



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN BIOQUÍMICA
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES C.M.N. "SIGLO XXI".**

**“Estudio de la frecuencia del polimorfismo
C3889T del angiotensinógeno en pacientes con
nefropatía diabética”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

EDUARDO CEVADA RICO



MÉXICO, D.F.

ABRIL 2010



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.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente los recursos brindados en el laboratorio, tanto materiales como personales.

Al jurado:

QFB. Francisco Javier Parada García

Dr. Adán Valladares Salgado

QFB. José Oscar González Moreno

QFB. Ma. Lourdes Vega Navarrete

QFB. Enrique Escalera Zúñiga

Agradezco sinceramente a las personas que me realizaron críticas y observaciones a éste trabajo, además de guiarme y ayudarme en la realización del mismo, sin mayor interés que el de contribuir a que éste quedara lo mejor posible: Dr. Adán Valladares y Dra. Margarita, sin su apoyo y orientación, este documento no hubiese llegado a su conclusión.

A los investigadores y compañeros de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del CMNSXXI, comenzando por el Dr. Adán, simple y sencillamente un ejemplo como profesional y sobre todo como persona; a Teresa, una compañera tenaz, inteligente y muy capaz; a Javier, que no sólo tuve la fortuna de tener como compañero sino que lo considero como un amigo, el cual me ayudó a entender todo lo que se hacía en laboratorio y a aprovechar todos los conocimientos que la

práctica y la teoría nos pudiesen brindar; a Oswaldo un compañero perseverante y fuerte de carácter, y mi gran compañera y sobre todo amiga Edith, de quien podría decir muchas cosas y me quedaría corto, mi confidente, mi brazo derecho, mi gran acompañante en las buenas y en las malas; a todos ellos muchísimas gracias!!!

DEDICATORIA

A Dios, mi guía, mi luz, mi todo.

A mis padres, a quienes además de deberles la vida son ejemplo de trabajo, fuerza, tenacidad, honradez, responsabilidad y sobre todo amor. A quienes les debo el saber valorar lo mucho o poco que tenga, salir siempre adelante, a no renunciar a algo tan fácilmente, en fin tantas cosas, que espero con este pequeño trabajo les haga saber y sentir ese gran espacio que ocupan en mi corazón... **LOS AMO.**

A toda mi familia, mi tía Carmen, mis primos Hugo, Saúl, mi pequeña sobrina Gretel, mis hermanas Yessica, Esperanza y Rohama a quienes espero servir de buen ejemplo; en fin son bastantes en mi familia pero a todos ellos gracias por las comidas, los vasos de agua y esas muestras de apoyo que siempre sirven de aliento para seguir adelante, de todo corazón éste es un pequeño agradecimiento y recordatorio de lo mucho que los aprecio a todos y cada uno de ustedes.

“Se necesita un gran conocimiento sólo para darse cuenta de la enormidad de la propia ignorancia”.

Thomas Sowell

CONTENIDO

PÁGINA

ABREVIATURAS	i
RESUMEN	iii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA DIABETES	4
3. GENERALIDADES DE LA DIABETES	6
4. CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES	7
4.1 DIABETES TIPO 1 (DIABETES INSULINODEPENDIENTE)	7
4.2 DIABETES TIPO 2 (DIABETES NO INSULINODEPENDIENTE)	8
4.3 DIABETES GESTACIONAL	9
4.4 OTROS TIPOS DE DIABETES.....	9
5. ASPECTOS GENERALES DE LA DIABETES TIPO 2	11
6. COMPLICACIONES DE LA DIABETES TIPO 2	13
6.1 NEFROPATÍA DIABÉTICA	15
6.2 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN NORMAL RENAL.....	16
6.3 FACTORES DE RIESGO AL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD RENAL	19
6.4 GENÉTICA DE LA NEFROPATÍA DIABÉTICA	21
7. SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA	23
7.1 ANGIOTENSINÓGENO.....	24
7.2 ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA	25
7.3 ANGIOTENSINA I Y III	26
7.4 ANGIOTENSINA II.....	26
7.5 RECEPTORES DE ANGIOTENSINA II	27
8. MEDICINA GENÓMICA	28
9. VARIACIONES DEL DNA	29
9.1 POLIMORFISMO DE UN SOLO NUCLEÓTIDO (SNP)	31
10. SNPS DEL ANGIOTENSINÓGENO	32
11. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
12. OBJETIVO GENERAL	34
12.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
13. HIPÓTESIS	35
14. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	36
14.1 TIPO DE ESTUDIO	36
14.2 POBLACIÓN EN ESTUDIO	36

