

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

TESIS

**” EVALUACIÓN DEL SNP T130I DEL GEN *HNF4 α* EN PACIENTES
CON DIABETES DE APARICIÓN TARDÍA”**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

Marina Robles Flores

MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente Prof. Homero Hernández Montes _____.

Vocal Prof. Alicia Beatriz Cervantes Peredo _____.

Secretario Prof. Marta Alicia Menjívar Iraheta _____.

1er. Suplente Prof. Ma. Benita L. Fernández Salgado _____.

2º. Suplente Prof. Antonio Ulises López Gutiérrez _____.

Facultad de Química. UNAM.

Asesor: Dra. Marta Alicia Menjívar Iraheta _____.

Supervisor Técnico: Dra. Ma. Guadalupe Ortiz López _____.

Sustentante: Marina Robles Flores _____.

*Ayer soñé que
podía...
Hoy, sé que puedo.*

Había una vez una niña que estaba en busca del Mago de Oz y para llegar a él tenía que seguir el camino amarillo, en su recorrido se encontró un espantapájaros, un león y un hombre de hojalata que la ayudaron y acompañaron en la aventura. Todos estos simpáticos personajes añoraban conseguir algo: la niña, regresar a su hogar; el espantapájaros quería un cerebro, el león tener valor y el hombre de hojalata poseer un gran corazón. Y el resto de la historia la mayoría lo sabemos...

*Pero hoy sé que este no es tan sólo un cuento de hadas, que el Mago de Oz sí existe: es la **realización de nuestros sueños o nuestras metas logradas**. Y que también existe un camino amarillo, que tiene un sin fin de paisajes donde hay que enfrentar miles de obstáculos para poder llegar a nuestro destino, y se llama: **VIDA** y que hay que recorrerla con valor y osadía. Hoy, también sé que hay un sin número de espantapájaros, leones y hombres de hojalata que nos acompañan en el camino y que no son otra cosa más que la gente que te quiere: **son nuestra familia y amigos** que siempre están dispuestos a ir contigo.*

Y por eso, hoy quiero darle gracias a todos y cada uno de los que fueron partícipes en el logro de mi máspreciado anhelo:

Principalmente, a Dios y a la vida por ponerme en el camino los elementos necesarios para la realización de este sueño.

A mis padres: por estar conmigo día a día apoyando mis decisiones y nunca dejarme sola. Gracias por ser tan valientes y tomar esa difícil decisión, hace 27 años, que hizo posible que pudiera disfrutar de las maravillas de este mundo, gracias por permitirme nacer. Gracias por enseñarme a ganarme las cosas, que nada te cae del cielo y tienes que luchar por conseguir lo que quieres, por darme un ejemplo de vida y mostrarme que el amor y la unión son nuestro único motor. Éste, también es su triunfo, disfrútenlo como yo lo estoy haciendo y estén satisfechos de su misión haber cumplido... Los amo.

A mi hermanita: por ser parte de mi motivación y uno de mis grandes pilares. Por confiar en mí, por ser mi cómplice y confidente, por cuidar a mi perrito mientras yo no podía, por los postres ricos que me hacía, por extrañarme cuando estaba ausente, por demostrarme siempre su cariño y ser tan

ocurrente. Porque a pesar de ser como agua y aceite, nosotros sí nos podemos mezclar. Te quiero mucho chaparrita.

A mis viejitos, Ponchito (q.d.p) y Chepina: que me daban la fuerza para continuar y me albergaron en su hogar, por sus sabios consejos, por sus tiernas palabras y demostraciones de amor.

A mis tías Yola, Estela y Rosi: que siempre han velado por mi porvenir.

A mis amigos: por estar conmigo a cada instante, por compartir momentos importantes y por llenar de alegrías y sonrisas mi tiempo de estudiante. Por todos y cada uno de sus abrazos, detalles y palabras de aliento que supieron darme en los momentos difíciles; por convertirse en mi segunda familia y brindarme todo su amor, entendiendo siempre quién soy yo.

A todos los que estuvieron conmigo en el laboratorio: que compartieron mis triunfos y mis tropiezos, que me brindaron siempre la mano y me apoyaron para seguir caminando.

A los compañeros del INCAN: Edgar, que siempre preguntaba por la tesis y estaba al pendiente de mí, dándome consejos y ánimo para seguir. Judith, por mostrarme que había salido de la facultad y debía enfrentarme al mundo real, que era momento de crecer y madurar o simplemente resignarme a fracasar. Vicky, por la paciencia que me ha tenido, por compartirme sus experiencias y conocimientos, por ser abierta y franca conmigo. A los tres: gracias por creer en mi y brindarme su confianza.

Gracias a todos los que estuvieron a mi lado y que no he mencionado; pero es tanta la gente linda a mi alrededor que sería casi imposible nombrarla a toda sin excepción, por eso les pido perdón si acaso su nombre no aparece en esta ocasión.

Y por último, y sin menos importancia:

Gracias al Hospital Juárez de México y a la Facultad de Química de la UNAM por prestar sus instalaciones para la realización de este trabajo.

Gracias a mi querida Facultad de Química por albergarme dentro de sus aulas por tanto tiempo y por llenarme de enseñanzas y conocimientos. A ti y a los profesores que cruzaron en mi camino les doy gracias por ayudarme a convertirme en una profesionalista; nunca olvidaré mis días en la UNAM...

ÍNDICE

	Pág.
Resumen	7
1. Introducción	9
2. Antecedentes	10
2.1 Glucosa e Insulina	10
2.1.1 Transporte y Homeostasis de la Glucosa	10
2.1.2 Insulina	14
2.2 Diabetes Mellitus	14
2.2.1 Definición	14
2.2.2 Clasificación	14
2.2.3 Síntomas y Diagnóstico	15
2.2.4 Complicaciones	16
2.3 Diabetes Tipo 2	17
2.3.1 Generalidades	17
2.3.2 Factores de Riesgo	17
2.4 Diabetes tipo MODY	18
2.5 Factor Nuclear de Hepatocito 4 α (HNF-4 α)	19
2.5.1 Factor de Transcripción HNF-4 α	19
2.5.2 Variante T130I	24
3. Hipótesis	26
4. Objetivos	27
5. Material y Métodos	28
5.1 Diseño experimental	28
5.1.1 Población Evaluada	28
5.1.2 Medidas Antropométricas	28

	Pág.
5.2 Determinaciones Bioquímicas	29
5.2.1 Determinación de Glucosa	30
5.2.2 Determinación de Triglicéridos	30
5.2.3 Determinación de Colesterol	31
5.3 Determinación de Hormonas	32
5.3.1 Determinación de Insulina	32
5.3.2 Determinación de Péptido C	33
5.4 Estudios Moleculares	34
5.4.1 Extracción de DNA	34
5.4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	35
5.4.3 Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP)	36
5.4.4 Análisis estadístico	36
6. Resultados	37
6.1 Controles sanos y Diabéticos	37
6.2 Evaluación del SNP T130I	38
7. Discusión	43
8. Conclusiones	47
9. Bibliografía	48
10. Apéndices	55
Apéndice A: Carta de consentimiento informado	55
Apéndice B: Cuestionario de información adicional	56
Apéndice C: Preparación de reactivos	57
Apéndice D: Electroforesis	60

RESUMEN

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica y degenerativa caracterizada por hiperglucemia causada por una falla en la secreción y/o acción de la insulina. El tipo de diabetes más frecuente es la Diabetes Mellitus tipo 2, representando del 90-95% de los casos diagnosticados. La Diabetes Mellitus tipo 2 es una enfermedad multifactorial y poligénica que ha sido estudiada en diferentes poblaciones. Para entender mejor la enfermedad se han realizado gran cantidad de estudios moleculares entre los que destacan la evaluación de varios genes candidatos que pudieran estar involucrados en el desarrollo de la diabetes.

Uno de los genes estudiados es el gen *HNF4α* que codifica para el Factor Nuclear de Hepatocito 4α (HNF-4α), que participa en la regulación de la secreción de la insulina. Algunas mutaciones en este gen causan Diabetes tipo MODY 1 y otras Diabetes Mellitus tipo 2; entre las variantes de susceptibilidad a desarrollo de diabetes tipo 2 se encuentra la variante T130I. La variante T130I se ha encontrado en sujetos diabéticos con una frecuencia de 4.7% en Dinamarca y 3.5% en Japón. En un estudio previo realizado en población mexicana se encontró la variante T130I con una frecuencia de 16% en diabéticos tipo 2 de inicio temprano y 8% en población sana, dado la alta frecuencia encontrada se sugiere que la variante T130I pudiera ser parte del fondo diabetogénico de esta población.

En el presente trabajo se determinó la frecuencia del SNP T130I en diabéticos de inicio tardío, en población mexicana, se analizaron los parámetros bioquímicos y se relacionaron con la presencia del SNP T130I en el desarrollo de diabetes de inicio tardío. Para este trabajo se estudiaron 100 sujetos diabéticos de inicio tardío y 100 sujetos sanos. Después de firmar una carta de consentimiento informado, se les tomó una muestra de sangre periférica y se determinaron sus medidas antropométricas.

Se determinó la concentración de glucosa, colesterol y triglicéridos por métodos estándar, y de insulina y péptido C mediante radioinmunoanálisis. Se realizó la extracción de DNA y para determinar la frecuencia del SNP T130I se amplificó el exón 4 del gen *HNF4α* mediante PCR y posteriormente se generaron fragmentos de restricción utilizando la enzima Sfu I.

El SNP T130I se encontró presente con una frecuencia de 13% en sujetos diabéticos, y con una frecuencia de 6% en sujetos no diabéticos; la elevada frecuencia con que se encontró el polimorfismo en sujetos diabéticos hace pensar que podría ser una variante de susceptibilidad a diabetes muy importante en población mexicana. La identificación temprana de este tipo de variantes es una herramienta valiosa que podría conducir a la prevención del desarrollo de diabetes y la mejora en el manejo terapéutico de los enfermos, reduciendo de esa forma el costo socioeconómico que implica la diabetes en nuestro país.

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes es una enfermedad que aqueja a más de 171 millones de personas en el mundo, su prevalencia ha ido aumentando y se espera que para el año 2030 haya aproximadamente 366 millones de diabéticos ^[1].

En México la prevalencia de diabetes es de 7.5%, siendo el Distrito Federal y los estados del norte los más afectados. Se estima que para el año 2025 la prevalencia aumente a 12.3% y ocupemos el séptimo lugar mundial en diabetes ^[2,3].

La diabetes es un serio problema de salud pública debido al costo socio-económico que sus complicaciones generan. En México, el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) estimó que el gasto por diabetes es de 317 millones de dólares anuales ^[4].

Pese a que la diabetes se conoce desde la antigüedad ^[5], aún no se han elucidado detalladamente los mecanismos involucrados en su patogénesis. Con el fin de entender su desarrollo se han analizado varios genes que podrían estar involucrados en el padecimiento; varios de estos genes codifican para proteínas que regulan la insulina y la homeostasis de la glucosa ^[6,7].

Entre los genes estudiados se encuentran los denominados genes MODY, causantes de un tipo específico de diabetes. La evaluación de estos genes ha contribuido al entendimiento de la enfermedad y se ha podido observar que algunas alteraciones en éstos, que por sí solas no causan MODY, contribuyen al desarrollo de la diabetes tipo 2; tal es el caso del gen *HNF4 α* ^[8,9].

2. ANTECEDENTES

2.1 GLUCOSA E INSULINA

2.1.1 TRANSPORTE Y HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA

La glucosa es la principal fuente de energía del organismo, para que ésta pueda ser utilizada debe ser internalizada a la célula. El transporte de glucosa al interior de las células del organismo es posible gracias a los transportadores de glucosa (GLUT) que existen en los diferentes tejidos; a la fecha, se han identificado 13 de ellos. Son tres los principales transportadores GLUT: GLUT 1, expresado principalmente en cerebro; GLUT 2, localizado en células β del páncreas, hepatocitos e intestino delgado; GLUT 4, ubicado en músculo esquelético, cardíaco y en tejido adiposo, siendo este último dependiente de la insulina ^[10, 11].

Una vez en el interior de la célula, la glucosa es metabolizada por la vía glucolítica para generar el ATP requerido para las diversas funciones del organismo.

La homeostasis de la glucosa se lleva a cabo por dos hormonas secretadas por el páncreas: el glucagon y la insulina. Cuando los niveles de glucosa son bajos, el glucagon es el encargado de normalizarlos, mientras que en un estado de hiperglicemia la hormona responsable de disminuir la concentración de glucosa es la insulina ^[12] (Figura 1).

