



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL GENERAL
“DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ”

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA
“IGNACIO CHÁVEZ”

“EVALUACIÓN DE LA ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE
LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA CON LA
EVOLUCIÓN DE NEFROPATÍA DIABÉTICA EN POBLACIÓN
MEXICANA QUE ASISTE AL HOSPITAL GENERAL “DR.
MANUEL GEA GONZÁLEZ”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE LA ESPECIALIDAD EN:
MEDICINA INTERNA

PRESENTA:

DRA. JAZMÍN TERESA POZOS LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ROGELIO ZACARÍAS CASTILLO

MÉXICO, D. F. AGOSTO, 2009





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.

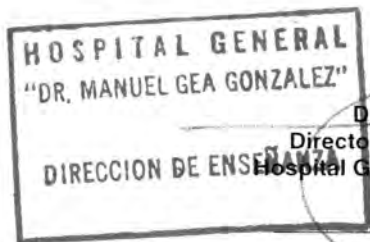
Este trabajo fue realizado en la Subdirección de Medicina, División de Medicina Interna del Hospital General Dr. Manuel Gea González y en la Sección de Estudio de Posgrado de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la Dirección del Dr. Rogelio Zacarías Castillo.

Este trabajo de Tesis con No. PROT-14-28-2009, presentado por el alumno Jazmín Teresa Pozos López se presenta en forma con visto bueno por el Tutor principal de la Tesis Dr. Rogelio Zacarías Castillo, con fecha del 31 de julio del 2008 para su impresión final.

Dr. Rogelio Zacarías Castillo

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke extending to the right.

Autorizaciones



Dr. Octavio Sierra Martínez
Director de enseñanza e Investigación
Hospital General "Dr. Manuel Gea González"



Dr. Rogelio Zacarías Castillo
Jefe de Servicio de Medicina Interna
Hospital General "Dr. Manuel Gea González".

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line.

Dr. Francisco Eugenio Rodríguez Castellanos
Médico adscrito del Servicio de Nefrología
Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line.

Dr. Gilberto Vargas Alarcón
Departamento de Biología Molecular
Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"


A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line.

Evaluación de la asociación de Polimorfismos de la Enzima Convertidora de Angiotensina con la evolución de nefropatía diabética en población mexicana que asiste al Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

Colaboradores:

Nombre: Dr. Rogelio Zacarías Castillo

Firma: _____



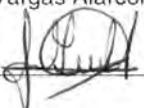
Nombre: Dr. Francisco Eugenio Rodríguez Castellanos

Firma: _____



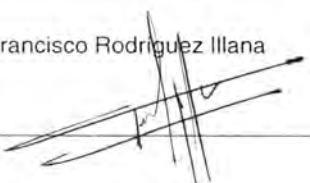
Nombre: Dr. Gilberto Vargas Alarcón

Firma: _____



Nombre: Dr. Francisco Rodríguez Illana

Firma: _____



AGRADECIMIENTOS

A mis padres, hermanas y abuela...

Por su apoyo y cariño incondicional.

A Francisco Rodríguez Illana...

Por tu amistad y por pensar en mí para este proyecto.

Al Dr. Rogelio Zacarías Castillo...

Por creer en mí desde el principio y por la enseñanza.

Al Dr. Francisco Eugenio Rodríguez Castellanos...

Por permitirme participar en este proyecto.

Al Dr. Gilberto Vargas Alarcón...

Por su invaluable apoyo en el proyecto y permitirme formar parte de este.

Al Dr. Víctor García Edgar...

Por su tiempo, ayuda y paciencia.

A mis maestros...

Por la dedicación y enseñanza.

A Coke (mi casi primo y amuleto de la buena suerte), Venz y Jhoni...

Por su tiempo y gran ayuda en el reclutamiento de pacientes.

A Marco, Selene y Silvestre...

Por su ayuda en el proceso de la muestra, desde la toma hasta el resultado.

A Joel...

Por tu amistad, cariño y por estar siempre conmigo.

A Jassive, Paty, Chío y Alex...

Por los malos, buenos y excelentes momentos. "Muertas por dentro, pero de pie, como un roble".

ÍNDICE

Glosario	8
Relación de figuras y tablas	9
Resumen	10
1. Antecedentes.....	11
2. Marco de Referencia.....	17
3. Planteamiento del Problema	20
4. Justificación	20
5. Hipótesis.....	20
6. Objetivos.....	21
6.1. Objetivo General	21
6.2. Objetivos Particulares	21
7. Material y Métodos.....	21
7.1. Tipo de estudio.....	21
7.2. Ubicación temporal y espacial.....	21
7.3. Criterios de selección de la muestra.....	21
7.4. Variables	22
7.5. Tamaño de la muestra	29
7.6. Métodos de Laboratorio	29
7.7. Análisis estadístico.....	30
7.8. Descripción operativa del estudio.....	30
8. Resultados.....	31
9. Discusión	40
10. Conclusiones	43
11. Perspectivas	43
12. Bibliografía.....	44
13. Anexos.....	48
13.1. Carta de Consentimiento Informado.....	48

GLOSARIO

AGEs: productos finales de glucosilación avanzada
BRA`s: bloqueadores del receptor de angiotensina
CML: pentosidina carboxymetilisina
D/D: delección/delección
DM: Diabetes Mellitus
ECA: Enzima Convertidora de Angiotensina
ECM: matriz extracelular
HbA1c: Glicohemoglobina
I/D: inserción/delección
I/I: inserción/inserción
IECAs: inhibidores de enzima convertidora de angiotensina
IGF-1: factor de crecimiento parecido a la insulina 1
IMC: Índice de Masa Corporal
IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social
IRC: insuficiencia renal crónica
N: número de pacientes
NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica
ND: Nefropatía Diabética
NS: no significativo
OMS: Organización Mundial de la Salud
PAD: Presión Arterial Diastólica
PAFR: Pérdida acelerada de la función renal
PAS: Presión Arterial Sistólica
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PFR%: pérdida de la función renal expresada en porcentaje.
PKC: proteína kinasa C
RAGE: receptor de productos finales de glucosilación avanzada
Redox: reacciones reducción/oxidación
ROS: especies reactivas de oxígeno
SD: desviación estándar
SINAIS: Sistema Nacional de Información en Salud
SRAA: Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
SSA: Secretaría de Salud
TED: Tiempo evolución de Diabetes Mellitus
TFG: Tasa de Filtración Glomerular
TGF- β : factor de crecimiento transformante beta

RELACIÓN DE FIGURAS Y TABLAS

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

Tabla 2. Comparación de género entre grupo 1 y 0.