14.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN	37
14.4 VARIABLES	39
14.5 METODOLOGÍA.....	40
15. DIAGRAMA DE FLUJO.....	42
16. DISEÑO ESTADÍSTICO	43
17. RESULTADOS.....	44
18. DISCUSIÓN	46
19. CONCLUSIONES.....	48
20. PROPUESTAS.....	49
21. REFERENCIAS	50
22. ANEXO	61

ABREVIATURAS

ADA	=	Asociación Americana de Diabetes
DT1	=	Diabetes Tipo 1
DT2	=	Diabetes Tipo 2
ND	=	Nefropatía Diabética
ECA	=	Enzima Convertidora de Angiotensina
AT1	=	Receptor Tipo 1 de Angiotensina
AT2	=	Receptor Tipo 2 de Angiotensina
LRI	=	Lámina Rara Interna
LD	=	Lámina Densa
HbA_{1c}	=	Hemoglobina Glucosilada
LDL	=	Lipoproteínas de Baja Densidad
HDL	=	Lipoproteínas de Alta Densidad
IRCT	=	Insuficiencia Renal Crónica Terminal
I-ECA	=	Inhibidores de ECA
SRA	=	Sistema Renina Angiotensina
SNP	=	Polimorfismo de un Solo Nucleótido

AGT = Angiotensinógeno

HTA = Hipertensión Arterial Esencial

RESUMEN

La diabetes (DT2) es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial y por supuesto en México, y a su vez, una complicación derivada de ésta enfermedad, que generalmente conlleva consecuencias fatales, es la nefropatía diabética (ND). Esta complicación causa enfermedad renal en etapa terminal, por la cual se han incrementado el número de individuos dializados y con requerimientos de trasplante renal, y por consiguiente la morbimortalidad tanto en México como en todo el mundo. Los costos generados por esta enfermedad crónica son muy elevados. Un marcador de daño renal es la microalbuminuria, empero, antes de que ésta se presente, en el riñón suceden cambios funcionales tal como la alteración de la velocidad de filtración glomerular y también cambios estructurales como ensanchamiento de la membrana basal glomerular y expansión del mesangio.

El angiotensinógeno es una alfa globulina sobre la que actúa la renina para dar angiotensina I. El sustrato de renina es sintetizado y liberado por el hígado. Ésta proteína es producida en el hígado, otros tejidos como el riñón, cerebro, corazón y tejido adiposo, que secretan angiotensina II, también sintetizan angiotensinógeno. La proteína mantiene estable la presión arterial y participa en la patogénesis de hipertensión esencial y preeclampsia. Las mutaciones en este gen están asociadas con la susceptibilidad de la hipertensión esencial y puede causar diagenesis renal tubular, un grave desorden en el desarrollo renal tubular. Se han reportado 245 polimorfismos presentes en el angiotensinógeno. Por tal

motivo, nuestro principal objetivo es estudiar la participación del polimorfismo C3889T del gen del angiotensinógeno con el desarrollo de la nefropatía diabética en una población mexicana.

En este trabajo se analizaron 460 pacientes diabéticos sin nefropatía (SND) y 350 con nefropatía (ND). El DNA genómico fue extraído de los leucocitos de sangre periférica, y la secuencia genómica que contiene el marcador C3889T del angiotensinógeno se amplificó por PCR en tiempo real, mediante sondas TaqMan en el equipo HT 7900. Los análisis estadísticos no indicaron una asociación del polimorfismo estudiado con el desarrollo de la nefropatía diabética, puesto que no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos SND y ND en la población en estudio ($p > 0.05$). Ninguna de las características clínicas y bioquímicas de la población estudiada mostró diferencias significativas en relación al genotipo.

1. INTRODUCCIÓN

La Asociación Americana de Diabetes (ADA) define a la diabetes como un grupo de enfermedades metabólicas de carácter heterogéneo caracterizada por concentraciones altas de glucosa sanguínea con grado variable de predisposición hereditaria y participación de diversos factores ambientales. La enfermedad se caracteriza por hiperglucemia persistente debido a la deficiencia en la producción o acción de la insulina, que afecta el metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos. Dada la incidencia de la misma, afecta a la población mundial, su desarrollo y economía.¹

En México, esta enfermedad representa uno de los principales problemas de salud pública. Nuestro país se ubica entre los que poseen mayor número de casos a nivel mundial. La perspectiva futura señala que se mantendrá el incremento en la cantidad de diabéticos. De acuerdo con la información disponible, el país ocupaba el décimo lugar mundial en 1995, con 4 millones de enfermos, y se estima que para el 2025, ocupará el séptimo lugar con 12 millones. En nuestro país, cada hora son diagnosticados 38 nuevos casos y la incidencia es mayor en pacientes de 60 a 90 años. Al año se registran 40 mil defunciones causadas por la diabetes, lo alarmante es que un tercio de la población afectada desconoce que la padece.²