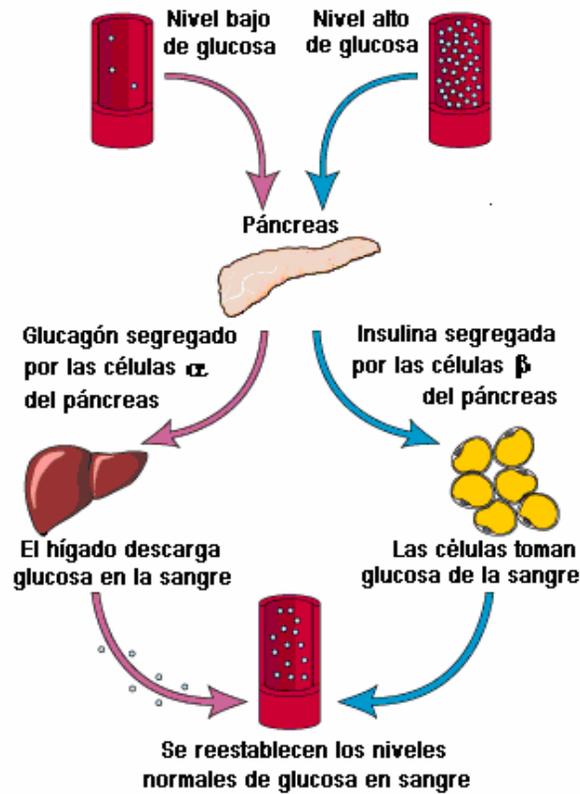


Figura 1. Homeostasis de la glucosa.

Tomada de <http://www.uned.es/.../guia/diabetes/prodinsu.htm>

2.1.2 INSULINA

La insulina es una hormona secretada por las células β del páncreas; es sintetizada como proinsulina (precursor inactivo), mediante un proceso proteolítico es producida la proinsulina, que es almacenada en las vesículas secretoras de la célula β . Cuando los niveles de glucosa aumentan se dispara la secreción de insulina, entonces la proinsulina es convertida en insulina activa ^[13] (Figura 2).

La insulina secretada permite la internalización de la glucosa a los tejidos muscular y adiposo mediante la translocación del transportador GLUT 4 (Figura 3), estimula la glucólisis, la síntesis de ácidos grasos, la formación de glucógeno y la síntesis de proteínas e inhibe la producción de glucosa hepática, la β -oxidación de ácidos grasos, la glucogenólisis y la proteólisis ^[12,13].

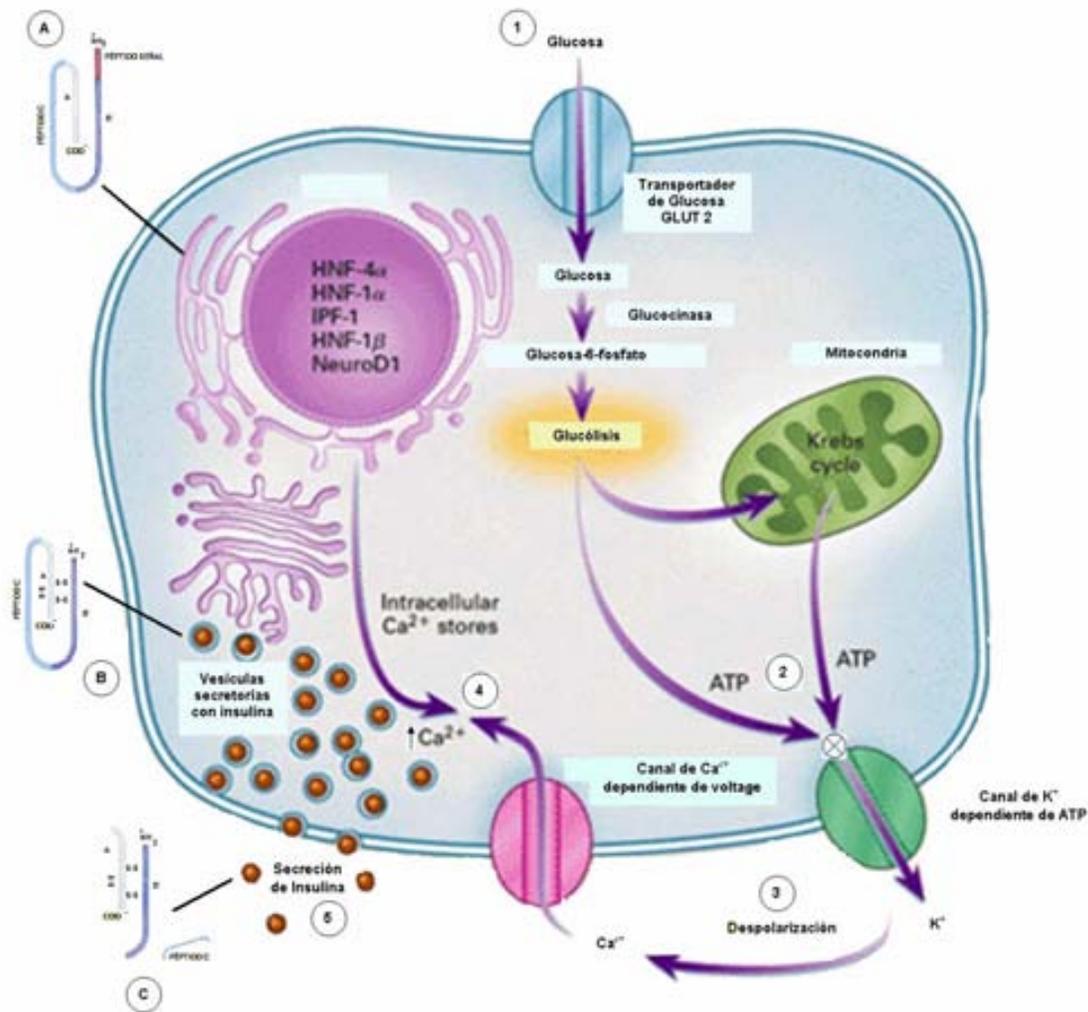


Figura 2. Síntesis y Secreción de Insulina. **A.** La insulina es sintetizada en el páncreas como un precursor de cadena simple (preproinsulina). **B.** Mediante un proceso proteolítico se retira el péptido señal formándose tres puentes disulfuro y dando así origen a la proinsulina, que será almacenada en vesículas secretorias. **C.** Cuando los niveles de glucosa aumentan, la proinsulina es convertida a insulina activa mediante el corte proteolítico del péptido C. 1. Los niveles de glucosa aumentan y entonces ésta es internalizada a la célula. 2. Al activarse su metabolismo se produce ATP. 3. La membrana se despolariza debido al cierre del canal de K^+ dependiente de ATP. 4. Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje se abren y aumenta la concentración intracelular de Ca^{2+} . 5. Las vesículas secretorias migran a la membrana celular y la Insulina es secretada. [12,13]

Tomada y modificada de D. Nelson, M.M Cox. Lehninger Principles of Biochemistry. 4ª ed. Worth Publishers Inc. New York. 2000. pág.582. [12]

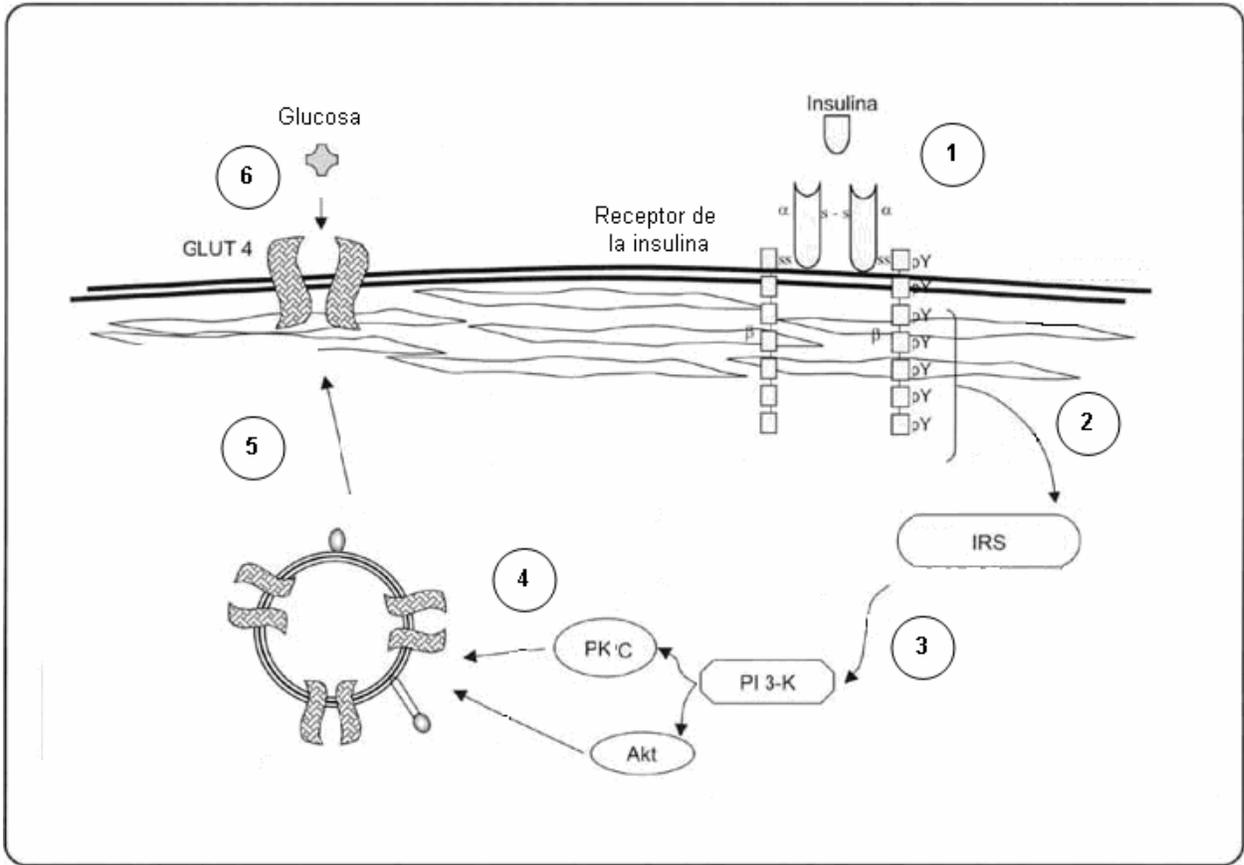


Figura 3. Esquema de la translocación del transportador de glucosa GLUT 4. 1. La unión de la insulina con su receptor induce un cambio conformacional en éste, que estimula la actividad de tirosin-cinasa. 2. El receptor activado se autofosforila y, a su vez, fosforila varias proteínas en secuencia. 3. La fosforilación de IRS, a su vez, activa a la PI-3 cinasa. 4. Son activadas la PKC y la PKB/Akt. 5. Las vesículas transportadoras de GLUT 4 son translocadas a la membrana plasmática. 6. Una vez en la membrana plasmática, el GLUT 4 permite el ingreso de glucosa a la célula. ^[13]

Tomada y modificada de:
Cruz M, Velasco E, Kumate J. Señales intracelulares que intervienen en el control de la glucosa. *Gac Méd Méx.*2001.137 (2): 136-146. [13]

2.2 DIABETES MELLITUS

2.2.1 DEFINICIÓN

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica caracterizada por hiperglicemia crónica causada por una falla en la secreción y/o acción de la insulina ^[14].

2.2.2 CLASIFICACIÓN

La diabetes es una enfermedad heterogénea, por lo que se observan diferentes formas de ésta. Así, la diabetes se ha clasificado en:

- **Diabetes Mellitus Tipo 1.-** Denominada diabetes insulino dependiente debido a que quienes la padecen requieren de la administración de insulina para sobrevivir. Este tipo de diabetes se debe a una deficiencia absoluta en la secreción de insulina, y es el resultado de una destrucción autoinmune de las células β del páncreas. Existe una forma de diabetes tipo 1 que no es mediada por procesos autoinmunes y es denominada diabetes idiopática ^[14].
- **Diabetes Mellitus Tipo 2.-** También llamada diabetes no insulino dependiente ya que estos pacientes no dependen del uso de la insulina; sin embargo, en cierta fase de la enfermedad, algunos pacientes son tratados con ella ^[15]. Estos pacientes cursan con resistencia a la insulina y generalmente tienen una ligera deficiencia de ésta ^[14].
- **Diabetes Gestacional.-** Es definida como cualquier grado de intolerancia a la glucosa que se presenta al inicio o durante el embarazo, se ocasiona por un incremento de la resistencia a la insulina que se presenta normalmente en este estado ^[14].