Tabla 3. Características clínicas y bioquímicas entre grupo 1 y 0.

Tabla 4. Frecuencias alélicas y genotípicas entre grupo 1 y 0.

Tabla 5. Comparación de función renal entre genotipos.

Tabla 6. Características clínicas y bioquímicas entre genotipos.

Figura 1. Complicaciones crónicas.

Figura 2. Comparación de género entre grupo 1 y 0.

Figura 3. Comparación de función renal entre genotipos.

Figura 4. Comparación de tiempo de evolución de Diabetes Mellitus entre genotipos.

RESUMEN

El 25% de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 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. Múltiples sistemas se encuentran involucrados en el desarrollo y progresión de la ND, uno de los principales es el Sistema Renina-Angiotensina, no solo por los efectos hemodinámicos, sino por sus propiedades recientemente descubiertas a favor de hipertrofia, proliferación y diferenciación celular.

Objetivo: Evaluar la posible asociación de polimorfismos de la Enzima Convertidora de Angiotensina con la evolución de la ND en población mexicana de pacientes con DM2.

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: Al comparar el grupo total de pacientes diabéticos con controles sin DM, no se encontraron diferencias significativas en frecuencias de alelos de inserción (I) o delección (D) ni en las frecuencias de los genotipos II, ID o DD. Al efectuar el análisis de las frecuencias alélicas absolutas por subgrupos de pacientes diabéticos, se observaron 4 casos para el alelo de inserción (28.6%) en grupo 1 (N=7) y 33 casos (66%) en grupo 0 (N=25), la distribución del alelo de delección fue de 10 casos (71.4%) en el grupo 1 y 17 casos (34%) en el grupo 0, con odds ratio de 4.46, IC 95% (1.28-15.53) y $p=0.0307$. La distribución de los genotipos en el grupo 1 fue de 0 casos para I/I, 4 casos para I/D (57.1%) y 3 casos para D/D (42.9%); en el grupo 0 se encontraron 12 casos con I/I (48%), 9 casos con I/D (36%) y sólo 4 casos para D/D (16%), mostrando una tendencia a presentar el genotipo D/D en el grupo 1 y del I/I en el grupo 0 con mayor frecuencia, sin ser una diferencia significativa. Se observó diferencia significativa en género al comparar entre grupo 0 y 1, teniendo el género masculino 10 veces más riesgo de presentar rápida progresión de la nefropatía con una $p=0.0329$. Al comparar la tasa de filtración glomerular y la pérdida de la función renal entre los tres polimorfismos, la presencia del genotipo D/D mostró una tendencia (no significativa) a mayor pérdida de función renal en comparación con los otros genotipos (0.92 ± 2.15 , 8.15 ± 13.45 y 14.14 ± 21.07 ml/min/año para los genotipos II, ID y DD respectivamente en pérdida porcentual).

Conclusiones: La presencia del alelo D en nuestra población se asoció a progresión acelerada del daño renal en pacientes diabéticos, con tendencia a una mayor pérdida de la función renal.

1. ANTECEDENTES

La Diabetes Mellitus (DM) afecta actualmente a 246 millones de personas alrededor del mundo (171 millones en el 2000¹) y se espera que para el 2025 esta cifra incremente a 380 millones². 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 USA³. 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 Organización Mundial de la Salud (OMS) 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 año². 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 Secretaría de Salud (SSA). Según datos del IMSS, en 2004 se destinaron 15000 pesos para la atención de cada derechohabiente con DM⁴.

Las alteraciones renales en pacientes con DM se reportaron por primera vez en el siglo XIX, 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 diálisis⁵.

En México se estima que 14 de cada 100 diabéticos tienen ND y es la primera causa de insuficiencia renal crónica (IRC) 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 hemodiálisis³. Por lo anterior, no es difícil explicar que en los últimos años ha habido un incremento en la actividad científica, básica y clínica, de este problema, además de grandes avances en el entendimiento de la fisiopatología de la enfermedad y un área de especial desarrollo ha sido la investigación de 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 adecuado⁶.

Estadio 1(microalbuminuria). Nefropatía diabética incipiente

Excreción de albúmina de 30-300 mg/día, en ausencia de situaciones clínicas que puedan cursar con incremento de la albuminuria como hipertermia, insuficiencia cardíaca 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^{6,7}.

Estadio 2. Nefropatía diabética 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^{6,7}.

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^{6,7}.

PATOGÉNESIS DE LA NEFROPATÍA DIABÉTICA

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 renal⁹. 10-20% de los pacientes con DM tipo 2 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- β)⁶.

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, glucagon 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- β , están también implicados en la hipertrofia renal que se observa en los pacientes diabéticos¹⁰.

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 kinasa C (PKC). Otro mecanismo mediante el cual se sobre expresan estos receptores es debido al “estiramiento” de las células mesangiales secundario al incremento de la presión intraglomerular¹¹.

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 oxidativo⁸.

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 glomerular¹².

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- β 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- κ 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 intrarrenales y puede además, influir en la generación de matriz extracelular por parte de las células mesangiales¹³.

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 citocina, 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 sobre regulación 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 sitios¹⁴.

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- κ 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- β ¹⁴.

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 profibróticas¹⁵. 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- β , 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^{16, 17}.

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 aún 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)¹⁸.

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 (decapéptido 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 codificadoras¹⁹.

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 II²⁰.

2. MARCO DE REFERENCIA

Dada la importancia de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA), así como la relevancia de los hallazgos de Rigat, numerosos estudios han puntualizado el papel de los

polimorfismos inserción / deleción (I/D) en la ND. Este polimorfismo es tal vez uno de los más estudiados en diversas patologías no solamente en DM¹⁹.