La diabetes tipo 2 y sus complicaciones son un grave problema de salud en México. Las perspectivas actuales resultan alarmantes: la incidencia de la

enfermedad va en aumento, se presenta en edades más tempranas, el diagnóstico se establece en forma tardía y el tratamiento es, en muchas ocasiones, inadecuado. Aun cuando los beneficios de mantener un excelente control glucémico son ampliamente reconocidos, es difícil mantener conductas de autocuidado apropiadas y lograr los objetivos terapéuticos en la práctica clínica cotidiana. Es primordial contar con estrategias efectivas que contribuyan a la adherencia de los pacientes a su plan de tratamiento.³⁻⁵

Las cifras expresan un aumento de su frecuencia en relación directa con el incremento de la edad de la población, por lo que es posible prever que el problema se agravará gradualmente de acuerdo con el aumento de la esperanza de vida y que propiciará un número más elevado de individuos en riesgo, según el comportamiento demográfico que se observa en el territorio nacional.²

Las muertes que ocurren cada año en México a causa de la diabetes están relacionadas fundamentalmente con las complicaciones, entre las que destacan, por su frecuencia, la nefropatía, seguida de los trastornos de la circulación periférica, reflejando que la letalidad por complicaciones agudas ha disminuido con el uso de la insulina y de los hipoglucemiantes orales, los cuales han permitido la sobrevivencia de los enfermos por más tiempo, pero a la vez han propiciado el incremento de las complicaciones crónicas. De acuerdo con diversas fuentes, las complicaciones renales son la primera causa de hospitalización, seguida por los trastornos de la circulación periférica, las complicaciones neurológicas y

finalmente, las oftálmicas, lo que pone de manifiesto la falta de control estricto de la glucemia en el primer nivel de atención.²

2. ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA DIABETES

El estudio de la diabetes se ha desarrollado desde hace muchos años como se muestra en el siguiente listado:⁶

- Ebers (1552 a.C.). Fue quien realizó la primera referencia de la diabetes, en la que se describe la sintomatología y los remedios a base de determinadas decocciones.
- Apolonio de Memfis (16 d.C.). Acuñó el término de diabetes, para definir un estado de debilidad, intensa sed y poliuria; creía que era una forma de hidropesía.
- Arateus de Capadocia (163 d.C.). La describió como un padecimiento que conducía a un aumento de cantidad de orina.
- Medicina india (400 d.C.). Distinguía dos formas de diabetes: una que da a jóvenes delgados y que mueren (DT1) y otra en personas mayores y obesas (DT2).
- John Rollo (1796). Fue el primero en acuñar el término de diabetes “mellitus”, que significa “miel”, para diferenciar la enfermedad de otras formas de poliuria.
- Thomas Cawley (1788). Consideró de que la Diabetes mellitus tenía su origen en el páncreas.

- Paul Langerhans (1869). Observó racimos de células pancreáticas bien diferenciadas de las demás que podían ser separadas de los tejidos de los alrededores.
- Edouard Laguesse (1893). Sugirió que los racimos de células (islotes) descubiertos por Langerhans, constituían la parte exócrina del páncreas. Sus ideas fueron continuadas por Jean de Meyer quien denominó "insulina" a la sustancia procedente de los islotes y sugirió que debía poseer una actividad hipoglucemiante.
- H.D. Noyes (1832-1900). Observó que los diabéticos padecían una forma de retinitis.

3. GENERALIDADES DE LA DIABETES

La Diabetes es un trastorno en el que los niveles sanguíneos de glucosa son elevados dado que el organismo no libera insulina o la utiliza inadecuadamente. Las concentraciones de glucosa en sangre varían durante el día: aumenta después de cada alimento. Los valores de referencia (70-120 mg/dL) se recuperan al cabo de 2 horas. Los niveles normales tienden a aumentar ligeramente y de modo progresivo después de los 50 años, sobre todo en personas que llevan una vida sedentaria.⁷

La insulina, una hormona producida por el páncreas, es la principal sustancia responsable del mantenimiento de los niveles adecuados de glucosa en sangre, permite que ésta se transporte al interior de las células, para la producción de energía o que se almacene hasta que su utilización sea necesaria. La elevación de las concentraciones de glucosa en sangre después de comer o beber estimula el páncreas para producir insulina, la cual evita un mayor aumento de los niveles de glucosa y provoca su descenso gradual. Dado que los músculos utilizan glucosa para producir energía, los niveles disminuyen cuando se desarrolla alguna actividad física.⁷⁻¹³

4. CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES

La clasificación de la diabetes considera cuatro grupos:¹

1. Diabetes tipo 1 (DT1)
2. Diabetes tipo 2 (DT2)
3. Diabetes gestacional.
4. Otros tipos específicos de diabetes.

4.1 DIABETES TIPO 1 (Diabetes Insulinodependiente)

La DT1 está marcada por la destrucción de células β a través de un fenómeno autoinmune que conduce a la deficiencia absoluta de insulina, por lo que para sobrevivir, una persona con esta afección debe inyectarse insulina con regularidad.^{1, 7-13} Generalmente las primeras manifestaciones clínicas ocurren en la pubertad, como consecuencia de la pérdida de la función pancreática por lo cual es necesaria la insulino terapia para evitar la muerte del paciente. Este tipo de diabetes comprende entre el 5 y 10% de los casos del síndrome diabético.¹

A pesar de tratarse de una enfermedad con una alta prevalencia, sólo el 10% de todos los diabéticos tienen la enfermedad tipo I, la mayoría de los cuales, desarrollan la enfermedad antes de los 30 años.⁷

4.2 DIABETES TIPO 2 (Diabetes no Insulinodependente)

La DT2 se presenta con grados variables de resistencia a la insulina, pero se requiere también que exista una deficiencia en la producción de la misma, que puede o no ser predominante. Ambos fenómenos deben estar presentes en algún momento para que se eleve la glucemia. Aunque no existen marcadores clínicos que indiquen con precisión cuál de los defectos primarios predomina en cada paciente, el exceso de peso sugiere la presencia de resistencia a la insulina, mientras que la pérdida de peso, sugiere una reducción progresiva en la producción de la hormona.¹⁴

En esta enfermedad, el páncreas continúa produciendo insulina, incluso a niveles más elevados que los normales, sin embargo, el organismo desarrolla una resistencia a su efecto y el resultado es una relativa deficiencia de insulina.⁷ La cetoacidosis se presenta espontáneamente, pero se asocia a incrementos en el estrés o a alguna infección presentada por el paciente.¹ Por lo general, este tipo de diabetes comienza después de los 30 años y es más frecuente a partir de esa edad. Alrededor del 15% de los pacientes mayores de 70 años padecen diabetes tipo II y entre el 80 y 90% de las personas que la sufren, presentan en menor o mayor grado obesidad, asimismo ciertas etnias tienen un mayor riesgo de desarrollar este trastorno, lo antecedentes familiares son frecuentes entre quienes lo padecen.⁷

4.3 DIABETES GESTACIONAL

Este tipo de diabetes se origina por la resistencia a la acción de la insulina y la deficiencia relativa de la misma durante el embarazo que se inicia o reconoce por primera vez durante este proceso, aunque en la mayoría de los casos se trata de un estado transitorio, podría quedar permanente después del parto sobre todo cuando se tienen antecedentes de DT2.¹⁵

4.4 OTROS TIPOS DE DIABETES

Este grupo está integrado por diferentes patologías que se mencionan en la tabla 1:¹

TABLA 1. TIPOS ESPECÍFICOS DE DIABETES

DEFECTOS Y ENFERMEDADES	CAUSA DE DIABETES
Defectos genéticos en la función de la célula beta	Defectos de los cromosomas y del DNAm
Defectos genéticos en la acción de la insulina	Resistencia a la insulina.
Enfermedades del páncreas exócrino	Pancreatitis, trauma del páncreas, fibrosis.
Endocrinopatías	Hipertiroidismo, Acromegalia.
Inducción por fármacos	Acido nicotínico, glucocorticoides, hormonas tiroideas, tiazidas, fenitoína, etc.
Formas poco comunes de la diabetes mediada inmunológicamente	Anticuerpos contra el receptor de la insulina.
Infecciones	Rubeola congénita, citomegalovirus y otros.
Otros síndromes genéticos	Síndrome de Down y distrofia miotónica.

En nuestro país la Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-1994, modificada en el año 2000, hace referencia a la clasificación de la diabetes con

fines de diagnóstico y tratamiento, presentando los mismos cuatro grupos anteriores y separando cada uno de los subtipos de acuerdo a la alteración genética o complicación, según sea el caso. Ésta clasificación está disponible en <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/m015ssa24.html>.