- **Otros tipos específicos de diabetes.**- Aquí se encuentran agrupadas varias causas que generan diabetes mellitus, entre las que se encuentran los defectos genéticos de la célula β , enfermedades del páncreas exócrino, endocrinopatías y defectos genéticos de la acción de la insulina que generan el desarrollo de diabetes mellitus. Cabe mencionar que los defectos genéticos de la célula β se refieren a un tipo muy particular de diabetes, por ejemplo la diabetes tipo MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) ^[14].

2.2.3 SÍNTOMAS Y DIAGNÓSTICO

Los síntomas clínicos de la diabetes son consecuencia de la falta de insulina y su pérdida de acción en hígado, músculo y tejido adiposo. El aumento en la producción hepática de glucosa y la disminución en su consumo por las células dan como resultado un estado de hiperglicemia que originará las complicaciones y los síntomas clásicos de la diabetes ^[16] (Figura 4).

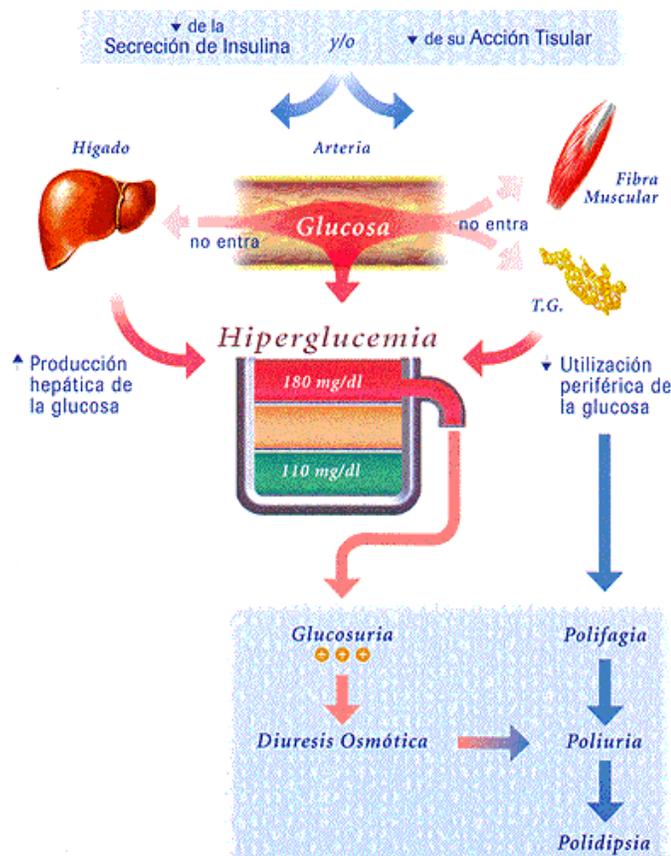


Figura 4. Explicación esquemática de la sintomatología de la DM.

Tomada de <http://www.accu-chck.es/>

Los síntomas clásicos de la diabetes son: polifagia (hambre constante), glucosuria (glucosa en la orina), poliuria (producción excesiva de orina), polidipsia (sed excesiva), pérdida de peso y visión borrosa; todos ellos son ocasionados por la alteración en la homeostasis de la glucosa^[16].

Los criterios utilizados, según la ADA (American Diabetes Association), para el diagnóstico de diabetes mellitus son los siguientes^[14]:

- ✓ Presencia de síntomas clásicos de diabetes aunado a una elevación casual de la concentración plasmática de glucosa ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L)

ó

- ✓ Glucosa en ayunas ≥ 126 mg/dL (7.0 mmol/L)

ó

- ✓ Glucosa ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L) 2 hrs. después de ingerir una carga de glucosa (75 g), durante una Curva de Tolerancia a la Glucosa.

2.2.4 COMPLICACIONES

La hiperglicemia crónica da lugar a una serie de complicaciones como son: la retinopatía con pérdida potencial de visión; nefropatía que conlleva a la falla renal; neuropatía que conduce al riesgo de úlcera en el pie, amputaciones, problemas gastrointestinales y disfunción sexual. La glucosilación de proteínas, así como el exceso en la producción de sorbitol son los principales mecanismos que dan origen a estas complicaciones^[14,16].

2.3 DIABETES TIPO 2

2.3.1 GENERALIDADES

La diabetes tipo 2 es una enfermedad multifactorial, causada por la combinación de una baja secreción de insulina y resistencia a la acción de la misma ^[6].

Este tipo de diabetes se denominaba también diabetes del adulto porque se presentaba en la cuarta década de vida; sin embargo, en la actualidad, se ha visto una disminución en la edad de aparición de la enfermedad, por lo que la diabetes tipo 2 se ha subdividido en diabetes tipo 2 de inicio temprano (<40 años) y diabetes tipo 2 de inicio tardío (≥ 40 años) ^[17,18].

La diabetes tipo 2 es la forma más común de diabetes, representa aproximadamente el 90-95% de los casos diagnosticados ^[19].

Los individuos que cursan con este tipo de enfermedad presentan resistencia a la insulina y generalmente una ligera disminución en la secreción de esta hormona; no necesitan insulina exógena para su sobrevivencia, sin embargo en algún momento de la enfermedad son tratados con ella. La mayoría de estos pacientes son obesos o tienen un alto porcentaje de grasa corporal distribuida principalmente en la región abdominal ^[8,14].

2.3.2 FACTORES DE RIESGO

La diabetes mellitus tipo 2 es un desorden heterogéneo que presenta un componente de susceptibilidad genética y un factor ambiental desencadenante. Entre los factores genéticos se encuentran la variabilidad genética entre grupos étnicos, la presencia de uno o más polimorfismos de susceptibilidad en diferentes genes, y la historia familiar de diabetes, y como factores ambientales podemos mencionar el sobrepeso, la obesidad abdominal, una dieta alta en carbohidratos, el estrés y la falta de actividad física ^[20,21].

La interacción de estos factores determina el riesgo de desarrollar diabetes. Los sujetos que tienen una predisposición genética no necesariamente desarrollarán la enfermedad, para que esto ocurra es necesario que también se expongan a los factores ambientales ya mencionados^[6,19].

2.4 DIABETES TIPO MODY

La diabetes tipo MODY, denominada así por sus siglas en inglés (Maturity Onset Diabetes of the Young), pertenece a un tipo específico de diabetes causada por un defecto genético en la célula β ^[14,22].

La diabetes tipo MODY es un desorden genéticamente heterogéneo, es una forma monogénica de diabetes caracterizada por un patrón de herencia autosómico dominante, una edad de aparición temprana (<25 años), ausencia de obesidad y un defecto primario en la secreción de insulina^[23].

Se han podido identificar seis genes responsables de esta forma de diabetes^[24] (Tabla 1).

MODY	Gen
MODY 1	<i>HNF-4α</i>
MODY 2	<i>GCK</i>
MODY3	<i>HNF-1α</i>
MODY 4	<i>IPF-1</i>
MODY5	<i>HNF-1β</i>
MODY6	<i>β2/NEURO D</i>

Tabla 1. Clasificación Molecular de síndromes MODY

Los genes MODY son expresados en las células β del páncreas y juegan un papel importante en el desarrollo y funcionamiento de las mismas; cinco de ellos son factores de transcripción (*HNF-4 α* , *HNF-1 α* , *IPF-1*, *HNF-1 β* , *β 2/NEURO D*) y uno es una enzima glucolítica (*GCK*)^[22,25].

La forma bien definida de herencia y la edad temprana de aparición en este tipo de diabetes ha permitido que se tengan varias familias multigeneracionales para el estudio de estos genes, lo que ha hecho que la diabetes MODY sea un buen modelo para estudiar la genética de la diabetes tipo 2; la investigación en estos genes ha permitido un mayor entendimiento de la diabetes tipo 2 y de los mecanismos de homeostasis de la glucosa ^[23].

2.5 FACTOR NUCLEAR DE HEPATOCITO 4 α (HNF-4 α)

2.5.1 FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN HNF 4 α

HNF-4 α es un factor de transcripción que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares de hormona esteroide/tiroidea y es codificado por el gen *HNF4 α* que se encuentra en el brazo largo del cromosoma 20 ^[26, 27].

El factor de transcripción HNF-4 α se expresa en hígado, intestino, riñón y páncreas endócrino^[28].

HNF-4 α tiene nueve isoformas ^[29] cuya expresión varía con el desarrollo, diferenciación y el tipo de tejido ^[30]; en el páncreas endócrino la isoforma predominante es HNF-4 α 7 ^[31].

El factor de transcripción HNF-4 α consta de seis dominios funcionales designados A, B, C, D, E y F ^[32] (Figura 5).

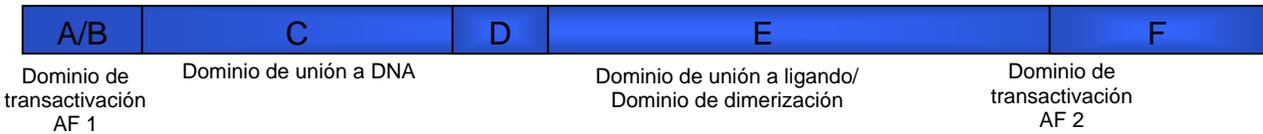


Figura 5. Presentación esquemática de los dominios funcionales de HNF-4 α ^[32]

El dominio A/B (aminoácidos 1-50) se encuentra en el extremo amino terminal y contiene una función de activación denominada AF1 que es independiente de ligando, esta región es altamente variable dentro de los receptores nucleares. Por el contrario, el dominio C (aminoácidos 51-116), o DBD por sus siglas en inglés (DNA Binding Domain), es un dominio de unión a DNA altamente conservado; está constituido por dos dedos de zinc responsables de la unión específica a sus genes diana ^[33]. El dominio D (aminoácidos 117-174) funciona como una unión flexible entre el dominio C y el dominio E, permitiendo diferentes rotaciones entre éstos cuando el receptor, en forma de dímero, se une al DNA. El dominio E (aminoácidos 175-370) es una región funcionalmente compleja ya que contiene el dominio de unión a ligando o LBD (Ligand Binding Domain), el dominio de dimerización, y la función transactivacional dependiente de ligando AF2 ^[32]. En un principio el receptor HNF4 α fue descrito como un receptor huérfano; pero recientemente se ha observado que los ácidos grasos endógenos se unen al dominio de unión a ligando ^[28,34]; éstos no actúan como ligandos clásicos, se cree que son requeridos para la estabilidad de la conformación de la proteína, y mediante esta unión se modula la actividad transcripcional de HNF4 α ^[35]. Por último, la función del dominio F (aminoácidos 371-465) aún no es muy clara. Sin embargo, se ha observado que inhibe la activación potencial transactivacional de HNF4 α por lo que se le ha denominado el dominio regulador negativo (NRD, Negative Regulatory Domain) ^[32].

El factor nuclear de hepatocito HNF-4 α regula la transcripción de un gran número de genes esenciales para el funcionamiento normal del hígado, intestino, riñón y células β del páncreas ^[28]. HNF4 α regula la expresión de genes involucrados en el transporte y metabolismo de varios nutrientes como glucosa, colesterol, ácidos grasos, y aminoácidos; y también de genes que codifican para proteínas séricas ^[36,37]. HNF4 α tiene un papel importante en el

metabolismo de los lípidos ya que es un regulador positivo de los genes que codifican para apo AI, apo B, apo CIII, apo AII y apo AIV [27,38].

HNF4 α ocupa una posición importante en una compleja red de factores de transcripción y se ha propuesto que la regulación génica que lleva a cabo es mediante una cascada de transcripción involucrando a HNF1 α ; este último regula la transcripción de genes como GLUT2, además se ha observado que HNF1 α es un componente esencial de una red transcripcional que mantiene el funcionamiento normal de la célula β [36, 39, 40] (Figura 6). HNF4 α también puede activar directamente la expresión del gen de insulina [41] y es requerido para la regulación de la secreción de insulina [42].

