentes grupos. Nuestros resultados en este sentido concuerdan con el estudio previamente publicado por Hadjadj y colaboradores, en el cual se estudiaron 3139 pacientes franceses diabéticos tipo 2, sin que se hubiese encontrado asociación entre los polimorfismos de la ECA y macroalbuminuria<sup>32</sup>.

Analizando el perfil metabólico de nuestros pacientes, encontramos que los pacientes homocigotos para el alelo D, presentaban mayor presión arterial sistólica, IMC, así como niveles de colesterol y triglicéridos. Como es bien sabido, existe un fondo genético de

predisposición hacia síndrome metabólico y se han propuesto como genes candidatos los que involucran al SRAA. Álvarez-Aguilar y colaboradores<sup>30</sup> encontraron asociación entre el genotipo DD y el riesgo de desarrollar síndrome metabólico en población mexicana, con una razón de momios de 5.48, (IC 95%, 3.20-9.38,  $p < 0.0001$ ). Tanto los hallazgos de Álvarez-Aguilar así como los nuestros confirman que al menos en pacientes mestizos mexicanos la presencia del alelo D y más aún, del genotipo DD se asocia a un perfil metabólico más adverso, el cual puede impactar de manera directa en la función renal, no solo desde el punto de vista de la DM y ND, sino también en otras condiciones clínicas tales como obesidad, hipertensión arterial, dislipidemia e hiperuricemia, todos componentes del síndrome metabólico, lo que sugiere que pacientes con este perfil genético pueden tener mayor riesgo de desarrollar deterioro acelerado de la función renal. Lo anterior deberá de ser corroborado en estudios prospectivos.

Finalmente, un hallazgo que llamó fuertemente la atención en nuestro estudio, es el hecho de que la gran mayoría de nuestros pacientes se encontraban con tratamiento antiproteinúrico a base de IECA y/o ARA, lo cual sugeriría que el tratamiento farmacológico en pacientes con perfiles genéticos aparentemente de mayor riesgo para deterioro de la función renal en nuestra población, es aun subóptimo.

## \*CONCLUSION

La presencia del alelo D en nuestra población se asoció a un perfil metabólico más adverso y a una tendencia a una mayor progresión del daño renal en pacientes diabéticos.



## \*APENDICES

1. El DNA genómico fue extraído de 10 ml de sangra periférica de cada individuo utilizando la técnica de expulsión salina<sup>33</sup>. Cada muestra fue cuantificada y su pureza se determinó utilizando un espectofotometro.

2. El polimorfismo en el intron 16 de la ECA fue determinado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los siguientes iniciadores previamente descritos: sentido 5'-CTGCAGACCACTCCCATCCTTTCT-3' y antisentido 5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3'<sup>20</sup>. Las reacciones fueron realizadas en un volumen final de 25 µl conteniendo 200 µM de cada dNTP, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 1X de amortiguador de PCR, 50 pmoles de cada iniciador, 1 µg de DNA y una unidad de *Taq* polimerasa. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer modelo 9700 (Foster City, CA, USA) con las siguientes condiciones: desnaturalización a 93°C por 1.5 minutos, alineamiento a 58°C por 2 minutos y extensión a 72°C por 2 minutos (30 ciclos). Los productos amplificados fueron corridos en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio y se visualizaron en un transluminador de luz ultravioleta. Los tamaños de los fragmentos fueron estimados por comparación con un marcador de peso molecular conocido. El alelo de inserción fue visualizado como un fragmento de 490 pares de bases, mientras que el alelo de deleción incluyo un fragmento de 199 pares de bases, presentándose ambos fragmentos en el caso de individuos heterocigotos. Debido a que este sistema tiene preferencia para la amplificación del alelo de deleción, cada *muestra* que se detectó como homocigota D/D fue amplificada nuevamente utilizando una pareja de iniciadores específicos para la inserción (5<sup>a</sup>: 5'-TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC-3' y 5c: 5'-TCGCCAGCCCTCCCATGCCCATAA-3')

## \*REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

<sup>1</sup> International Diabetes Federation. <http://www.eatlas.idf.org/Incidencia/>

<sup>2</sup> World Health Organization. <http://www.who.int/diabetes/facts/index.html>

<sup>3</sup> Federación Mexicana de Diabetes. <http://www.fmdiabetes.com/>

<sup>4</sup> Sistema Nacional de Información en Salud. Dirección General de Información en Salud. 2007. [http://www. sinais.salud.gob.mx/](http://www.sinais.salud.gob.mx/)

<sup>5</sup> Cortés P, Mogensen CE. Prefacio. En su: Contemporary Diabetes: The Diabetic Kidney. Nueva Jersey, Humana Press, 2006. pp. Ix.