5. ASPECTOS GENERALES DE LA DIABETES TIPO 2

Este tipo de diabetes se presenta en personas mayores de 30 años, principalmente en aquellas que sufren de obesidad, aquellas en las que, en sus antecedentes familiares esta enfermedad se ha presentado en una o más ocasiones, cabe destacar que no es exclusivo de personas mayores, ya que existen casos de niños y jóvenes que padecen DT2.⁷

Los primeros síntomas se relacionan con los efectos directos de la elevada concentración de glucosa en sangre. Cuando éste valor aumenta por encima de los 160 a 180 mg/dL, la glucosa pasa a la orina. Cuando el valor es aún más alto, los riñones secretan una cantidad adicional de agua para diluir las grandes cantidades de glucosa perdida, dado que producen orina excesiva, se eliminan grandes volúmenes de ésta (poliuria) y en consecuencia, aparece una sensación anormal de sed (polidipsia). Asimismo, debido a que se pierden demasiadas calorías en la orina, se produce una pérdida de peso y a modo de compensación, la persona siente a menudo un hambre exagerada (polifagia). Otros síntomas comprenden visión borrosa, somnolencia, náuseas y una disminución de la resistencia durante el ejercicio físico. Por otra parte, si la diabetes está mal controlada, los pacientes son más vulnerables a las infecciones.⁷⁻¹²

Este tipo de diabetes, puede cursar sin ningún síntoma durante años o décadas. Cuando la deficiencia de insulina progresa, los síntomas empiezan a manifestarse. Al principio, el aumento de la micción y de la sed, son moderados,

aunque empeoran gradualmente con el transcurso del tiempo. La hiperglucemia por tiempo prolongado puede producir deshidratación grave, confusión mental, somnolencia, convulsiones y una afección denominada como hiperglucémico hiperosmolar no cetónico.⁷

6. COMPLICACIONES DE LA DIABETES TIPO 2

La DT2 además de ser la primera causa de muerte, es la principal causa de demanda de atención médica en consulta externa, sus complicaciones son las principales causas de hospitalización y es la enfermedad que consume el mayor porcentaje del gasto de las instituciones de salud pública (alrededor de 20%). La diabetes es una enfermedad de muy alta prevalencia en México y es sin duda alguna, el mayor reto que enfrenta el sistema nacional de salud.¹⁵

A medida que el trastorno se desarrolla, las concentraciones elevadas de glucosa en la sangre lesionan los vasos sanguíneos, los nervios y otras estructuras internas. Se acumulan sustancias complejas derivadas del metabolismo de la glucosa en las paredes de los pequeños vasos sanguíneos, provocando su engrosamiento y rotura. Este aumento de grosor es la causa de que los vasos sanguíneos aporten cada vez menos sangre, sobre todo a la piel y a los nervios. Los valores de glucosa poco controlados tienden también a aumentar las concentraciones de sustancias grasas en la sangre, en consecuencia, se produce una arterioesclerosis acelerada (formación de placas en los vasos sanguíneos). La arterioesclerosis es de dos a seis veces más frecuente en los diabéticos que en los no diabéticos y se produce tanto en los varones como en las mujeres. La disminución de la circulación sanguínea, tanto por los vasos grandes como los pequeños, puede provocar alteraciones fisiológicas en el corazón, el cerebro, las piernas, los ojos, los riñones, los nervios y la piel, demorando además, la curación de las lesiones.¹⁶

La diabetes se presenta por igual en toda la población, independientemente de su nivel socioeconómico.¹⁷⁻¹⁸ El costo total estimado de la diabetes en el 2007 en Estados Unidos fue de 174 mil millones de dólares incluyendo 116 mil millones por expedición de medicamentos y 58 mil millones debido a la reducción de productividad.¹ El costo económico registrado más recientemente que implica la atención médica de la diabetes en México, fue del año 2004, en el cual los gastos ascendieron a 140,410 millones de pesos. Los costos por las complicaciones de la DT2, se encuentran distribuidos en mayor proporción hacia la nefropatía diabética.^{17, 19}

La diabetes implica la aparición de muchas complicaciones graves durante un tiempo prolongado, las afecciones coronarias y los accidentes vasculares cerebrales son muy frecuentes, los daños a los vasos sanguíneos del ojo pueden provocar la pérdida de la visión (retinopatía diabética). La función que cumplen los riñones se altera y da como resultado una insuficiencia renal que requiere diálisis (nefropatía diabética). Las lesiones nerviosas se manifiestan de varias maneras. Si un solo nervio funciona mal (neuropatía), aparece una debilidad característica en un brazo o una pierna. Si se dañan los nervios de la mano, las piernas y los pies (polineuropatía diabética), puede aparecer una sensación anómala en forma de hormigueo a dolor ardiente y debilidad en las piernas y brazos. Los daños a los nervios de la piel predisponen a las lesiones repetidas, porque la persona pierde la sensibilidad para percibir los cambios de presión o temperatura. Un aporte escaso de sangre a la piel también provoca úlceras e influye en que todas las heridas sanen muy lentamente. Las úlceras del pie pueden volverse tan profundas e

infectadas y resultar tan difícil su curación, que puede ser necesaria la amputación de una parte de la pierna.⁷⁻¹²