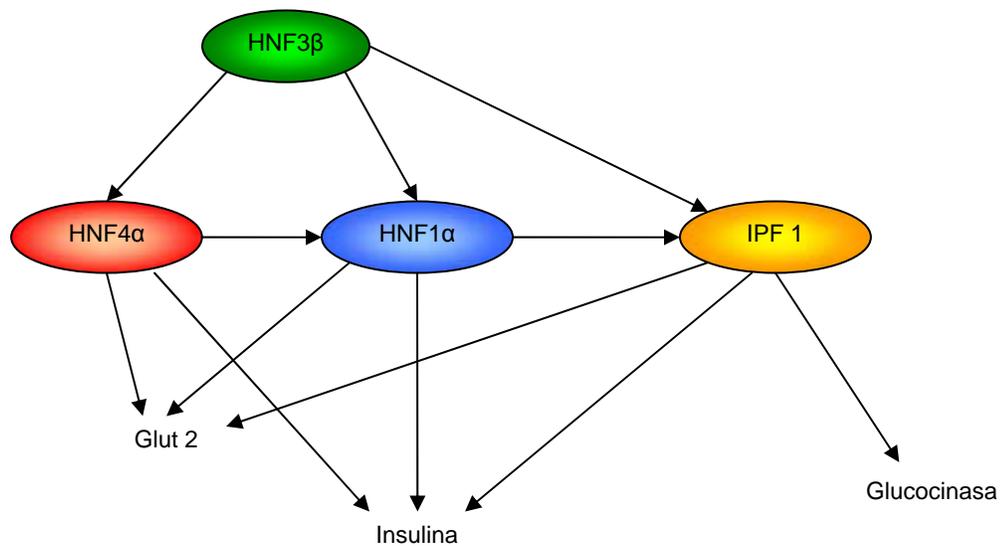


Figura 6. Red transcripcional en la célula β

El gen HNF4 α consta de 10 exones (el exón 1 tiene varias isoformas: 1A, 1B, 1C, 1D) [30], los cuales abarcan aproximadamente 30 Kb [43] y tiene dos regiones promotoras: P1, que contiene el exón 1A, y P2, que contiene el exón 1D [29, 30] (Figura 7).

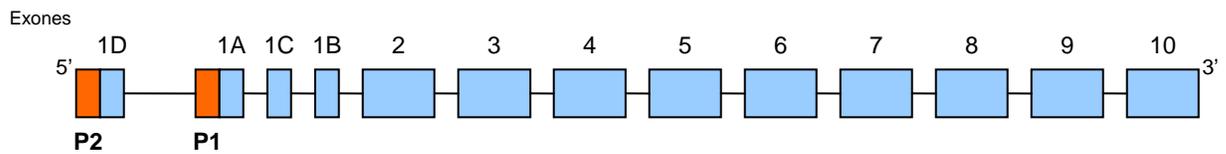


Figura 7. Estructura del gen *hnf4α*.

Existen nueve isoformas del gen *HNF-4α*, éstas son generadas por el uso selectivo de ambos promotores del gen y un procesamiento alternativo; en hígado y riñón adultos la transcripción de *hnf4α* inicia en el promotor P1 (isoformas $\alpha 1$ - $\alpha 6$) mientras que en el páncreas endócrino la transcripción es dirigida casi exclusivamente por el promotor P2 (isoformas $\alpha 7$ - $\alpha 9$)^[29,30].

Algunas mutaciones en este gen han sido asociadas al desarrollo de diabetes tipo MODY 1^[22] y otras a diabetes tipo 2 (Tabla 2). La primera asociación para el gen *HNF4α* fue descrita en 1991, cuando se encontró que la mutación Q268X en el exón 7 de este gen cosegregaba con la enfermedad^[38]. A partir de este estudio se comenzó la búsqueda de otras mutaciones en el gen *HNF4α* en distintas poblaciones^[44, 45, 46, 47]. A la fecha se han identificado más de veinte mutaciones en este gen en diferentes poblaciones^[48] (Tabla 2).

Tabla 2. Mutaciones encontradas en el gen *HNF-4a*.

EXÓN	MUTACIÓN	FENOTIPO	POBLACIÓN
2	F75fsdelT	MODY 1	Dinamarca ^[49]
3	K99fsdelAA	MODY 1	Suecia ^[38]
	G115S	Diabetes tipo 2	U.S y Canadá ^[50]
4	R154X	MODY 1	Alemania ^[51]
	R127W	MODY 1	Japón ^[43]
	V121I	MODY 1	Suiza ^[49] y Rep. Checa ^[52]
	D126H	Diabetes tipo 2	México ^[53]
	D126Y	Diabetes tipo 2	México ^[53]
	R154Q	Diabetes tipo 2	México ^[53]
	R125W	MODY 1	Rep. Checa ^[52]
	T130I	Diabetes tipo 2	Dinamarca ^[54] , Japón ^[55] , China ^[56] , U.S Indios Pima ^[57] , México ^[58]
5	V199I	MODY 1	Fam. Filipina ^[59]
7	Q268X	MODY 1	Alemania ^[22]
	V255M	Diabetes tipo 2	Dinamarca ^[60]
	E276Q	MODY 1	Fam. UK ^[46]
8	R323H	Diabetes tipo 2	Caucásicos ^[61]
9	V393I	Diabetes tipo 2	Francia ^[62]
10	I454V	Diabetes tipo 2	U.S y Canadá ^[50]

2.5.2 VARIANTE T130I

Los seres humanos compartimos el 99.9% de la secuencia del DNA y el 0.1% restante varía, las variaciones de secuencia más comunes son aquellas en las que se cambia un solo nucleótido y son llamadas SNP por sus siglas en inglés (Single Nucleotide Polymorphism) ^[63].

El SNP T130I es una mutación de sentido equivocado que se debe a una sustitución de citosina por timina en el exón 4 del gen *HNF4α* y que da como resultado el reemplazo de treonina (ACT) por isoleucina (ATT) en el codón 130 de la proteína, cerca del dominio de unión a DNA ^[55,56].

Estudios funcionales han demostrado que la presencia del SNP T130I afecta la actividad de HNF-4α. En Japón se demostró que la actividad transcripcional de T130I-HNF4α decreció 46.2% en células HepG2 y 27.9% en cultivo primario de hepatocitos de ratón ^[55]; mientras que en Dinamarca se demostró que el polimorfismo T130I decrece 76% la actividad transcripcional de HNF-4α en células COS7 ^[60].

La variante T130I ha podido identificarse en países como Finlandia (5/116 DM y 2/32 sanos) ^[64], China (frecuencia alélica 0.04±0.05) ^[56], Estados Unidos ^[57], Japón (3.5% DM y 0.8% sanos) ^[55] y Dinamarca (4.7% DM y 1.9%) ^[54]. En algunas de estas poblaciones, como la danesa y japonesa, su presencia se ha asociado al desarrollo de diabetes tipo 2 (OR 1.26 y 4.3 respectivamente) ^[55,60].

En México se ha podido identificar el SNP T130I, en población mestiza, con una frecuencia del 16% en diabéticos tipo 2 de inicio temprano, y 8% en sujetos sanos. Esta variante también se está evaluando en diferentes poblaciones indígenas de México y estudios preliminares mostraron que el polimorfismo está presente con una frecuencia del 13% en población Teenek y 6% en Mazahuas ^[58].

Los cambios de secuencia en diferentes genes y la frecuencia con que se presentan éstos son propios de cada población, de ahí la importancia de estudiar la genética de la población mexicana con diabetes para tener un mayor conocimiento de cómo afecta esta enfermedad a nuestra población y así poder tener las bases para un mejor manejo terapéutico del paciente diabético en nuestro país.

3. HIPÓTESIS

- ✚ Debido a que en México se ha encontrado el SNP T130I en sujetos diabéticos de inicio temprano con una frecuencia mayor a la reportada en otras poblaciones del mundo, se sugiere que esta variante puede ser parte del fondo diabetogénico de esta población, por lo que es de esperar que se encuentre también en sujetos diabéticos de inicio tardío.

- ✚ Debido a la asociación de la variante T130I con la diabetes mellitus, se espera que la variante T130I se encuentre con mayor frecuencia en pacientes diabéticos que en sujetos sanos.

4. OBJETIVOS

- ✚ Determinar la frecuencia del SNP T130I del gen *HNF4a* en pacientes con diabetes de inicio tardío en población mexicana y comparar con sujetos no diabéticos.

- ✚ Relacionar los valores de los parámetros bioquímicos con la presencia del SNP T130I en el desarrollo de diabetes de inicio tardío.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1.1 Población Evaluada

Se evaluaron 100 pacientes diabéticos de inicio tardío (pacientes del la Clínica de Diabetes del Hospital Juárez de México) y 100 sujetos no diabéticos (sujetos de la zona norte del Distrito Federal, utilizados como control).

Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- Sujetos Diabéticos: edad al diagnóstico ≥ 40 años, sin obesidad y sin parentesco.
- Sujetos no diabéticos: edad ≥ 50 años, sin obesidad, sin antecedentes heredofamiliares de diabetes, y sin parentesco.

Ambos grupos fueron descendientes de padres y abuelos mexicanos.

5.1.2 Medidas Antropométricas

Se tomaron las medidas antropométricas de cada voluntario para determinar el Índice de Masa Corporal ($IMC = Kg/m^2$) y se clasificó de acuerdo a la tabla 3 ^[65].

IMC (Kg/m^2)	Estado Físico
<18.5	Bajo peso
18.5 -24.9	Normal
25 – 29.9	Sobrepeso
≥ 30	Obesidad

Tabla 3. Criterios de diagnóstico de obesidad (OMS)

Para evaluar la acumulación de grasa abdominal se midió la circunferencia de la cintura y la circunferencia de la cadera en centímetros; con estos datos se calculó el Índice Cintura Cadera ($ICC = \text{cintura (cm)} / \text{cadera (cm)}$) que se utilizó con los siguientes puntos de corte: $ICC \leq 0.90$ en hombres y ≤ 0.85 en mujeres ^[66].

La información relacionada con el estilo de vida y antecedentes heredofamiliares de diabetes, y en el caso de diabéticos también edad al diagnóstico, se obtuvo mediante la aplicación de un cuestionario (Apéndice B). Los datos sobre las complicaciones diabéticas y tipo de tratamiento administrado a los sujetos diabéticos se obtuvieron de los expedientes clínicos.

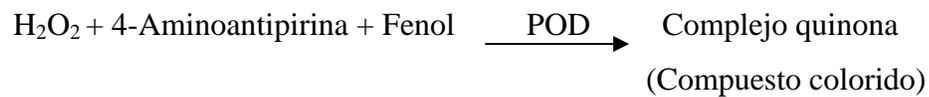
Después de firmar la carta de consentimiento informado (Apéndice A), aceptando participar en el estudio, a cada voluntario se le tomó una muestra de 20 mL de sangre periférica. La muestra se alicuotó en dos tubos; uno con anticoagulante (200 μ L de EDTA 0.5 M pH 8), para extracción de DNA, y otro sin anticoagulante para realizar determinaciones séricas.

5.2 DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

Se determinó la concentración de glucosa, colesterol y triglicéridos en suero mediante el uso de estuches comerciales (LINCON, Stanbio Laboratory. Texas, USA) que utilizan métodos enzimático-colorimétricos basados en la formación de un producto colorido (rosa) cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración del analito en estudio. Para determinar la concentración del analito de interés se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 500 nm. Se realizó la evaluación de la calidad de los análisis para cada analito utilizando un suero control nivel alto y un suero control nivel bajo (Wiener Laboratory. Buenos Aires, Argentina)

5.2.1 Determinación de Glucosa

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



Rango normal 70 – 100 mg/dL

5.2.2 Determinación de Triacilgliceroles.

- En una primera etapa, por la acción de la lipasa sobre los triacilgliceroles, se forman glicerol y ácidos grasos
- El glicerol se fosforila por el adenosina-5'-trifosfato (ATP) para producir glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosin-5'-difosfato (ADP) en una reacción catalizada por la cinasa de glicerol (GK).



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



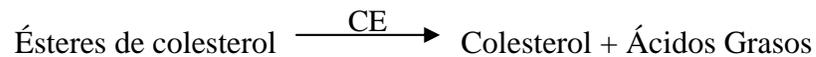
- El peróxido reacciona con 4-aminoantipirina y 4-clorofenol bajo la influencia catalítica de la peroxidasa (POD) para formar una quinoneimina de color rojo.



Rango normal 30 – 150 mg/dL

5.2.3 Determinación de Colesterol

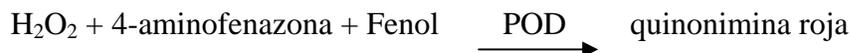
- El método se basa en la capacidad de la Colesterol Esterasa (CE) para hidrolizar los ésteres de colesterol, produciendo colesterol libre y ácidos grasos.



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



- El peróxido de hidrógeno reacciona con 4-aminofenazona y fenol (contenido en el buffer), en presencia de la Peroxidasa (POD) para formar una quinonimina de color rojo. La intensidad del color rojo final es proporcional a la concentración total de colesterol.