<sup>6</sup> Vora JP, Ibrahim Hisham AA. Clinical Manifestation and Natural History of Diabetic Nephropathy. En: Johnson RJ y Feehally J., ed. Comprehensive Clinical Nephrology. Philadelphia, Mosby Elsevier. 2004. pp. 425-437.

<sup>7</sup> Woredek Y, Friedman EA. Clinical Aspects of Diabetic Nephropathy. En: Schrier RW., ed. Diseases of the Kidney and Urinary Tract. Denver, Lippincott Williams and Wilkins. 2007. pp. 1894-1908.

<sup>8</sup> Stephen SM, “et al”. Contribution of Polyol Pathway to Diabetes-Induced Oxidative Stress. *JASN*, 14(S3): S233-S236, Agosto 2003.

<sup>9</sup> Parving HH, Mauer M, Ritz E. Diabetic Nephropathy. En: Brenner y Rector’s, ed. The Kidney. Philadelphia, Saunders Elsevier. 2007. pp. 1265-1269.

<sup>10</sup>Cooper ME, Gilbert RE. Pathogenesis, Prevention, and Treatment of Diabetic Nephropathy. En: Johnson RJ y Feehally J., ed Comprehensive Clinical Nephrology. Philadelphia, Mosby Elsevier. 2004. pp. 439-450.

<sup>11</sup>Heilig CW. Altered Glucose Transport and Its Metabolic Effects in Glomerular Cells. En: Cortés P y Mogensen CE., ed. Contemporary Diabetes: The Diabetic Kidney. Nueva Jersey, Humana Press. 2006. pp. 81-96.

<sup>12</sup>D'Agati V, Schmidt AM. Glycation. Receptor for Advanced Glycation Endproducts and Diabetic Nephropathy. En: Cortés P y Mogensen CE., ed. Contemporary Diabetes: The Diabetic Kidney. Nueva Jersey, Humana Press. 2006. pp. 137-148.

<sup>13</sup>DeRubertis FR, Craven PA. Oxidative and Glycooxidative Stress in Diabetic Nephropathy. En: Cortés P y Mogensen CE., ed. Contemporary Diabetes: The Diabetic Kidney. Nueva Jersey, Humana Press. 2006. pp. 151-172.

<sup>14</sup>Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension*, 38(3): 635-638, Septiembre 2001.

<sup>15</sup>Epstein M. Aldosterone as a Mediator of Progressive Renal Disease: Pathogenetic and Clinical Implications. *AJKD*, 37(4): 677-688, Abril 2001.

<sup>16</sup> Rocha R, Chander PN, Zuckerman A, Stier CT. Role of aldosterone in renal vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension*, 33(1): 232-237, Enero 1999.

<sup>17</sup> Rocha R, Chander PN, Khanna K, Zuckerman A, Stier CT. Mineralocorticoid blockade reduces vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension*, 31(1): 451-458, Enero 1998.

<sup>18</sup> Jacobsen PK. Preventing End Stage Renal Disease in Diabetic Patients-Genetic Aspects (part 1). *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 6(1): 1-14, Marzo 2005.

<sup>19</sup> Sayed-Tabatabaei FA, Oostra BA, Isaacs A, van Duijin CM. ACE Polymorphisms. *Circulation Research*, 98(9): 1123-1133, Mayo 2006.

<sup>20</sup> Rigat B, "et al". An Insertion/deletion Polymorphism in the Angiotensin I-Converting Enzyme Gene Accounting for Half the Variance of Serum Enzyme Level. *J Clin Invest*, 86(4): 1343-1346, Octubre 1990.

<sup>21</sup> Kunz R, Bork JP, Fritsche L, Ringel J. Association Between the Angiotensin-Converting Enzyme-Insertion/Deletion Polymorphism and Diabetic Nephropathy: A Methodologic Appraisal and Systematic Review. *JASN*, 9(9): 1653-1663, Septiembre 1998.

<sup>22</sup> Ng DP, Tai BC, Koh D, Tan KW, Chia KS. Angiotensin-I Converting Enzyme Insertion/deletion Polymorphism and its Association with Diabetic Nephropathy: a Meta-analysis of Studies Reported Between 1994-2004 and Comprising 14,727 Subjects. *Diabetologia*, 48(5): 1008-1016, Mayo 2005.