Hay indicios recientes que demuestran que las complicaciones de la diabetes se pueden evitar o retrasar, mediante el control de los niveles de glucosa en la sangre. Existen también otros factores desconocidos, incluyendo los genéticos, que determinan el curso de los acontecimientos.⁷

6.1 NEFROPATÍA DIABÉTICA

En general, la nefropatía diabética (ND) se caracteriza por una progresión en el deterioro de la función renal, que lleva al paciente a la diálisis renal o incluso al trasplante.¹⁷ Este término también se utiliza para señalar las lesiones renales originadas por afección microangiopática o de los pequeños vasos; es entonces, una complicación vascular crónica debida al descontrol hiperglucémico crónico que lleva a una serie de alteraciones funcionales y estructurales a nivel glomerular.²⁰

De los primeros cambios detectables en el curso de la ND es el engrosamiento del glomérulo (esto es una expansión de la matriz mesangial y aumento de la pared de los capilares), el riñón empieza a excretar más albúmina de lo normal,²¹⁻²³ lo que se puede detectar por pruebas como turbidimetría.²⁴

El daño renal provocado por la ND, habitualmente se diagnostica mediante marcadores y el principal, es la excreción de albúmina en orina. La

microalbuminuria es la etapa en la que se excreta de 30-300 mg/día de albúmina en ausencia de proteinuria detectable²⁵ y es la primera manifestación clínica de la nefropatía, inicialmente puede ser ocasional o condicionada por el ejercicio y/o embarazo lo que tiene poco valor predictivo,²⁶ al paso del tiempo, conforme la enfermedad progresa, se destruye un número creciente de glomérulos y se presenta la etapa de macroalbuminuria en la que la excreción de albúmina alcanza límites superiores a 500 mg/día.²²

En la progresión de la ND, la hipertensión se ha considerado un factor deletéreo importante. El tratamiento farmacológico está orientado a controlar la presión sanguínea empleando inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y de bloqueadores del receptor tipo 1 de angiotensina (AT1).²²

6.2 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN NORMAL RENAL

A diario, los riñones purifican unos 190 litros de sangre para filtrar aproximadamente 1.9 litros de desechos y exceso de agua que se convierten en orina la cual fluye a la vejiga a través los uréteres.

La orina es producida en el riñón mediante la eliminación selectiva de sustancias del plasma sanguíneo. Una posterior reabsorción controlada de agua, iones, sales, azúcares y otros hidratos de carbono, así como proteínas de bajo peso molecular, permite al riñón producir orina con una composición adecuada para el medio ambiente interno y las necesidades del organismo en cada momento.²³ El aparato urinario normal está compuesto por dos riñones, dos

uréteres, una vejiga y una uretra (en el hombre llamada uretra peneana) como se muestra en la figura 1:

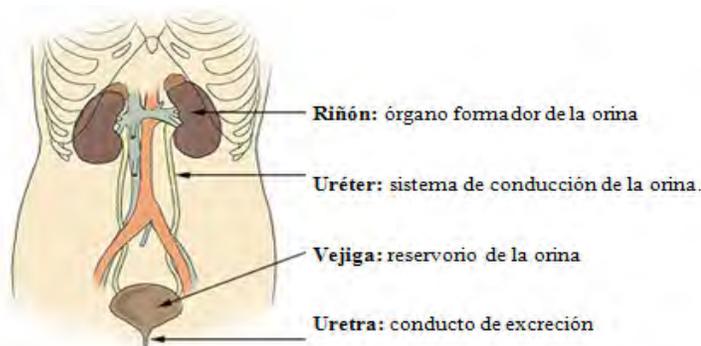


Figura 1. Componentes del sistema urinario²³

Cada riñón humano contiene 8-18 pirámides medulares, por lo que hay 8-18 papilas que terminan en los cálices colectores. Se tienen los dos sectores: la corteza (filtración) y la médula (concentración) y un hilio renal el cual está formado por: arteria renal, vena renal, pelvis renal y los uréteres. Las partes que constituyen un riñón se encuentran esquematizadas en la figura 2. La unidad anatómica y funcional del riñón es la **nefrona**. El riñón contiene de uno a dos millones de nefronas las cuales están formadas por dos sistemas: el glomerular y el tubular.²⁴