La mayoría de los estudios se han realizado en pacientes con DM tipo 1 y en poblaciones asiáticas y caucásicas. Un meta-análisis efectuado de los estudios realizados de 1994 a 1997²¹ 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 reciente²², 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 puesta 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 substitución 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 cardíaca crónica y cardiopatía isquémica. La consecuencia de dicho polimorfismo es un incremento en la actividad de dicha enzima afectando de manera positiva (sobrerregulación) la síntesis de aldosterona. Un meta-análisis de estudios realizados hasta febrero del 2006, analizó 42 publicaciones (poblaciones caucásicas, asiáticas, un estudio con población afroamericana y uno 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^{23, 24}. 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 está constituida por 56% de genes indígenas, 40% de genes Caucásicos y 4% de genes negroides²⁵. 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.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

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

4. JUSTIFICACIÓN

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.

5. HIPÓTESIS

Si los polimorfismos del gen que codifica para la ECA se relacionan con un diferente grado de actividad de dicha enzima, y la ECA es fundamental para el SRAA que es uno de los principales determinantes de la ND, entonces podría esperarse la variación en el patrón de evolución de la ND con relación a las variantes polimórficas descritas.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL:

Se comparó la frecuencia de los polimorfismos inserción/delección del gen que codifica para la ECA (genotipos I/I, I/D, D/D) en dos grupos de pacientes con DM, con nefropatía de evolución esperada y con nefropatía de rápida progresión.

6.2. OBJETIVOS PARTICULARES:

Fue evaluada la posible asociación entre polimorfismos del gen que codifica para la ECA con la evolución de la ND.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. Tipo de Estudio

Se trató de un estudio de Casos y controles, Abierto, Observacional, Prospectivo, Transversal.

7.2. Ubicación Temporal y Espacial

Se incluyeron pacientes con DM tipo 2 que acudieron a la Consulta Externa del servicio de Medicina Interna del Hospital General "Dr. Manuel Gea González" durante un período comprendido de marzo del 2009 a junio del 2009.

7.3. Criterios de Selección de la Muestra

Criterios de Inclusión

1. Pacientes adultos (de cualquier edad y sexo).
2. Pacientes diabéticos tipo 2 sin importar el tipo de terapia a que estén sometidos (hipoglucemiantes 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 con o sin ND correspondiente a la evolución esperada.

Criterios de Exclusión

1. Nefropatía no diabética diagnosticada en base a la clínica o. por biopsia renal.
2. Deterioro agudo de la función renal de cualquier etiología.
3. Hipertensión Arterial Sistémica de etiología secundaria.
4. Pacientes trasplantados o donadores renales.
5. Pacientes con cáncer o uropatía obstructiva.

Criterios de Eliminación

1. Expediente incompleto.

7.4. Variables

Variables Independientes

- Peso
- Talla
- Índice de Masa Corporal
- Presión Arterial Sistólica
- Presión Arterial Diastólica
- Tiempo de evolución de Diabetes Mellitus
- Glucosa
- HbA1c
- Colesterol
- Triglicéridos
- Ácido Úrico

Variables Dependientes

- Síndrome nefrótico
- Tasa de Filtración Glomerular
- Pérdida acelerada de la función renal
- Creatinina sérica

- Índice Proteinuria/Creatinuria
- Polimorfismo inserción/delección de la enzima convertidora de angiotensina

Covariables:

- Edad, numérica continua, de razón.
- Género, nominal.
- Complicaciones crónicas de Diabetes Mellitus, nominales.
- Tratamiento, nominales.
- Albúmina, numérica continua, de razón.

Variables clínicas

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.

5. 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:

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

6. Presión Arterial Sistólica (PAS).

Variable independiente, numérica continua, de razón.

*Definición conceptual: Corresponde al valor máximo de la presión arterial en la sístole cardiaca 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.

7. 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.

8. 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.

9. Complicaciones crónicas de Diabetes 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.

10. 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, albúmina <3.5 g/l, hiperlipidemia (hipercolesterolemia y/o hipertrigliceridemia) y edema.

11. 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:

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

12. Pérdida 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 de las enfermedades o síntomas.

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

Variables bioquímicas

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 autoanalyzer 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 está 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 autoanalyzer.

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 acidos 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

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

Variable dependiente, 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 delección/delección (DD) obtenidos mediante el método de reacción en cadena de polimerasa.

7.5. Tamaño de la Muestra

Se diseñó un estudio comparativo, la diferencia esperada entre los grupos fue de: 8%, el rango de variación de ambos casos:

Número de grupos 2, número de casos por grupo: 56 casos, 112 controles (1 caso por 2 controles). Con nivel alfa de 0.5 y potencia de la prueba de 80%.

Forma de asignación de los casos a los grupos de estudio: Secuencial.

Características del grupo control y del grupo experimental:

- Grupo 1 (casos): DM + ND + rápida evolución.
- Grupo 0 (controles): DM + ND + evolución esperada.

7.6. Métodos de Laboratorio

7.6.1. El DNA genómico fue extraído de 10 ml de sangre periférica de cada individuo utilizando la técnica de expulsión salina³³. Cada muestra fue cuantificada y su pureza se determinó utilizando un espectrofotómetro.

7.6.2. 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-3'²⁰. Las reacciones fueron realizadas en un volumen final de 25 µl conteniendo 200 µM de cada dNTP, 2mM de MgCl₂, 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 transiluminador 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 delección incluyó 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 delección, cada *muestra* que se detectó como homocigota D/D fue amplificada nuevamente utilizando una pareja de iniciadores específicos para la inserción (5ª: 5'-TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC-3' y 5c: 5'-TCGCCAGCCCTCCCATGCCATAA-3')

7.7. Análisis Estadístico

Los resultados se expresaron como promedio \pm SD o bien como proporciones. Las comparaciones se hicieron empleando χ^2 para proporciones o con la prueba exacta de Fisher. La comparación de medias se efectuó 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 más 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 fueron obtenidos por conteo directo. Se estableció si las poblaciones estudiadas estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg para el polimorfismo analizado. Además se calculó medida de asociación con intervalos de confianza y valores de $p < 0.05$ para estudio de casos y controles, todo lo anterior utilizando el programa estadístico SPSS versión 14.