<sup>23</sup> Foy CA, McCormack LJ, Knowler WC, Barrett JH, Catto A, Grant PJ. The Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE) Gene I/D Polymorphism and ACE Levels in Pima Indians. *J Med Genet*, 33(4): 336-337, Abril 1996.

<sup>24</sup>Martínez E, Puras A, Escribano J, Sanchis C, Carrión L, Artigao M, División JA, Massó J, Vidal A, Fernández JA. Angiotensin-converting Enzyme (ACE) Gene Polymorphism, Serum ACE Activity and Blood Pressure in Spanish Mediterranean Population. *J Human Hypertension*, 14(2): 131-135, Febrero 2000.

<sup>25</sup>Lisker R, Pérez-Briceño R, Granados J, Babinsky V. Gene Frequencies and Admixture Estimates in Four Mexican Urban Centers. *Hum Biology*, 62(6): 791-801, Diciembre 1990.

<sup>26</sup>Fava S, Azzopardi J, Ellard S, Hattersley AT. ACE Gene Polymorphism as a Prognostic Indicator in Patients With Type 2 Diabetes and Established Renal Disease. *Diabetes Care*, 24(12): 2115-2120, Diciembre 2001.

<sup>27</sup>Cheon Park H, Rae Choi S, Seok Kim B. Polymorphism of the ACE Gene in Dialysis Patients: Overexpression of DD Genotype in Type 2 Diabetic End-Stage Renal Failure Patients. *Yonsei Medical Journal*, 46(6): 779-787, 2005.

<sup>28</sup>Ortega-Pierresa LE, Gómez A, Rodríguez-Ayalac E, Figueroa-Núñez B. Polimorfismo Inserción/delección del Gen de la Enzima de Conversión de la Angiotensina en una Población Mexicana con Nefropatía Diabética. *Medicina Clínica*, 129(1): 6-10, 2007.

<sup>29</sup>Vargas-Alarcon G, Hernández-Pacheco G, Rodríguez-Pérez JM. Angiotensin-Converting Enzyme Gene (ACE) Insertion/Deletion Polymorphism in Mexican Populations. *Human Biology*, 75(6): 889-896, Diciembre 2003.

<sup>30</sup>Alvarez-Aguilar C, Enríquez-Ramírez ML, Figueroa-Nuñez B. Association Between Angiotensin-1 Converting Enzyme Gene Polymorphism and the Metabolic Syndrome in a Mexican

Population. *Experimental and Molecular Medicine*, 39(3): 327-334, Junio 2007.

<sup>31</sup>Vargas-Alarcon G, Zamora J, Sánchez-García S. Angiotensin-I-converting Enzyme (ACE) Insertion/deletion Polymorphism in Mexican Patients with Coronary Artery Disease. Association with the disease but not with Lipid Levels. *Experimental and Molecular Pathology*, 81: 131-135, Junio 2006.

<sup>32</sup>Hadjadj S, Gallois Y, Alhenc-Gelas F. Angiotensin-I-converting Enzyme *Insertion/deletion*

Polymorphism and High Urinary Albumin Concentration in French Type 2 Diabetes Patients. *Diabetic Medicine*, 20: 677.682, Marzo 2003.

<sup>33</sup>Miller A, et all. A single salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell. *Nucleic Acid Res*, 16:1217-17, 1998.

## **\*CONSENTIMIENTO INFORMADO**

### **HOJA DE CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO:**

#### *Polimorfismos de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en población mexicana con Diabetes Mellitus No Insulino Dependiente*

### **INVITACION A PARTICIPAR**

Usted esta invitado a participar en el estudio que incluye a pacientes con el diagnóstico de DM no insulino dependientes sin insuficiencia renal crónica avanzada y/o que no reciban terapia sustitutiva de la función renal. El objetivo del estudio es determinar si los pacientes con los diagnóstico ya mencionado, poseen variantes polimórficas del gen que codifica para la enzima convertidora de angiotensina los cuales los hacen susceptibles a una evolución atípico de la enfermedad (rápida progresión de la nefropatía, establecimiento de NDen con corta evolución de la enfermedad). La historia natural de la enfermedad nos indica que sin tratamiento médico la ND puede establecerse aproximadamente 15 años después del diagnóstico de DM, sin embargo existen pacientes los cuales presentan dichas complicaciones en un tiempo relativamente menor lo cual nos hace sospechar de cierta predisposición genética, o incluso presentan complicaciones pese a contar con el tratamiento adecuado. Los pacientes con una evolución mas agresiva de la enfermedad son propensos a desarrollar insuficiencia renal crónica de manera más temprana incluso alcanzar los estadios finales pese a tratamiento médico. Existen diferentes factores que están involucrados en el desarrollo de la enfermedad, entre ellos un sistema que en medicina se conoce como “Sistema renina angiotensina”, y la enzima convertidora de angiotensina en una sustancia la cual es parte fundamental de este sistema, por lo que los tratamientos actuales van dirigidos a tratar de bloquear esta enzima. Genéticamente podemos tener esta enzima con mayor actividad que lo normal, lo cual puede favorecer a desarrollar la ND más rápido o tener una enfermedad más agresiva de lo normal. Al estudiar los genes que codifican para la enzima antes mencionada, específicamente los polimorfismos, podremos saber si estos se asocian a un patrón de evolución de la enfermedad y así en un futuro tan vez poder optimizar el tratamiento en los pacientes que tengan esta predisposición genética y de esa manera tratar de evitar que la enfermedad progrese rápidamente o de manera