El sistema glomerular constituye una red de capilares especializados con un endotelio de 40nm de ancho con múltiples fenestraciones circulares de 40 a 100nm de ancho las cuales provienen de ramificaciones de la arteriola aferente mismos que se encuentran embebidos en una membrana basal especializada (mesangio y membrana basal glomerular GBM) formada por distintos componentes.²⁵

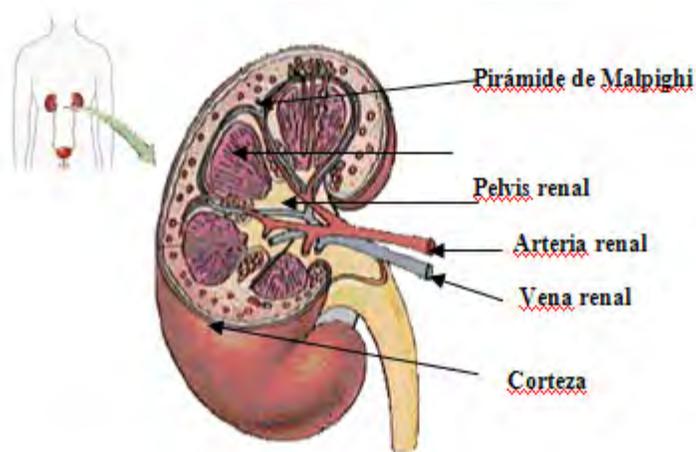


Figura 2. Partes que constituyen el riñón²³⁻²⁵

El glomérulo está formado por tres tipos celulares: células endoteliales, células mesangiales y podocitos, y los filtros consisten en tres capas de la pared capilar glomerular: el endotelio, formado por glucoproteínas polianiónicas proteoglicanos y proteínas microfibrilares;²⁶ la membrana o lámina basal glomerular, está constituida por glucoproteínas (laminina, colágeno tipo IV)²⁷ y proteoglicanos como son perlecano, con tres sectores, lámina rara interna (LRI), lámina rara externa rica en heparán sulfato y la lámina densa (LD);²⁸ y la abertura del diafragma localizada en los podocitos, los cuales son células planas de origen epitelial cubiertas por una capa de mucopolisacáridos aniónicos, también llamadas células epiteliales viscerales, las cuales forman parecido a un tapiz, que se encuentra altamente polarizado, lo que permite un ordenamiento en la distribución de enzimas, transportadores de iones, canales y poros.²⁹ El glomérulo está contenido en la **cápsula de Bowman**, la cual está formada por una membrana basal y un epitelio plano o células epiteliales parietales.

El sistema tubular es un conjunto de estructuras formadas por: el túbulo proximal, es el sector metabólicamente más activo de la nefrona, con tres segmentos (S1, S2 y S3); el asa de Henle, la cual es un regulador del índice de filtrado glomerular, está conformada por un conjunto de células conocidas como “mácula densa” donde tiene lugar el sistema renina-angiotensina-aldosterona y se reabsorben Cl^- , H_2O , y K^+ ; ³⁰ el túbulo distal, conformado por tres tipos de células diferentes que poseen muchas invaginaciones en la membrana y es altamente enrollado y rodeado por capilares; y el tubo colector, el cual presenta confluencia de orina desde la pelvis renal hasta la vejiga. ³¹

6.3 FACTORES DE RIESGO AL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD RENAL

Tiempo de evolución de la diabetes, la nefropatía aparece aproximadamente en el 50% de los pacientes después de 10 años del comienzo de la diabetes.

Hipertensión arterial éste es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la nefropatía. Casi el 100% de los diabéticos con nefropatía son hipertensos. Los pacientes que mantienen presiones arteriales por debajo o iguales a 120/80 con mucha probabilidad no desarrollarán nefropatía. La hiperglucemia con presiones arteriales bajas produce menos sobrecarga glomerular por lo que la esclerosis mesangial, atrofia tubular y engrosamiento de la membrana basal glomerular aparece más tardíamente.

Hemoglobina glucosilada. La prueba bioquímica que actualmente ha tomado relevancia es la determinación del porcentaje de hemoglobina glucosilada (HbA_{1c}), con respecto a la hemoglobina total. En individuos sanos la HbA_{1c} es inferior al 6% (126 (100-152) mg/dL de glucosa en promedio) y en pacientes diabéticos (con hiperglucemia) el porcentaje se incrementa. La importancia de controlar la HbA_{1c} radica en que diversos estudios han demostrado que una disminución en el porcentaje de esta es relevante para el control y prevención de las enfermedades crónicas de la diabetes tales como retinopatía y neuropatía. Hay una relación entre el grado de control de la glucemia medido por el porcentaje de hemoglobina glucosilada.³² Otras relaciones para el porcentaje de HbA_{1c} son 5% que corresponde a (97 mg/dL (76-120) mg/dL de glucosa en promedio) y 7% que corresponde a (154 mg/dL (123-185) mg/dL de glucosa en promedio).