7.8. Descripción Operativa del Estudio

1. El estudio se llevó a cabo en el departamento de Medicina Interna del Hospital General "Dr. Manuel Gea González" y en el departamento de 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 realizaron por parte del investigador principal (Dra. Jazmín Teresa Pozos López).
3. La toma de muestras para la medición de las variables genéticas fue responsabilidad del investigador principal.
4. Una vez tomadas las muestras se transportaron al departamento de fisiología donde se almacenaron y se realizó la extracción del DNA.
5. La determinación de los alelos de inserción y delección se realizó como se describe anteriormente.
6. Fecha de inicio del estudio: marzo del 2009.
7. Fecha de conclusión del estudio: julio del 2009.

8. RESULTADOS

Se estudiaron en total 32 pacientes diabéticos clasificados de acuerdo al tipo de evolución de nefropatía, de los cuales 10 casos correspondieron al género masculino (31.25%) y 22 casos al género femenino (68.75%) (**tabla 2**).

De estos 32 pacientes se obtuvieron mediante un análisis genético de la Enzima Convertidora de Angiotensina las frecuencias alélicas y genotípicas que a su vez fueron comparadas con 98 controles sin Diabetes Mellitus (sanos). La distribución de las frecuencias (**tabla 1**), correspondieron a 37 alelos de inserción (I) en el grupo con DM (57.81%) y 118 (60.2%) en el grupo control ($p>0.05$), 27 alelos de delección (D) en el grupo DM (42.19%) y 78 (39.8%) en el grupo control ($p>0.05$). Con respecto al análisis de los genotipos, se observaron 12 homocigotos para el genotipo I/I (33.42%) en el grupo pacientes con DM comparado con 39 (39.9%) en grupo control ($p>0.05$). Finalmente en lo que respecta al estado homocigoto para el alelo de delección (D/D) se encontró una frecuencia de 7 casos en el grupo DM (17.80%) y 19 (19.4%) en el grupo control ($p>0.05$).

		Pacientes n=32		Controles n= 98		P
Alelo	N	Fa	N	Fa		
I	37	.5781	118	.602	NS	
D	27	.4219	78	.398	NS	
Genotipo	N	Fg	N	Fg		
II	12	.3342	39	.399	NS	
ID	13	.4878	40	.408	NS	
DD	7	.1780	19	.194	NS	

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

Evaluando la distribución de variables de interés en el grupo de los 32 pacientes diabéticos (sin importar el patrón de evolución clínica) (**tabla 3**), se encontró una edad promedio de 63.2 ± 11.5 años (rango de 41 a 80 años), el peso promedio fue de 66.22 ± 15.03 kg (rango de 42.6 a 100 kg), talla de 1.56 ± 0.50 m (rango 1.35 a 1.72 m), IMC de 27.91 ± 4.72 (rango de 19.98 a 37.61).

El promedio de la presión arterial sistólica fue de 122 ± 18 mmHg (rango de 90 a 160 mmHg) y la presión arterial diastólica tuvo un promedio de 75 ± 11 mmHg (rango de 50 a 90 mmHg). Desde el punto de vista del tiempo de evolución de la enfermedad a partir del diagnóstico, encontramos un promedio de 18.44 ± 6.62 años (rango de 1.5 a 34 años). Como podemos observar estas variables se comportaron dentro de parámetros normales establecidos para este grupo de pacientes y sin evidencia de alguna característica predominante, no obstante el ligero incremento del IMC.

En lo que se refiere al análisis de variables bioquímicas en este grupo de diabéticos, cabe señalar que la pérdida de la función renal, la glucosa y la hemoglobina glucosilada se comportaron fuera de rangos normales; se encontró también, una tasa de filtración glomerular promedio de 81.47 ± 30.13 ml/min (rango de 26.41 a 134 ml/min), una pérdida de función renal promedio de 5.13 ± 12.13 ml/min/año (rango 0 a 51 ml/min), lo cual correspondió a una pérdida porcentual promedio de $6.75 \pm 13.56\%$ (rango de 0 a 50%). La creatinina sérica promedio fue de 1.13 ± 0.34 mg/dl (rango de 0.5 a 2.16), el promedio de glucosa fue de 142 ± 63 mg/dl (rango de 50 a 341 mg/dl), la hemoglobina glicosilada promedio fue de 8.48 ± 1.98 (rango de 5.7 a 12.4%), el colesterol sérico de 185 ± 49 mg/dl (rango de 92 a 344 mg/dl), triglicéridos 178 ± 104 mg/dl (rango de 46 a 504 mg/dl), ácido úrico 5.1 ± 1.5 mg/dl (rango de 2.6 a 7.7 mg/dl) y finalmente la albúmina tuvo un promedio de $3.9 \pm .3$ g/dl (rango de 2.9 a 4.4 g/dl). El índice de proteinuria/creatinuria fue en promedio de 0.94 ± 2.49 g/g (con un rango de 0 a 10.93 g/g).

El grupo con DM mostró las siguientes frecuencias de complicaciones (**figura 1**): 6 casos (18.75%) presentaban retinopatía diabética no proliferativa, 5 casos (15.62%) tenían retinopatía proliferativa. Subdividiendo al grupo de diabéticos en pacientes con ND establecida (proteinuria mayor a 300 mg/24 hrs) (n= 7) y sin ND establecida (n= 25), encontramos que 4 pacientes con nefropatía presentaban algún tipo de retinopatía (57.14%), de los cuales 3 era del tipo proliferativo. Sólo 7 pacientes sin ND (28%)

presentaban retinopatía y 2 casos correspondieron al tipo proliferativo. 1 caso antecedente de cardiopatía isquémica (3.12%). Ningún caso había presentado enfermedad vascular cerebral y 2 (6.25%) mostraban algún tipo de neuropatía. Al momento de inclusión al estudio, identificamos 3 casos de síndrome nefrótico (9.37%).