Rango normal 140-200 mg/dL

5.3 DETERMINACIÓN DE HORMONAS

Para realizar la determinación cuantitativa de insulina y péptido C en suero se utilizaron estuches comerciales de radioinmunoensayo, Insulin Coat-A-Count (Diagnostic Products Corporation, LA, California, USA.) e Insulin Peptide C RIA (Diagnostic Systems Laboratories, Inc. Texas, USA.) respectivamente.

5.3.1 Determinación de Insulina

El procedimiento para la cuantificación de insulina (Coat-A-Coun) es un radioinmunoensayo (RIA) de fase sólida, donde la insulina marcada con ^{125}I compete durante un tiempo fijo con la insulina de la muestra del paciente por los sitios de unión al anticuerpo específico para la insulina. Debido a que el anticuerpo está inmovilizado en la pared de un tubo de polipropileno, la simple decantación del sobrenadante es suficiente para terminar la competencia y aislar la

fracción de anticuerpo unido de insulina marcada con el isótopo. La lectura del tubo, en un contador gamma, proporciona una medida de la insulina presente en la muestra del paciente.

Rango Normal: 5-25 mUI/mL

5.3.2 Determinación de Péptido C

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

Rango Normal: 1.1 – 3.2 ng/mL

5.4 ESTUDIOS MOLECULARES

5.4.1 Extracción de DNA

La técnica se llevó a cabo en dos partes y se utilizaron 10 mL de sangre total para extraer DNA de los leucocitos:

1ª Parte

1. La sangre se mezcló suavemente, por inversión, y se colocó en hielo.
2. Se adicionaron 25 mL de solución Sacarosa-Tritón 2X fría.
3. Se completó un volumen final de 50 mL con agua desionizada y estéril. Se mezcló suavemente por inversión y se incubó 10 min en hielo (mezclando de vez en cuando).
4. Posteriormente se centrifugó a 2000 rpm durante 15min a 4°C. (Centrífuga refrigerada Sorvall RT7)
5. Se decantó el sobrenadante, y se lavó el botón que quedó con 5 mL de solución Sacarosa-Tritón 1X fría.
6. Se centrifugó, de nuevo, a 2000 rpm durante 15min a 4°C.
7. Se decantó el sobrenadante y se observó un pellet rosado, el cual se resuspendió en 3 mL de Solución de Lisis Nuclear, 216 µl de SDS al 10% (Amresco) y 100µL de Proteinasa K al 0.05% (Gibco).
8. Se incubó en Baño María a 37°C con agitación suave toda la noche (Incubadora BT23, American Scientific Products).

2ª Parte

9. La muestra se transfirió toda a tubos cónicos estériles de 15 mL.
10. Se agregó 1 mL de NaCl saturado y se agitó vigorosamente.
11. Se centrifugó a 2000rpm durante 15min a 4 °C.
12. El sobrenadante fue transferido a otro tubo cónico de 15 mL y se desechó el botón.

13. Se agregaron 2 volúmenes de ETOH absoluto frío (aprox. 8 mL) y se mezcló suavemente por inversión (se puede observar la hebra de DNA).
14. El DNA precipitado se retiró con una pipeta pasteur sellada de la punta y se lavó con ETOH al 70%.
15. Posteriormente se dejó a temperatura ambiente por 30 min. y se depositó en aprox. 200µL de amortiguador TE.
16. Finalmente, el DNA se cuantificó espectrofotométricamente (Espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS lambda 20) haciendo una dilución 1:200 y leyéndose la relación 260/280 nm para conocer la concentración y pureza de la muestra (*las preparaciones puras tienen valores de 1.7–2.0*).

5.4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Para amplificar el exón 4 del gen *HNF4α* se utilizó la técnica de PCR con oligonucleótidos específicos.

La mezcla de reacción para cada muestra fue la siguiente:

Solución dNTP 1mM	3.0µL
Buffer 10X	5.0µL
Oligo 5' 20µM(CCACCCCCTACTCCATCCCTGT)	3.0µL
Oligo 3' 20µM (CCCTCCCGTCAGCTGCTCCA)	3.0 µL
Taq polimerasa (Roche)	1.0µL
Agua desionizada	31.5µL
DMSO	2.0 µL

La reacción se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler gradient eppendorf. Las condiciones de reacción fueron:

1. Desnaturalización 95°C por 3min.
2. 30 ciclos de:
 - Desnaturalización 95°C 30 seg
 - Alineamiento 68°C 30 seg.
 - Polimerización 72°C 30 seg.
3. Extensión final de 72°C durante 10 min.

Para verificar que la reacción se haya llevado a cabo correctamente y se haya amplificado el segmento de DNA deseado, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 1X, teñido con bromuro de etidio, utilizando una escalera de DNA de 100 pb para verificar su tamaño (271 pb). El gel se observó en un transiluminador UV.

5.4.3 Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP)

El polimorfismo T130I genera un sitio de restricción para la enzima Sfu I produciendo dos fragmentos, uno de 81pb y otro de 190 pb.

Para detectar la presencia del SNP T130I por RFLP se hicieron reaccionar 4µL del producto de PCR con 0.3µL de la enzima Sfu I (Roche, Alemania) durante 24 hrs a 37 °C. Finalmente, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 3% para observar el corte. De esta manera, al observar el corte en el gel de agarosa, los sujetos que no presenten el SNP T130I mostrarán una banda de 271pb mientras que los sujetos homocigotos para la mutación mostrarán una banda de 81pb y otra de 190pb, y los heterocigotos mostrarán una banda de 271pb, una de 81pb y otra de 190pb.

5.4.4 Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó utilizando los programas GraphPad Prism versión 4 para Windows (San Diego CA. USA) y SPSS versión 10.0 (Chicago, Illinois).

6. RESULTADOS

6.1 CONTROLES SANOS Y PACIENTES DIABÉTICOS

La edad promedio de las personas estudiadas fue de 59 y 58 años de edad, para sujetos no diabéticos y sujetos diabéticos respectivamente. El IMC promedio de los sujetos no diabéticos fue de 26.14 Kg/m² y para los sujetos diabéticos fue de 28.29 Kg/m². Ambos grupos se encontraron en el rango de sobrepeso y mostraron valores de ICC por arriba del valor normal. Tanto sujetos diabéticos como no diabéticos tienen valores de triacilgliceroles superiores a los valores de referencia. Para los pacientes diabéticos, el valor promedio de glucosa fue de 190.6 mg/dL, lo que indica que no tienen un buen control glucémico (Tabla 4); así, observamos que el 60% de ellos tienen alguna complicación diabética, siendo la retinopatía la más frecuente (35.5%) (Figura 8).

Tabla 4. Parámetros antropométricos y bioquímicos en sujetos no diabéticos y sujetos diabéticos.

Parámetro	Sujetos no diabéticos	Sujetos diabéticos	P*
Edad en años	59 ± 9	58 ± 10	ns
IMC (< 25 Kg/m ²)	26.14 ± 3.43	28.29 ± 5.12	0.002*
ICC Mujeres (<0.85)	0.86 ± 0.05	0.89 ± 0.05	0.001*
ICC Hombres (<9.00)	0.93 ± 0.05	0.93 ± 0.04	ns
Glucosa (70–110 mg/dL)	93.91 ± 15.01	190.60 ± 88.59	< 0.001*
Colesterol (140-200 mg/dL)	198.00 ± 41.48	186.10 ± 40.49	0.04*
Triacilgliceroles (50-150 mg/dL)	152.40 ± 59.01	175.10 ± 88.45	ns
Insulina (5-25 mUI/mL)	6.91 ± 4.89	10.19 ± 12.18	ns
Péptido C (1.1-3.2 ng/mL)	2.16 ± 1.86	5.39 ± 3.56	< 0.001*

Los datos representan el promedio ± desviación estándar. * p ≤ 0.05 = diferencia significativa. ns= diferencia no significativa.

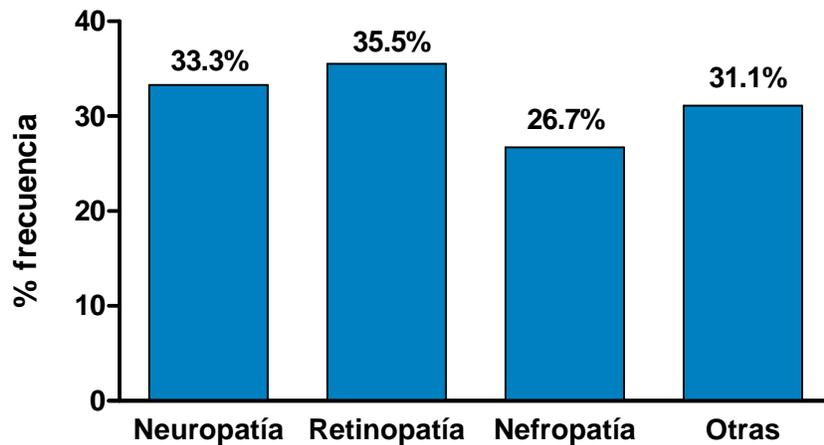


Figura 8. Frecuencia de complicaciones diabéticas en sujetos diabéticos tipo 2 de inicio tardío.

6.2 EVALUACIÓN DEL SNP T130I

Mediante la técnica de RFLP se encontró que el SNP T130I estuvo presente en 6 de 100 sujetos no diabéticos (6%) y en 13 de 100 sujetos diabéticos (13%) (Figura 9); estadísticamente hay evidencia sugestiva de asociación del SNP T130I a padecer diabetes ($p=0.09$; OR 2.34), se puede observar que la frecuencia del polimorfismo es mayor en el grupo de diabéticos que en el grupo de sujetos no diabéticos. Todos los portadores de la mutación fueron heterocigotos (Figura 10).

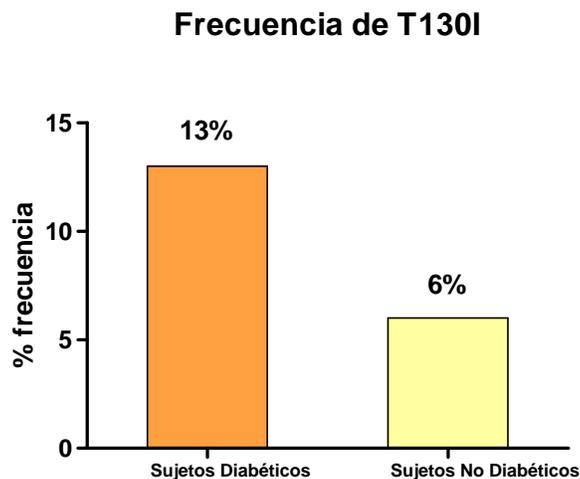


Figura 9. Frecuencia del SNP T130I.

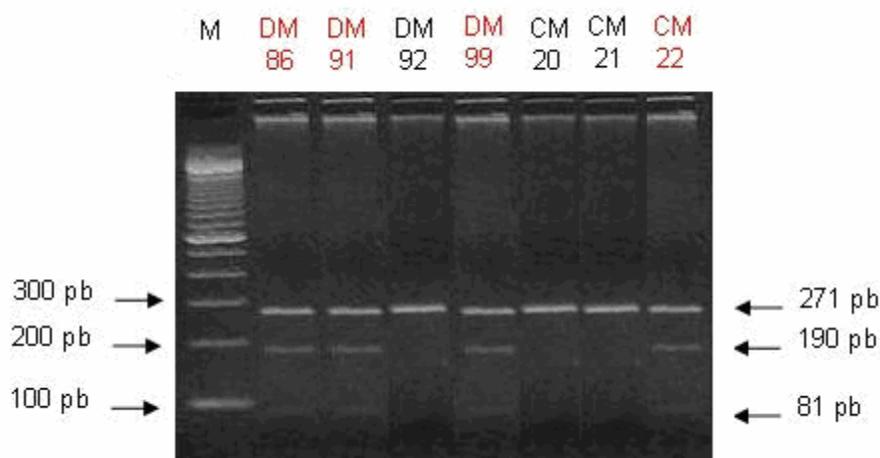


Figura 10. RFLP producido por la variante T130I en sujetos diabéticos y sujetos no diabéticos. Gel de agarosa 3%, 80 V, 30 min. M: Escalera de DNA de 100pb. DM: Diabéticos. CM: Controles no diabéticos

No hay diferencia en la edad al diagnóstico entre sujetos diabéticos portadores del SNP T130I y sujetos diabéticos no portadores del polimorfismo. Estadísticamente no se encontró diferencia significativa en los parámetros antropométricos y bioquímicos, a excepción del ICC en los hombres, éste fue mayor en hombres diabéticos portadores del SNP T130I ($p=0.01$) que en los no portadores (Figura 11).

En el grupo control se encontró diferencia significativa para el valor de triglicéridos ($p=0.05$), éste fue más alto en los portadores del SNP T130I que en los no portadores (Figura 12).