agresiva.

Su aceptación en el estudio no implica la administración de medicamentos diferentes a los que usted recibe hasta la actualidad. Usted continuaría recibiendo su tratamiento médico y consultas en forma regular.

La decisión de participar implica que usted tenga un conocimiento completo de los riesgos y beneficios, los cuales se detallan en esta carta.

Cualquier duda adicional puede ser aclarada por el investigador responsable.

Una vez que usted lea este escrito y aclare sus dudas, podrá decidir si desea participar en el estudio o no.

### **PROCEDIMIENTOS A REALIZARSE**

Inicialmente se revisarán sus antecedentes en el expediente clínico el día que usted acuda a consulta externa de nefrología así como sus exámenes de laboratorio, esto se hace de manera rutinaria cada vez que acude a consulta y, si decide participar, se le tomarán muestras de sangre (20 ml). No requerirá estar en ayuno para la toma de dichas muestras y una vez tomadas las muestras podrá continuar con sus labores normales.

Como se comentó previamente usted recibiría su consulta de manera normal, y se solicitarán exámenes de laboratorio pertinentes, así como interconsultas pertinentes (oftalmología, cardiología) de acuerdo a los que se observe tanto en el expediente clínico como al momento de la exploración física, todo lo anterior mencionado se realiza de manera regular en las consultas. En caso de que no desee participar, esto no influirá en las consultas subsecuentes y se le continuará brindando la intención médica de manera normal y regular.

### **EFFECTOS INDESEABLES Y RIESGOS**

Cuando la sangre es obtenida, usted podrá experimentar un leve dolor en el sitio de punción. Raras veces ocurren infecciones o inflamación local. Estos riesgos se reducen al emplear al personal especializado para la obtención de muestras.

### **BENEFICIOS PARA LAS PERSONAS PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO**



En caso de los pacientes con rápida progresión o evolución agresiva, podremos conocer aspectos genéticos y tal vez poder realizar ajustes en el tratamiento médico en el caso de los pacientes con larga evolución y sin nefropatía se continuará con mismos manejos y vigilancia pero con el conocimiento de haber participado en un estudio cuyo objetivo es brindar conocimiento sobre la evolución de dicha enfermedad.

### **CONSIDERACIONES ECONOMICAS**

Usted no pagaría ningún costo adicional a los que paga por sus consultas y exámenes regulares, no hay costo por el examen genético.

### **CONFIDENCIALIDAD**

Los datos generados durante este estudio tendrán un carácter estrictamente confidencial. Solo los investigadores tendrán acceso a los datos generados durante el estudio.

### **DERECHO A ABANDONAR EL ESTUDIO**

Su participación se considera completamente voluntaria y usted puede desistir de participar o continuar en el estudio en el momento que lo desee. Esta determinación no afectará de ninguna manera su relación con el hospital o el grupo médico.

Si usted considera que cualquiera de los puntos antes mencionados no está claro, o le surgen dudas nuevas, le suplicamos aclararlas con el investigador responsable antes de determinar si participará o no en el estudio. Al Dr. Francisco Rodríguez Illana podrá localizarlo en el teléfono siguiente: 55732911, ext. 1262.

### **AUTORIZACION**

He leído el contenido de este escrito y he decidido por voluntad propia participar en este estudio. Sus objetivos generales, los particulares y los riesgos posibles e inconveniencias me han sido explicados y aclarados a satisfacción. Mi firma indica también que he recibido una copia de la presente autorización para participar.

---

Nombre

---

Firma

---

Fecha:

---

Teléfono:

---

Firma de quien obtiene el consentimiento

---

Testigo

---

Testigo