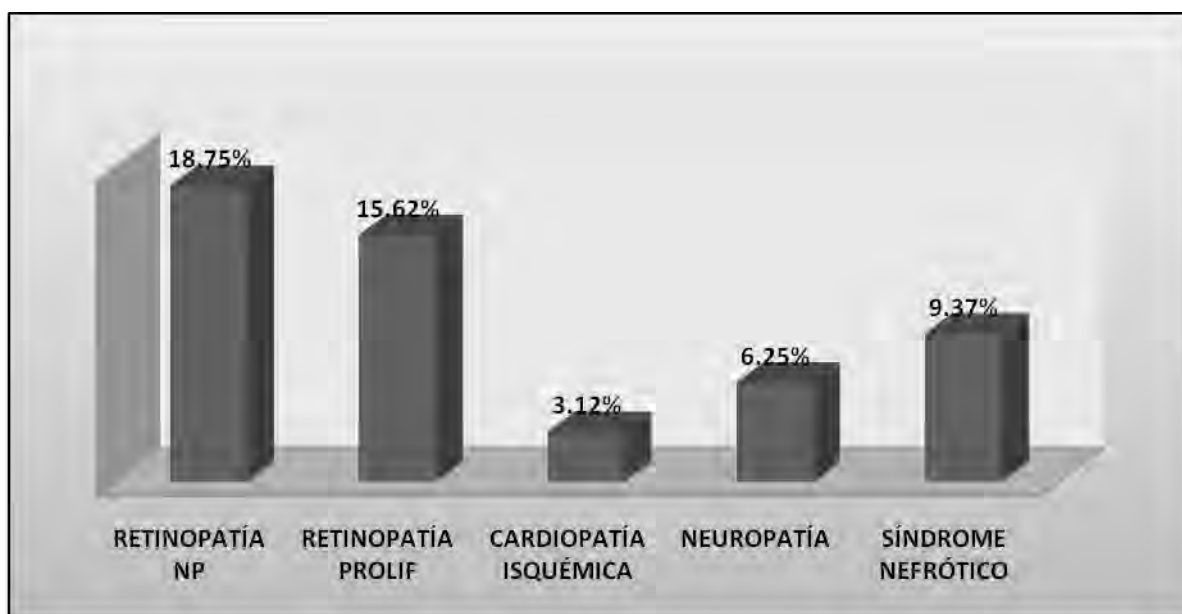


Figura 1. Complicaciones crónicas

En relación al tratamiento antiproteinúrico que recibía el total de pacientes diabéticos, este se dividió en 28 casos con IECA (87.5%), 1 caso recibía bloqueador de receptores de angiotensina (3.12%), tratamiento combinado (IECA + ARA) 1 caso (3.12%) y 2 pacientes no recibían ninguno de estos tratamientos (6.25%).

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 ≥ 5 ml/min/año) (grupo 1), encontramos diferencia significativa en género (**tabla 2, figura 2**), teniendo el género masculino 10 veces más riesgo de presentar rápida progresión de la nefropatía con una $p= 0.0329$.

	Casos	Controles	Total
Masculino	5	5	10
Femenino	2	20	22
Total	7	25	32

Tabla 2. Comparación de género entre grupo 1 y 0

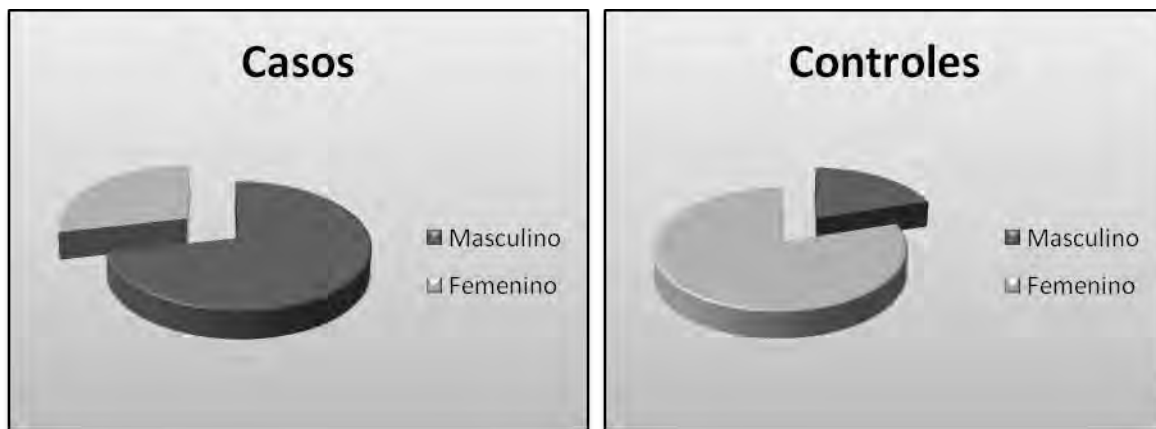


Figura 2. Comparación de género entre grupo 1 y 0

La diferencia en las variables biológicas (**tabla 3**) para ambos grupos fue la siguiente: Edad (52.1 ± 9.5 vs 66.3 ± 10.1 años para grupo 1 y 0 respectivamente, $p= 0.002$), tiempo de evolución (11.1 ± 4.2 vs 20.5 ± 5.7 años para grupo 1 y 0 respectivamente, $p= 0.0004$), tasa de filtración glomerular al momento de inclusión al estudio (47.57 ± 17.58 vs 90.96 ± 25.80 ml/min para grupo 1 y 0 respectivamente, $p= 0.0002$), pérdida de función renal en el último año (22.14 ± 17.98 vs 0.36 ± 1.036 ml/min para grupo 1 y 0 respectivamente, $p < 0.01$), creatinina sérica al momento de inclusión al estudio (1.57 ± 0.53 vs 1.0 mg/dl para grupo 1 y 0 respectivamente, $p < 0.01$), índice proteinuria/creatinuria (4.28 ± 3.9 vs 0 g/g para grupo 1 y 0 respectivamente, $p < 0.01$), glucosa sérica al momento de inclusión al estudio (88.9 ± 31.3 vs 157 ± 61.5 mg/dl para grupo 1 y 0 respectivamente, $p= 0.008$), y finalmente colesterol total (216.9 ± 68.8 vs 175.5 ± 38.4 mg/dl para grupo 1 y 0 respectivamente, $p= 0.047$). No se encontró diferencia significativa en el resto de las variables numéricas analizadas.

En lo que se refiere 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, ni en el número de casos con cardiopatía isquémica o neuropatía periférica. Únicamente observamos diferencia significativa al comparar la proporción de pacientes con síndrome nefrótico entre ambos subgrupos (42.8 vs 0% para grupos 1 y 0 respectivamente, $p < 0.05$), encontrando 39 veces más riesgo de presentar rápida evolución de la nefropatía.