El comportamiento en los parámetros antropométricos, bioquímicos y hormonales de los portadores del polimorfismo fue diferente entre el grupo de diabéticos y el grupo control, a excepción de triacilgliceroles y colesterol (Figura 11, 12 y 13). En ambos grupos se observa una concentración mayor de triacilgliceroles y menor de colesterol en los portadores del SNP T130I que en los no portadores (Figura 12).

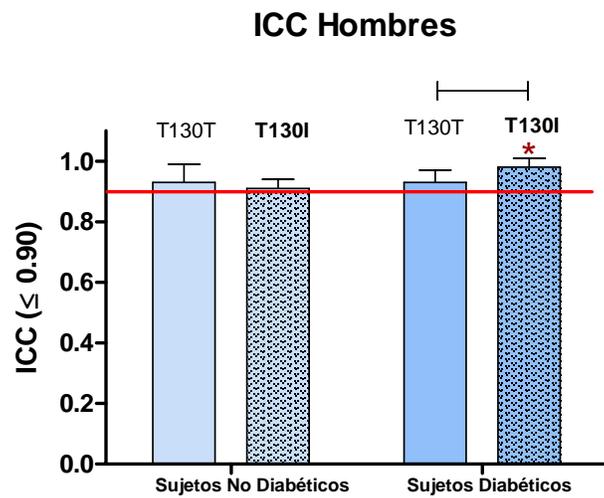
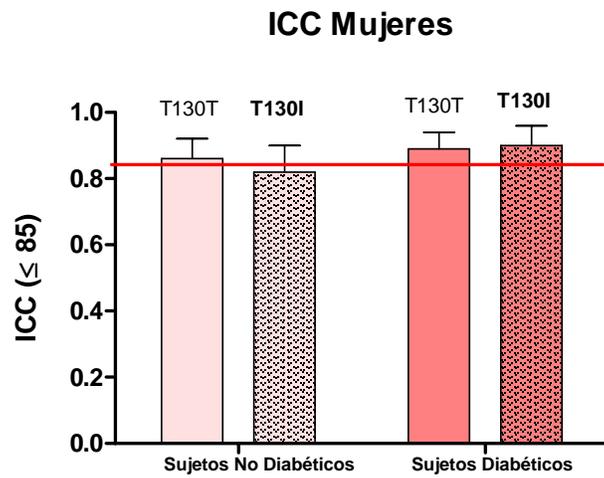
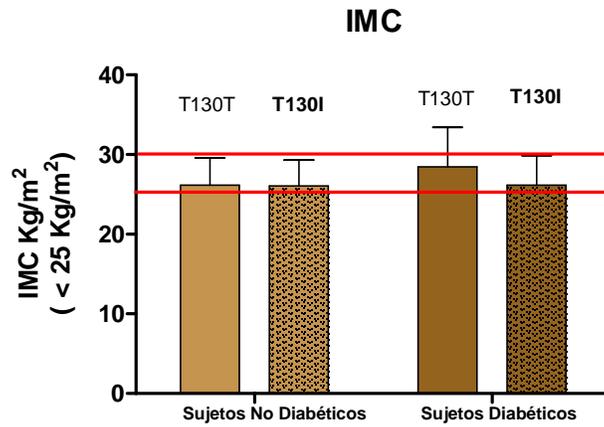


Figura 11. Comparación de parámetros antropométricos entre sujetos diabéticos y sujetos no diabéticos portadores y no portadores del SNP T130I. * = diferencia significativa.

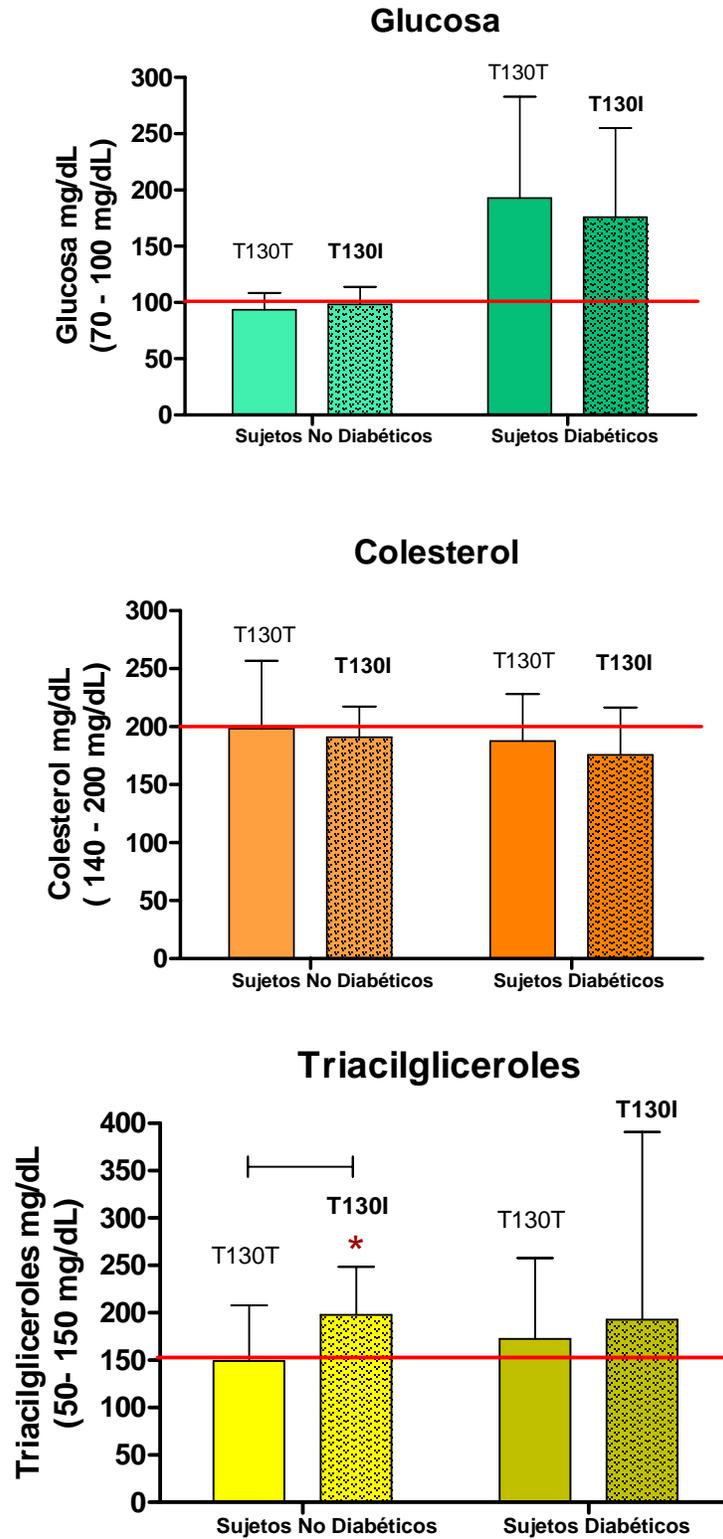


Figura 12. Comparación de parámetros bioquímicos entre sujetos diabéticos y sujetos no diabéticos portadores y no portadores del SNP T130I. * = diferencia significativa.

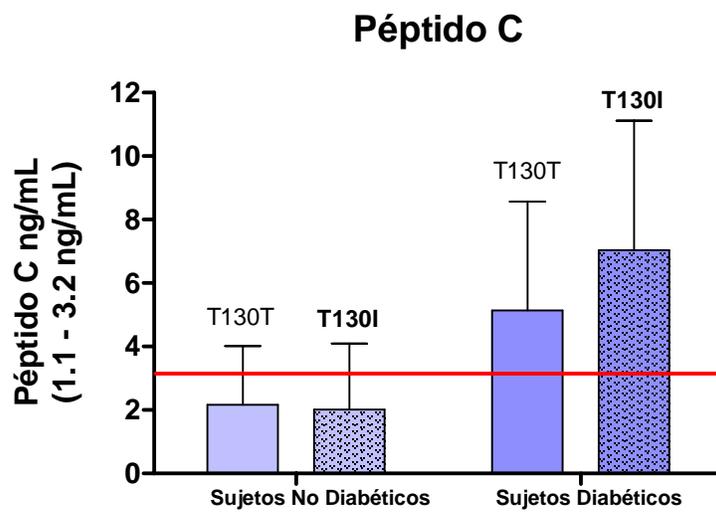
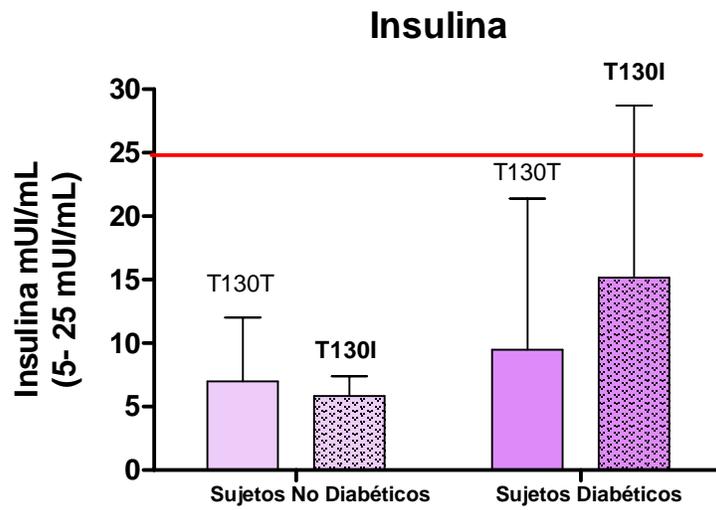


Figura 13. Comparación de parámetros hormonales entre sujetos diabéticos y sujetos no diabéticos portadores y no portadores del SNP T130I. * = diferencia significativa.

7. DISCUSIÓN

La diabetes es una enfermedad muy compleja en la que intervienen diversos factores para su desarrollo, entre los que destaca la obesidad ^[67]. En el presente trabajo, la determinación del IMC e ICC indica que ambos grupos estudiados tienen sobrepeso y tienden a acumular grasa en la zona abdominal; este dato corrobora lo presentado en la ENSA (Encuesta Nacional de Salud) ^[2], donde se indica que casi dos terceras partes de la población mexicana presenta sobrepeso u obesidad. La mayoría de los diabéticos tipo 2 presentan obesidad o tienen un gran porcentaje de grasa acumulada en la zona abdominal ^[14], esto confiere cierto grado de resistencia a la insulina; en respuesta, hay una secreción compensatoria de esta hormona que hace que aumenten sus niveles ^[68], de esta manera se ve que la concentración de insulina es mayor en sujetos diabéticos que en sujetos no diabéticos (tabla 4).

El 60% de los sujetos diabéticos presentaron alguna complicación diabética, estos pacientes no tenían un buen control glucémico. Estas complicaciones afectan la calidad de vida de los enfermos, generando costos adicionales al padecimiento y disminuyendo la productividad de los pacientes; todo esto hace que la diabetes se vuelva un problema socioeconómico para el país.

En este trabajo se encontró que la variante T130I se presenta con mayor frecuencia en los sujetos diabéticos (13%), lo cual también se ha observado en estudios realizados en otras poblaciones como la danesa donde el polimorfismo se reportó con una frecuencia de 4.7% en diabéticos y 1.9% en sujetos sanos ^[54]; mientras que en Japón, la frecuencia fue de 3.5% y 0.8% para diabéticos y no diabéticos respectivamente ^[55].

El polimorfismo T130I también se ha evaluado en pacientes diabéticos de inicio temprano, en población mexicana; un estudio previo a este trabajo mostró una frecuencia de 16% para sujetos diabéticos y 8% para sujetos no diabéticos ^[58]. La evaluación por RFLP de sujetos

diabéticos y no diabéticos, realizada en el presente trabajo, mostró que el polimorfismo T130I estuvo presente en el 13% de los sujetos diabéticos tardíos y en el 6% de los sujetos no diabéticos, sugiriendo que esta variante puede ser parte del fondo genético de población mexicana ya que su frecuencia es, hasta el momento, la más alta reportada en todo el mundo tanto para sujetos diabéticos como para sujetos no diabéticos.

Las concentraciones de insulina y péptido C en los portadores del SNP T130I, en el grupo control, tienen valores menores que los no portadores (Figura 13), esto indica que hay una disminución en la secreción de insulina y puede ser consecuencia de la presencia del polimorfismo. El SNP T130I se encuentra cerca del dominio de unión a DNA^[32,55], indicando que la transcripción de los genes que regula *HNF4α* pudiera ser alterada; algunos genes que se ven afectados son *HNF1α* e *INS*, necesarios para la secreción de insulina^[42]. En estudios de actividad biológica se ha demostrado que el polimorfismo T130I decrece 76% la actividad transcripcional de *hnf4α* en células COS7 y está asociado a una disminución en la función de la célula β, además de verse alterado el metabolismo de lípidos^[54].