Al analizar las frecuencias alélicas absolutas entre ambos grupos de diabéticos, encontramos 4 casos para el alelo de inserción (28.6%) en grupo 1 y 33 casos en grupo 0 (66%), la distribución del alelo de delección fue de 10 casos (71.4%) en el grupo 1 y 17 casos (34%) en el grupo 0, con odds ratio de 4.46, IC 95% (1.28-15.53) y $p = 0.0307$ (**tabla 4**). La distribución de los genotipos en el grupo 1 fue de 0 casos para I/I, 4 casos para I/D (57.1%) y 3 casos para D/D (42.9%); en el grupo 0 se encontraron 12 casos con I/I (48%), 9 casos con I/D (36%) y sólo 4 casos para D/D (16%), sin mostrar diferencia significativa entre los grupos, probablemente debido al tamaño de la muestra (**tabla 4**).

	CASOS (GRUPO 1) N=7		CONTROLES (GRUPO 0) N=25		TOTAL N=32		Valor de p
	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	
Edad	52.143	9.512	66.280	10.114	63.188	11.488	0.0025
Peso	70.429	22.090	65.040	12.772	66.219	15.028	0.4107
Talla	1.714	0.488	1.520	0.510	1.563	0.504	0.3760
IMC	27.000	5.292	28.160	4.634	27.906	4.720	0.5740
PAS	118.571	16.762	123.200	18.193	122.188	17.732	0.5503
PAD	74.286	13.973	74.760	10.030	74.656	10.757	0.9199
TED	11.143	4.220	20.480	5.680	18.438	6.618	0.0004
TFG	47.571	17.587	90.960	25.809	81.469	30.128	0.0002

PFR	22.143	17.985	0.360	1.036	5.125	12.130	<0.000
PFR%	0.290	0.142	0.005	0.016	0.068	0.136	<0.000
Crs	1.571	0.535	1.000	-	1.125	0.336	<0.000
Índice P/C	4.286	3.904	-	-	0.938	2.488	<0.000
Glucosa	88.857	31.350	156.960	61.523	142.063	62.760	0.0088
HbA1c	8.333	1.751	8.520	2.064	8.484	1.981	0.8398
Colesterol	216.857	68.757	175.542	38.448	184.871	48.859	0.0471
Triglicéridos	209.857	139.326	168.292	92.895	177.677	103.97	0.3608

Tabla 3. Características clínicas y bioquímicas entre grupo 1 y 0

	CASOS (GRUPO 1)	CONTROLES (GRUPO 0)	TOTAL
FRECUENCIA ALELOS			
Fa ALELO I	4	33	37
Fa ALELO D	10	17	27
TOTAL	14	50	64
GENOTIPO			
I/I	0	12	12
I/D	4	9	13
D/D	3	4	7
TOTAL	7	25	32

Tabla 4. Frecuencias alélicas y genotípicas entre grupo 1 y 0

Es interesante mencionar que aunque no encontramos diferencia significativa al comparar la tasa de filtración glomerular y la pérdida de la función renal entre los tres polimorfismos, la presencia del genotipo D/D mostró una tendencia a mayor pérdida de función renal en

comparación con los otros genotipos (0.92 ± 2.15 , 8.15 ± 13.45 y 14.14 ± 21.07 ml/min/año para los genotipos II, ID y DD respectivamente en pérdida porcentual), (**tabla 5, figura 3**).

	I/I	I/D	D/D	Valor de p
N	12	13	7	
TFG				
Promedio/SD	83.33 ± 23.66	83 ± 35	74.43 ± 33.90	NS
PFR%				
Promedio/SD	0.92 ± 2.15	8.15 ± 13.45	14.14 ± 21.07	NS

Tabla 5. Comparación de función renal entre genotipos

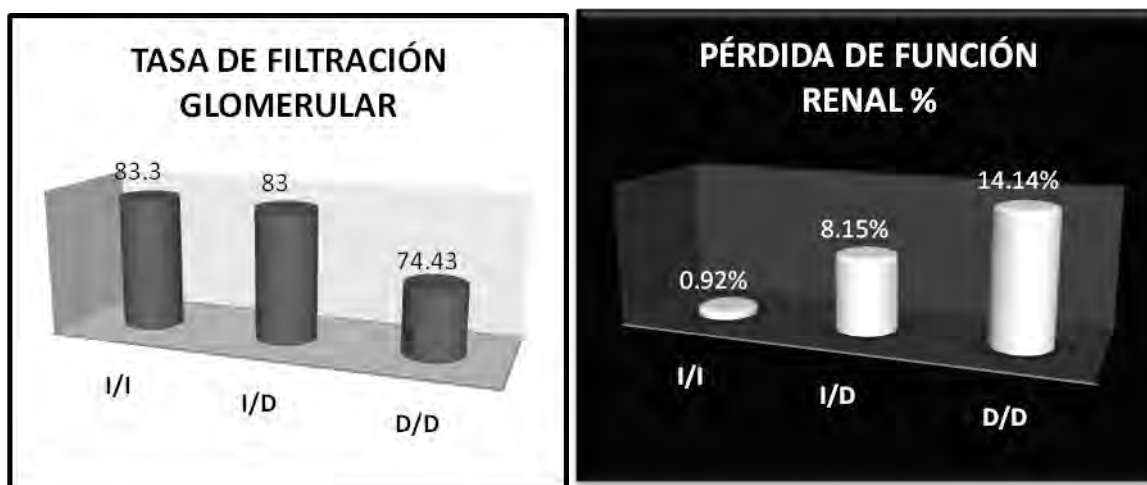


Figura 3. Comparación de función renal entre genotipos

Al comparar las diferentes variables clínicas y bioquímicas de acuerdo al genotipo de la ECA (**tabla 6**), no encontramos ninguna diferencia estadísticamente significativa, el peso y la talla mostraron una tendencia a ser mayores en el grupo homocigoto para el alelo D (76.79 ± 13.90 Kg y 160.29 ± 7.11 cm) vs el genotipo ID (61.79 ± 13.15 Kg y 153.62 ± 8.17) y los homocigotos para el alelo I (64.46 ± 15.51 Kg y 149.92 ± 10.21). Y con mayor énfasis esta tendencia se observó en un menor tiempo de evolución a favor del alelo D

(figura 4, tabla 6). El resto de las variables bioquímicas analizadas no mostraron diferencia significativa al comparar los tres genotipos.



Figura 4. Comparación de tiempo de evolución de Diabetes Mellitus entre genotipos

	I/I N=12		I/D N=13		D/D N=7		Valor p
	PROMEDIO	SD	PROMEDIO	SD	PROMEDIO	SD	
Edad	67.92	11.87	62.46	8.41	56.43	13.53	0.102
Peso	64.46	15.51	61.79	13.15	76.79	13.90	0.088
Talla	149.92	10.21	153.62	8.17	160.29	7.11	0.062
IMC	28.56	5.32	26.05	3.88	29.76	4.25	0.186
PAS	121.67	18.50	122.31	15.36	122.86	22.89	0.990
PAD	75.83	10.84	73.77	10.39	74.29	12.72	0.893
TED	19.75	5.24	19.00	6.70	15.14	8.34	0.327
Crs	1.00	-	1.15	0.38	1.29	0.49	0.190
Índice P/C	-	-	1.62	3.43	1.29	2.36	0.253
Glucosa	155.17	49.71	135.15	76.66	132.43	59.26	0.670
HbA1c	7.83	1.99	9.08	1.78	8.57	2.23	0.310
Colesterol	177.45	37.54	195.15	64.12	177.43	31.12	0.625
Triglicéridos	173.64	76.49	165.00	104.06	207.57	145.69	0.689

Tabla 6. Características clínicas y bioquímicas entre genotipos

Con respecto a las complicaciones crónicas, no se observó diferencia significativa al comparar sus respectivas proporciones de acuerdo a los tres genotipos.

Se intentó un análisis multivariado del tipo de la regresión logística binaria, tomando como variable dependiente el patrón de evolución (esperada o rápida progresión) o bien el tiempo de evolución (menor de 15 años o \geq a 15 años), encontrando como factor de riesgo el género masculino, sin embargo al incluir otras variables disminuyó el factor sin dejar de mostrar una tendencia ($p=0.067$), relacionado con una baja proporción de la muestra.

9. DISCUSIÓN

En este estudio, el objetivo principal fue conocer si las diferentes variantes polimórficas del gen que codifica para la Enzima Convertidora de Angiotensina se asocian a diferentes patrones de evolución del daño renal mediado por Diabetes Mellitus tipo 2. Al analizar las frecuencias absolutas alélicas entre ambos grupos de diabéticos (pacientes con evolución habitual de la ND, grupo 0 y aquellos con rápida progresión de la ND (pérdida de la función renal \geq 5 ml/min/año), grupo 1); encontramos una diferencia significativa para el alelo D, mostrando que los pacientes con este alelo tienen 4.4 veces más riesgo de presentar rápida progresión de la nefropatía diabética comparados con los pacientes que no lo tienen. Los pacientes con alelo D tienen 2 veces más riesgo de presentar pérdida de la función renal que los del alelo I, a pesar de no encontrar diferencia significativa. Además se observó una tendencia, aunque no significativa, de mayor pérdida de función renal ante la presencia del genotipo D/D en comparación con los otros genotipos (I/D, I/I). El genotipo I/I se observó con mayor frecuencia en pacientes con larga evolución de la enfermedad y sin ND.

La nefropatía diabética establecida, rara vez aparece antes de 15 años de realizar el diagnóstico de Diabetes Mellitus y la pérdida en la tasa de filtración glomerular puede ser muy variada (5-20 ml/min/año) dependiendo de varios factores como el 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 Enzima Convertidora de Angiotensina en diversas poblaciones, predominando estudios en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 1. Los resultados son contrastantes dependiendo de la población estudiada. Algunos de estos estudios han encontrado asociación entre el genotipo DD con un deterioro más rápido de la función renal y con mortalidad²⁶. Otros trabajos han reportado una mayor incidencia tanto del alelo D como del genotipo DD en pacientes diabéticos en terapia de sustitución de la función renal, controlado 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.²⁷

A diferencia del estudio recientemente publicado por Ortega y colaboradores²⁸ 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, en nuestro estudio no corroboramos una diferencia significativa para el genotipo DD, sin embargo sí mostró una mayor frecuencia absoluta del alelo D en pacientes con evolución acelerada de la enfermedad, alcanzando significancia estadística ($p=0.0307$); la falta de significancia en las diferencias entre genotipos, consideramos se debe al tamaño reducido de la muestra.

La población mexicana mestiza tiene una frecuencia de aproximadamente 40% de genes caucásicos (especialmente españoles)²⁹ y los estudios en población caucásica, en comparación con estudios en asiáticos, son menos concluyentes y más contrastantes al intentar una asociación entre la ND y los polimorfismos de la ECA, siendo esta una probable explicación a la falta de contundencia en la asociación entre la evolución de la enfermedad y los polimorfismos en nuestros pacientes mestizos.

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 colaboradores³¹ 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. Además 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 debido al tamaño de la muestra.

Se encontró una mayor frecuencia de genotipos D/D y alelo D con el género masculino, al comparar ambos grupos (1 y 0) se encontró una diferencia significativa ($p=0.0329$) siendo más frecuente el género masculino en los pacientes con pérdida acelerada de la función renal. Además al hacer un análisis logístico multivariado encontramos al género masculino como un posible factor de riesgo. Los hombres tienen 10 veces más riesgo de presentar una rápida evolución de la nefropatía diabética en comparación con el género femenino.

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; lo cual concuerda 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 macroalbuminuria³².

Analizando el perfil metabólico, encontramos que los pacientes homocigotos para el alelo D, presentaban niveles mayores de HbA1c, peso corporal y triglicéridos, sin ser significativas las diferencias. Existe un fondo genético de predisposición hacia síndrome metabólico y se han propuesto como genes candidatos los que involucran al SRAA. Álvarez-Aguilar y colaboradores³⁰ 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, $p<0.0001$). Los hallazgos de Álvarez-Aguilar junto con los nuestros confirman que al menos en pacientes mestizos mexicanos la presencia del alelo D y principalmente, 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.

La mayoría de nuestros pacientes se encontraban en tratamiento antiproteinúrico a base de IECA (principalmente) y/o ARA, lo cual nos sugiere que el tratamiento farmacológico en pacientes con perfiles genéticos aparentemente de mayor riesgo para deterioro de la función renal en nuestra población, es subóptimo.