La disminución en la secreción de insulina que tienen los sujetos no diabéticos portadores del SNP T130I hace que sus niveles de glucosa sean ligeramente mayores a los que presentan los no portadores, sin embargo, estos niveles no son tan altos como para sobrepasar el valor de referencia (100 mg/dL) (Figura 12). Los portadores del polimorfismo fueron heterocigotos, por lo que tal vez el daño podría estar compensado por el segundo alelo. El SNP T130I es un polimorfismo de susceptibilidad a diabetes mellitus y su sólo presencia no implica que se exprese el daño fenotípico, sino que el portador de este tiene más riesgo de desarrollar la enfermedad que aquella persona que no lo tiene.

En el estudio realizado en diabéticos tipo 2 de inicio temprano en población mexicana se observó que los portadores del SNP T130I tenían niveles de insulina y péptido C menores a los que presentaban los no portadores, evidenciando una vez más el defecto secretor de insulina que conlleva la presencia del polimorfismo^[58].

En el presente trabajo se observa un comportamiento diferente; los sujetos diabéticos portadores del SNP T130I presentaron concentraciones de insulina y péptido C mayores que los no portadores, sin embargo, esto no es consecuencia de la sola presencia del polimorfismo. Este comportamiento pudiera ser ocasionado por el tratamiento ya que el 61% de estos sujetos estaba siendo tratado con glibenclamida, la cual es una sulfonilurea que estimula al páncreas para secretar insulina.

Esta diferencia en la secreción de insulina entre sujetos diabéticos de inicio tardío y sujetos diabéticos de inicio temprano sugiere que la patogénesis de la diabetes tipo 2 de inicio tardío está dada por mecanismos distintos a los que ocurren en la diabetes tipo 2 de inicio temprano, lo que indica que pueden estar involucrados otros genes en el desarrollo de la enfermedad.

No todos los portadores del SNP T130I presentan diabetes; ésta es una enfermedad multifactorial ocasionada por alteraciones en más de un gen, y cada una de ellas contribuye al desarrollo de la enfermedad por lo que la diferencia entre desarrollar o no la enfermedad se debe a la participación conjunta de otras alteraciones o variaciones de secuencia de diferentes genes presentes en los pacientes diabéticos y que pueden no encontrarse en los sujetos no diabéticos, así como también influyen de manera importante los factores ambientales (como el estilo de vida) a los que se expongan estos individuos. ^[69,70]

Sin embargo, la frecuencia tan elevada con que se presenta el SNP T130I en los sujetos diabéticos estudiados indica que ésta puede ser una variante de susceptibilidad para el desarrollo de diabetes en población mexicana. La identificación de variantes de secuencia que generan susceptibilidad para el desarrollo de la enfermedad podría permitirnos, en un futuro, tener un diagnóstico preventivo de la diabetes y de esa manera evitar o retardar su aparición, logrando una reducción en la prevalencia de diabetes en nuestro país y con esto la disminución en el costo socioeconómico generado por esta enfermedad.

Por otro lado, es necesario implementar programas educativos que orienten a la población diabética y sana en cuanto a su estilo de vida (dieta baja en calorías y realización de alguna

actividad física), pues sólo así se reducirá la prevalencia, se retardará su aparición y en los casos en los que la enfermedad esté declarada se reducirán sus complicaciones.

8. CONCLUSIONES

- La frecuencia del SNP T130I en pacientes con diabetes de aparición tardía fue el doble que en sujetos no diabéticos, sugiriendo que este SNP genera susceptibilidad en el desarrollo de diabetes mellitus.

- El SNP T130I en el gen *HNF-4α* es una importante variante de susceptibilidad en el desarrollo de la diabetes en población mexicana, su detección temprana así como el análisis de otros SNP involucrados en la patogénesis de la enfermedad en nuestra población sería una herramienta valiosa para el diagnóstico, prevención o retardo de su aparición, y mejoramiento del manejo terapéutico en nuestro país.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Federación Internacional de la Diabetes. <http://www.idf.org>
2. Secretaría de Salud. **Encuesta Nacional de Salud 2000, tomo II: La salud de los adultos. Cap 6: Diabetes Mellitus.** México. pp: 93-103.
3. Landeros E.A. **El panorama epidemiológico de la diabetes mellitus.** *Revista Mexicana de Enfermería Cardiológica.* 2000; 8(4): 56-59.
4. Federación Mexicana de Diabetes. <http://www.fmdiabetes.com>
5. http://www.iqb.es/d_mellitus/historia
6. van Tilburg J, van Haeften TW, Pearson P, Wijmenga C. **Defining the genetic contribution of type 2 diabetes mellitus.** *Journal of Medical Genetics.* 2001; 38:569-578.
7. Kumar D.S, Elbein S. **The genetics basis of type 2 diabetes.** *Cell science.* 2006; 2(4): 100-131.
8. Rojas I, Novials A. **Bases Moleculares de la Diabetes Mellitus tipo 2: Estudio de genes candidatos para su desarrollo.** *Obesidad, Nutrición y Diabetes.* 2002; 1:34-49.
9. Winckler W, Graham R, de Bakker P, Sun M, et al. **Association testing of variants in the Hepatocyte Nuclear Factor 4 α gene with risk of type 2 diabetes.** *Diabetes.* 2005; 54:886-892.
10. Díaz Hernández D.P, Burgos Herrera L.C. **¿Cómo se transporta la glucosa a través de la membrana celular? .** *IATREIA.* 2002; 45(3):179-189.
11. Zhao Feng-Qi, Keating AF. **Functional properties and genomics of glucose transporters.** *Current Genomics.* 2007; 8: 113-128.
12. D. Nelson, M.M Cox. **Lehninger Principles of Biochemistry.** 4^a ed. Worth Publishers Inc. New York. 2000. pp. 582,795-797,887,902-906.
13. Cruz M, Velasco E, Kumate J. **Señales intracelulares que intervienen en el control de la glucosa.** *Gaceta Médica de México.* 2001; 137(2):135-146.

14. American Diabetes Association. **Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.** *Diabetes Care.* (2007); 30 (suppl 1): S42-S47.
15. Mateos S. C. N, Zacarías C. R. (2002). **Tratamiento farmacológico para la diabetes mellitus.** *Revista del Hospital General Dr. M Gea González.* 2002; 5 (1, 2):33-41.
16. Ortega Hernández L, Narváez Morales, Del Castillo Castilla L.A. **Principales Alteraciones de Homeostasis en la Diabetes Mellitus.** *DUAZA RY.* 2005; 2(2):159-165.
17. Cheng Dong. **Prevalence, predisposition and prevention of type II diabetes.** *Nutrition & Metabolism.* 2005; 2:29.
18. Rehman, H. U. **Diabetes mellitus in the young.** *Journal of the Royal Society of Medicine.* 2001; 94: 65-67.
19. Permutt M.A, Wasson J, Cox N. **Genetic epidemiology of diabetes.** *Journal of Clinical Investigation.* 2005; 115:1431-1439.
20. Iqbal, N. **The burden of type 2 diabetes: strategies to prevent or delay onset.** *Vascular Health and Risk Management.* 2007; 3 (4): 511-520.
21. Libman I. M, Arslanian S.A. **Prevention and treatment of type 2 diabetes in youth.** *Hormone Research.* 2007; 67: 22-34.
22. Winter WE. **Molecular and Biochemical Analysis of the MODY syndromes.** *Pediatric Diabetes.* 2000; 1:88-117.
23. Froguel Philippe, Velho Gilberto. **Molecular genetics of maturity-onset diabetes of the young.** *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 1999; 10(4):142-146.
24. Ellard S, Bellanné-Chantelot C, Hattersley A.T, et al. **Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the young.** *Diabetología.* 2008; 51:546-533.
25. Chakrabarti S, Mirmira R. **Transcription factors direct the development and function of pancreatic β cells.** *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 2003; 14(2):78-84.
26. Malecki M, Antonellis A, Casey P, Ji L, Wantman M, Warram J, Krolewski A. **Exclusion of the Hepatocyte Nuclear Factor 4 α as a Candidate gene for Late-Onset NIDDM Linked with chromosome 20q.** *Diabetes.* 1998; 47:970-972.
27. Shih D.Q, Dansky H.M, Fleisher M, Assmann G, Fajans S.S, Stoffel Markus. **Genotype/Phenotype relationships in HNF-4 α /MODY1. Haploinsufficiency is**

- associated with reduced apolipoprotein (AII), apolipoprotein (CIII), lipoprotein (a), and triglyceride levels. *Diabetes*. 2000; 49:832-837.
28. Lausen J, Thomas H, Lemm I, Bulman M, Borgschulze M, Lingott A, Hattersley A, Ryffel G. **Naturally occurring mutations in the human HNF4 α gene impair the function of the transcription factor to a varying degree.** *Nucleic Acids Research*. 2000; 28(2):430-437.
29. Ihara A, Yamagata K, Nammo T, Miura A, Yuan M, Tanaka T, Sladek F, Matsuzawa Y, Miyagawa J, Shimomura I. **Functional characterization of the HNF4 α isoform (HNF4 α 8) expressed in pancreatic β -cells.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005; 329:984-990.
30. Eeckhoutte J, Moerman E, Bouckennooghe T, Lukoviak B, et al. **Hepatocyte Nuclear Factor 4 α isoforms originated from the P1 promoter are expressed in human pancreatic β -cells and exhibit stronger transcriptional potentials than P2 promoter-driven isoforms.** *Endocrinology*. 2003; 144(5):1686-1694.
31. Mitchell S.M.S, Vaxillaire M, Thomas H, Parrizas M, Benmezroua Y, Costa A, Hansen T, et al. **Rare variants identified in the HNF-4 α β -cell-specific promoter and alternative exon 1 lack biological significance in maturity onset diabetes of the young and young onset type II diabetes.** *Diabetologia*. 2002; 45:1344-1348.
32. Hadzopoulou-Cladaras M, Kistanova E, Evagelopoulous C, Zeng S, Cladaras C, Ladas J. **Functional Domains of the Nuclear Receptor Hepatocyte Nuclear Factor 4.** *Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272(1):539-550.
33. Peng Lu, Jianguo Liu, Manana M, et al. **Crystallization of hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) in complex with the HNF1 α promoter element.** *Acta Crystallographic*. 2008; F64:313-317.
34. Dhe-Paganon S, Duda K, Iwamoto M, Chi Y, Shoelson S.E. **Cristal Structure of the HNF4 α Ligand Binding Domain in complex with endogenous fatty acid ligand.** *Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277(41):37973-37976.
35. Eeckhoutte J, Oxombre B, Formstecher P, Lefebvre P, Laine B. **Critical role of charged residues in helix 7 of the ligand binding domain in Hepatocyte Nuclear Factor 4 α dimerisation and transcriptional activity.** *Nucleic Acids Research*. 2003; 31(22):6640-6650.

36. Stoffel M, Duncan S.A. **The maturity-onset diabetes of the young (MODY) transcription factor HNF4 α regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1997; 94:13209-13214.
37. Hayhurst G. P, Lee Y, Lambert G, Ward J. M, González F. J. **Hepatocyte Nuclear Factor 4 α (Nuclear Receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis.** *Molecular and Cellular Biology.* 2001; 21(4):1393-1403.
38. Lehto M, Bitzén P.O, Isomaa B, Wipemo C, Wessman Y, Forsblom, Tuomi T, Taskinen M.R, Groop L. **Mutation in the HNF-4 α gene affects insulin secretion and triglyceride metabolism.** *Diabetes.* 1999; 48:423-425.
39. Wang H, Maechler P, Antinozzi P.A, Hagenfeldt K.A, Wollheim C.B. **Hepatocyte Nuclear Factor 4 α regulates the expression of pancreatic β -cell genes implicated in glucose metabolism and nutrient-induced insulin secretion.** *Journal of Biological Chemistry.* 2000; 275(46):35953-35959.
40. Boj S.F, Párrizas M, Maestro M.A, Ferrer J. **A transcription factor regulatory circuit in differentiated pancreatic cells.** *Developmental Biology.* 2001; 98(25):14481-14486.
41. Bartoov-Shifman R, Hertz R, Wang H, Wollheim C.B, Bar-Tanas J, Walker M.D. **Activation of the insulin gene promoter through a direct effect of Hepatocyte Nuclear Factor 4 α .** *Journal of Biological Chemistry.* 2002; 277(29):25914-25919.
42. Gupta R.K, Vatamaniuk M.Z, Lee C.S, Flaschen R.C, Fulmer J.T, Matschinsky F.M, Duncan S.A, Kaestner K.H. **The MODY gene HNF-4 α regulates selected genes involved in insulin secretion.** *Journal of Clinical Investigation.* 2005; 115(4):1006-1015.
43. Furuta H, Iwasaki N, Oda N, Hinokio Y, Horikawa Y, Yamagata K, et al. **Organization and Partial Sequence of the Hepatocyte Nuclear Factor-4 α /MODY1 gene and identification of a missense mutation, R127W, in a Japanese family with MODY.** *Diabetes.* 1997; 46:1652-1657.
44. Love-Gregory L, Wasson Jonathan, Ma Jiyan, Jin Carol H, Glaser B, Suarez B.K, Permutt M.A. **A common polymorphism in the upstream promoter region of the Hepatocyte Nuclear Factor-4 α gene on chromosome 20q is associated with type 2 diabetes and appears to contribute to the evidence for linkage in an Ashkenazi Jewish population.** *Diabetes.* 2004; 53:1134-1140.