Es necesario incrementar la muestra de estudio para ajustar criterios de riesgo como son deterioro de la función renal con respecto al tiempo de evolución y clasificando con frecuencias alélicas y genotipos.

10. CONCLUSIONES

La presencia del alelo D en nuestra población se asoció a progresión acelerada del daño renal en pacientes diabéticos, con tendencia a una mayor pérdida de la función renal.

El género masculino se asoció como factor de riesgo de una rápida progresión de la nefropatía diabética en comparación con el femenino.

El alelo D presente en pacientes diabéticos sugiere una tendencia a presentar un perfil metabólico más adverso.

11. PERSPECTIVAS

En el desarrollo y progresión de la ND se encuentra involucrado todo el sistema renina angiotensina aldosterona, 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 el factor de crecimiento transformante B.

12. BIBLIOGRAFÍA

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

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

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

⁴ 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/)

⁵ Cortés P, Mogensen CE. Prefacio. En su: Contemporary Diabetes: The Diabetic Kidney. Nueva Jersey, Humana Press, 2006. pp. ix.

⁶ 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.

⁷ 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.

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

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

¹⁰Cooper 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.

¹¹Heilig 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.

¹²D'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.

¹³DeRubertis 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.

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

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

¹⁶ 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.

¹⁷ 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.

¹⁸Jacobsen 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.

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

²⁰Rigat 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.

²¹Kunz 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.

²²Ng 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.

²³Foy 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.

²⁴Martínez 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.

²⁵Lisker 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.

²⁶Fava 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.

²⁷Cheon 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.

²⁸Ortega-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.

²⁹Vargas-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.

³⁰Alvarez-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.

³¹Vargas-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.

³²Hadjadj 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.

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

13. ANEXOS

13.1 Carta de consentimiento informado

Secretaría de Salud. Hospital General "Dr. Manuel Gea González".

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

De acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki y con La ley General de Salud, Título Segundo. De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos CAPITULO I Disposiciones Comunes. Artículo 13 y 14.- En toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberán prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar. Debido a que esta investigación se consideró como riesgo mínimo o mayor de acuerdo al artículo 17 y en cumplimiento con los siguientes aspectos mencionados con el Artículo 21:

I. Se me ha informado que padezco Diabetes Mellitus tipo 2, por lo que he sido invitado a participar en el estudio Evaluación de la asociación de Polimorfismos de la Enzima Convertidora de Angiotensina con la evolución de nefropatía diabética en población mexicana que asiste al Hospital General "Dr. Manuel Gea González"; para determinar si pacientes como yo, tienen cambios en la estructura de una proteína involucrada en el daño de los riñones causado por la diabetes. Al estudiar los genes de esta proteína, se podrá saber si se asocia con la evolución de la enfermedad y así en un futuro tal vez poder mejorar el tratamiento y así tratar de evitar que la enfermedad progrese rápidamente o de manera agresiva.

II. Se me ha informado que se revisarán mis antecedentes y exámenes de laboratorio en el expediente clínico el día que acuda a consulta, lo cual se hace de manera rutinaria cada vez que acudo a consulta. Además se me tomará una muestra única de sangre (20 ml) repartida en varios tubos. Esta toma es adicional al estudio que requiere mi enfermedad, no representará ningún costo extra para mi, no necesito estar en ayuno y una vez tomada la muestra podré continuar con mis labores normales.

Recibiré consulta de manera normal, y se me solicitarán los exámenes de laboratorio e interconsultas pertinentes de acuerdo a lo que requiera mi enfermedad, cuyo costo será cubierto por mi persona como se realiza de manera habitual. En caso de que no desee

participar, esto no influirá en las consultas subsecuentes y se me continuará brindando la atención médica de manera normal y regular.

III. Se me explicó que con la toma de sangre de 20 ml puedo experimentar dolor leve en el sitio de punción y como condición rara puede dar como resultado moretones, sangrado e infección, los cuales se resolverán con medidas locales y antibiótico en caso necesario en término de una ó 2 semanas. En caso de requerir tratamiento extra secundario a la toma de sangre, el costo será cubierto por el servicio de Medicina Interna del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”.

IV. Se me ha explicado que mi participación en el estudio no implica el uso de medicamentos diferentes a los que ya recibo en la actualidad, y doy mi autorización para que la misma muestra de sangre pueda servir para estudios genéticos posteriores con nuevas mediciones relacionadas con la evolución de mi enfermedad.

V. Se me ha asegurado que puedo preguntar hasta mi complacencia todo lo relacionado con el estudio y mi participación.

VI. Se me aclaró que puedo abandonar el estudio en cuanto yo lo decida, sin que ello afecte mi atención por parte del médico o del hospital.

VII. Autorizo la publicación de los resultados de mi estudio a condición de que en todo momento se mantendrá el secreto profesional y que no se publicará mi nombre o revelará mi identidad.

VIII. Se me informó que no pagaré ningún costo adicional a los que pago por mis consultas y exámenes regulares, no hay costo por el examen genético, ya que serán cubiertos por el departamento de Fisiología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

Con fecha _____, habiendo comprendido lo anterior y una vez que se me aclararon todas las dudas que surgieron con respecto a mi participación en el proyecto, acepto participar en el estudio titulado: Evaluación de la asociación de Polimorfismos de la Enzima Convertidora de Angiotensina con la evolución de nefropatía

diabética en población mexicana que asiste al Hospital General “Dr. Manuel Gea González”.

Nombre y firma del paciente o responsable legal

Nombre, y firma del testigo 1

Dirección

Relación que guarda con el paciente

Nombre, y firma del testigo 2

Dirección

Relación que guarda con el paciente

Nombre y firma del Investigador Responsable o Principal

Este documento se extiende por duplicado, quedando un ejemplar en poder del sujeto de investigación o de su representante legal y el otro en poder del investigador.

Para cualquier duda o aclaración comunicarse con la Dra. Jazmín Teresa Pozos López, investigador principal al 044 55 54 51 09 78 de 9:00 a 13:00hrs.

Para quejas o comentarios comunicarse con el Dr. Octavio Sierra Martínez, presidente de las Comisiones de Ética y de Investigación al 40003000 ext. 3050 y 3218.