45. Damcott C.M, Hoppman N, Ott S.H, Reinhart L.J, Wang J, Pollin T.I, O'Connell J.R, Mitchell B.D, Shuldiner A.R. **Polymorfisms in both promoters of Hepatocyte Nuclear Factor 4- α are associated with type 2 diabetes in the Amish.** *Diabetes*. 2004; 53:3337-3341.
46. Bulman M.P, Dronsfield M.J, Frayling T, Appleton M, Bain S.C, Ellard S, Hattersley A.T. **A missense mutation in the hepatocyte nuclear factor 4 alpha gene in a UK pedigree with maturity-onset diabetes of the young.** *Diabetologia*. 1997; 40:859-862.
47. Bagwell A, Bento J, Mychaleckyj J, Freedman B.I, Langefeld C, Bowden D.W. **Genetic analysis of HNF4A polymorphisms in Caucasian-American type 2 Diabetes.** *Diabetes*. 2005; 54:1185-1190.
48. Ellard S, Colclough K. Mutations in the genes encoding the Transcription Factors Hepatocyte Nuclear Factor 1 Alpha (*HNF1A*) and 4 Alpha (*HNF4A*) in Maturity Onset Diabetes of the Young. *Human Mutation*. 2006; 27 (9): 854-869.
49. Monney C.T, Kaltenrieder V, Cousin P, Bonny C, Schorderet D.F. Large Family with Maturity-Onset Diabetes of the Young and novel V121I in HNF4A. *Human Mutation*. 2002; 521.
50. Malecki M.T, Yang Y, Antonellis A, Curtis S, Warram J.H, Krolewski A.S. **Identification of new mutations in the hepatocyte nuclear factor 4 α gene families with early onset type 2 diabetes mellitus.** *Diabetic Medicine*. 1999; 16:193-200.
51. Linder T, Gragnoli C, Furuta H, Cockburn B.N, Petzold C, Rietzsch H, Weib Ulrike, Schulze J, Bell Graeme I. **Hepatic Function in a Family with a nonsense mutation (R154X) in the Hepatocyte Nuclear Factor-4 α /MODY1 gene.** *Journal of Clinical Investigation*. 1997; 100:1400-1405.
52. Pruhova S, Ek J, Lebl J, Sumnik Z, Saudek F, Andel M, Pedersen O, Hansen T. **Genetic epidemiology of MODY in the Czech republic : new mutations in the MODY genes HNF-4 α , GCK and HNF-1 α .** *Diabetologia*. 2003; 46:291-295.
53. Aguilar Salinas C.A, Reyes R.E, Ordoñez S Ma. L, Arellano T.M, et al. **Early-Onset Type 2 Diabetes: Metabolic and Genetic Characterization in the Mexican Population.** *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*. 2001; 86: 220-226.
54. Møller A.M, Urhammer S.A, Dalgaard L.T, Reneland R, Berglund L, Hansen T, Clausen J.O, Lithell H, Pedersen O. **Studies of genetic variability of the coding region of the**

- hepatocyte nuclear factor-4 α in Caucasians with maturity onset NIDDM.** *Diabetologia*. 1997; 40:980-983.
55. Zhu Q, Yamagata K, Miura A, Shihara N, Horikawa Y, Takeda J, Miyagawa J, Matsuzawa Y. **T130I mutation in *HNF-4 α* gene is a loss-of-function mutation in hepatocytes and is associated with late-onset Type 2 diabetes mellitus in Japanese subjects.** *Diabetologia*. 2003; 46: 567-573.
56. Rissanen J, Wang H, Miettinen R, Kärkkäinen P, et al. **Variants in the Hepatocyte Nuclear Factor-1 α and -4 α genes in Finnish and Chinese subjects with late-onset type 2 diabetes.** *Diabetes Care*. 2000; 23(10):1533-1538.
57. Muller Y, Infante Aniello, Hanson R, Love-Gregory L, Knowler W, Bogardus C, Bailer L. **Variants in Hepatocyte Nuclear Factor 4 α are modestly associated with type 2 diabetes in Pima Indians.** *Diabetes*. 2005; 54(10):3035-3039.
58. Menjivar M, Granados MA, Montufar I, Herrera M, Tusie-Luna MT, Canizales S, Aguilar CA, Ortiz-López MG. **High frequency of T130I mutation of HNF4A gene in Mexican patients with early-onset type 2 diabetes.** *Clinical Genetics*. 2008; 73 (2): 185-187.
59. Gragnoli C, Von Preussenthal G, Habener J. **Triple Genetic Variation in the *HNF-4 α* gene is associated with early-onset type 2 diabetes mellitus in a Philippino Family.** *Metabolism*. 2004; 53(8):959-963.
60. Ek J, Schack C, Packert D, Glümer C, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Pedersen O, Hansen T. **The functional Thr130Ile and Val255Met polymorphisms of the Hepatocyte Nuclear Factor-4 α (HNF4A): Gene associations with type 2 diabetes or altered β -cell function among Danes.** *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*. 2005; 90(5):3054-3059.
61. Price J.A, Fossey S.C, Sale M.M, Brewer C.S, Freedman B.I, Wuerth J.P, Bowden D.W. **Analysis of the *HNF4 α* gene in Caucasian type II diabetic nephropathic patients.** *Diabetologia*. 2000; 43:364-372.
62. Habi E.H, Suaud L, Bouth P, Chèvre J.C, Durand E, Philippi A, Demenais F, et al. **A missense mutation in Hepatocyte Nuclear Factor-4 α . Resulting in a reduced transactivation activity, in Human Late-onset non-insulin-dependent Diabetes Mellitus.** *Journal of Clinical Investigation*. 1998; 101(3):521-526.

63. Zeggini E. **A new era for type 2 diabetes genetics.** *Diabetic Medicine.* 2007; 24: 1181-1186.
64. Ghosh S, Watanabe R, Hauser E, Valle T, et al. **Type 2 diabetes: Evidence for linkage on chromosome 20 in 716 Finnish affected sib pairs.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1999; 46:2198-2203.
65. Zárate A, Basurto A. L, Saucedo G. R. P. **La obesidad: Conceptos actuales sobre fisiopatogenia y tratamiento.** *Revista de la Facultad de Medicina. UNAM.* 2001; 44(2):66-70.
66. World Health Organization. **Measuring Obesity: Classification and description of anthropometric data.** *Report on a WHO consultation on the epidemiology of obesity.* 1999; 21-23.
67. Cauchi S, Nead K.T, Choquet H, et al. **The genetic susceptibility to type 2 diabetes may be modulated by obesity status: implications for association studies.** *BMC Medical Genetics.* 2008; 9: 45–53.
68. Wilcox G. **Insulin and Insulin Resistance.** *Clinical Biochemistry Review.* 2005; 26:19-39.
69. McCarthy M, Menzel S. **The genetics of type 2 diabetes.** *Journal of Clinical Pharmacology.* 2001; 51: 195-199.
70. Dedoussis G, Kaliora A, Panagiotakos D. **Genes, diet and type 2 diabetes mellitus: A review.** *The Review of Diabetic Studies.* 2007; 4: 13-24.

APÉNDICE A:

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



HOSPITAL JUÁREZ DE MEXICO
DIVISION DE INVESTIGACION
LABORATORIO DE ENDOCRINOLOGÍA MOLECULAR



CARTA CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN LA INVESTIGACIÓN:

EVALUACIÓN MOLECULAR DE PACIENTES CON DIABETES MELLITUS NO INSULINO DEPENDIENTE.

PROYECTO CONACYT 40518-M

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 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 _____

APÉNDICE B:

CUESTIONARIO DE INFORMACIÓN ADICIONAL



HOSPITAL JUÁREZ DE MEXICO
DIVISION DE INVESTIGACION
LABORATORIO DE ENDOCRINOLOGÍA MOLECULAR
“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:

Ingiere 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 _____ Cúantos presentan DM _____ Otros: Tíos _____ Primos _____

Sobrinos _____

Observaciones: _____

APÉNDICE C:

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Sacarosa Tritón 2X:

Sacarosa	219.0 g
Tris-Base	2.42 g
MgCl ₂	2.03 g
Tritón 100X	10 mL

Mezclar con aprox. 800 mL de agua des ionizada.

Ajustar el pH a 7.6.

Aforar a 1L.

Filtrar con membrana.

Almacenar a 4°C.

Sacarosa Tritón 1X:

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

Solución de Lisis Nuclear:

Tris-Base	1.21g
NaCl ₂	23.4g
Na ₂ EDTA	0.75g

Mezclar con aprox. 300 mL de agua des ionizada.

Aforar a 500 mL.

Esterilizar en autoclave.

Almacenar a Temperatura ambiente

Proteinasa K 0.05% (5mg/mL):

Pesar 50mg de proteinasa K

Llevar a 10mL con agua des ionizada

Mezclar completamente

Almacenar a -20°C

NaCl saturado:

Disolver 35g de NaCl en 100mL de agua des ionizada.

Solubilizar lo más posible. (*Queda una capa de sal en el fondo*).

Almacenar a temperatura ambiente.

ETOH 70%:

Tomar 70mL del alcohol absoluto (100%) y agregar 30mL de agua des ionizada. Mezclar hasta homogeneizar y almacenar a 4°C.

Amortiguador TE :

Tomar 1mL de Tris/HCL 1 M a pH8.0
Agregar 200 μ L de EDTA 0.5M a pH8.0
Aforar a 100mL. Almacenar a temperatura ambiente.

Tris/HCl 1M a pH8.0:

Pesar 30.275 g de Tris/HCl
Disolver con 150 mL de agua des-ionizada.
Ajustar el pH a 8.0
Aforar a 250 mL
Almacenar a temperatura ambiente.

Amortiguador TBE10X:

Tris Base	108.0 g
Ácido Bórico	55 g
EDTA 0.5 M pH 8	40 mL

Aforar a 1L.
Filtrar con membrana.
Almacenar a temperatura ambiente.

Amortiguador TBE 1X (Amortiguador de corrida):

Hacer una dilución 1:10 del Amortiguador TBE 10X.

APÉNDICE D:

ELECTROFORESIS

Preparación del Gel de Agarosa:

1. Adicionar la cantidad necesaria de agarosa a una cantidad medida de amortiguador TBE 1X en un matraz Erlenmeyer. (El amortiguador no debe ocupar más del 50% del volumen del matraz)
2. Calentar en el microondas hasta que se disuelva la agarosa (15-20 seg, checar que el volumen de la solución no haya disminuido, si es necesario reestablecerlo con el amortiguador)
3. Enfriar la solución aprox. a 60°C y adicionar el bromuro de etidio (1 µL por cada 50mL) y mezclar completamente.
4. Agregar la solución tibia al molde de la cámara, *que previamente tiene colocado el peine.*
5. Dejar que gelifique (30-45 min) y después retirar el peine.

Electroforesis:

1. Una vez listo el gel de agarosa, adicionar el amortiguador de corrida (TBE 1X) al tanque hasta cubrir el gel aprox. 1mm.
2. Mezclar 5µL de las muestras de DNA con 3 µL de amortiguador de carga.
3. Cargar lentamente la mezcla en los pozos del gel. (*También debe cargarse un marcador de DNA de tamaño conocido en un extremo*).
4. Tapar el tanque y conectar los electrodos. (*El DNA migra hacia el ánodo, que es el cable rojo*).
5. Aplicar un voltaje de 80V
6. Se corre el gel hasta que los colorantes hayan migrado una distancia apropiada a través del gel.
7. Apagar la corriente y quitar los electrodos.
8. Observar el gel con luz UV