Hiperlipoproteinemia. Acelera la aterosclerosis en la diabetes. La glucosilación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) las hace más receptivas a la oxidación y por lo tanto, más aterogénicas.³³

Obesidad. La obesidad complica la evolución de la nefropatía a través de un peor control de la hipertensión arterial, de la glucemia, elevación de los lípidos plasmáticos.³⁴ Además del aumento de la presión de filtración glomerular³⁵ hay otros factores asociados al daño renal como lo son tabaquismo e historia familiar de hipertensión.³³

6.4 GENÉTICA DE LA NEFROPATÍA DIABÉTICA

El incremento en la membrana basal glomerular y la expansión mesangial son marcadores de glomerulopatía, pero a nivel genético no se han identificado genes específicos involucrados en la ND. Se sabe que los factores de riesgo para el desarrollo de la nefropatía son hiperglucemia crónica y presión sanguínea elevada, sin embargo, algunos pacientes con pobre control del nivel de glucosa y baja presión sanguínea, no desarrollan la nefropatía y se ha observado la aparición de esta enfermedad en México-Americanos, al igual que en los indios Pima y África-Americanos, los cuales presentan altas frecuencias de insuficiencia renal crónica terminal (IRCT).³⁶⁻³⁷ Lo anterior sugiere que la hiperglucemia no es suficiente para que se desarrolle nefropatía, por lo tanto se deduce que la nefropatía está genéticamente determinada.^{18, 38} Los estudios de segregación familiar han mostrado que la herencia tiene un papel importante en la susceptibilidad a las complicaciones renales en el diabético.³⁹⁻⁴¹ Seaquist encontró una prevalencia del 83% en pacientes con diabetes cuyos hermanos habían desarrollado ND, mientras que la prevalencia fue del 17% en pacientes con diabetes y hermanos sin antecedentes de microalbuminuria. Quinn y Krolewski confirmaron este hallazgo y propusieron que la existencia del gen enzima convertidora de angiotensina (ECA) era la principal causante de la ND.⁴²

En la actualidad se sabe que la contribución de un gen único es limitada.⁴³⁻
⁴⁴ Para tratar de entender los factores genéticos, se han utilizado los siguientes enfoques: el de genes candidato, análisis de ligamiento, mapeo por asociación en

desequilibrio de mezclas, prueba de desequilibrio de transmisión. Utilizando este último enfoque, Kathrin G. et al. han propuesto 115 genes candidatos, en este trabajo propone 71 nuevos genes asociados a ND.⁴⁵ Sin embargo, se necesitan realizar más trabajos en el área genética, especialmente en relación a la combinación de genotipos y la interacción génica.⁴⁶

7. SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

El Sistema Renina-Angiotensina tiene un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis del medio interno y de la presión arterial. Este sistema hormonal, cuyo producto activo es la angiotensina II se compone de dos partes según el sitio de origen:⁴⁷

- Sistema Renina-Angiotensina endócrino-renal o sistémico: la angiotensina II generada, tiene como blancos principales al riñón, suprarrenales, vasos sanguíneos, corazón, cerebro y células sanguíneas.⁴⁷
- Sistema Renina-Angiotensina parácrino o autócrino: cumple funciones locales o regionales (corta distancia), se denominan también sistemas locales o tisulares, y se demostraron en corazón, vasos sanguíneos, cerebro, riñón y suprarrenales.⁴⁷

Los componentes de la cascada de este sistema, necesarios para la generación de angiotensina II son: la renina, el angiotensinógeno, y la ECA o convertasa; los órganos y tejidos que disponen de estos elementos, pueden producir angiotensina II. Esta hormona desarrolla sus funciones a través de receptores específicos (AT1 - AT2).⁴⁷⁻⁴⁹

La renina producida en las células yuxtaglomerulares del riñón convierte angiotensinógeno, derivado primeramente de hepatocitos, a angiotensina I

inactiva, la cual es entonces convertida a angiotensina II biológicamente activa como se muestra en la figura 3.⁴⁸



Fig.3. Química del sistema renina-angiotensina. Se muestra la secuencia de aminoácidos del extremo amino terminal de angiotensinógeno humano. R denota el resto de la molécula proteínica⁴⁸

7.1 ANGIOTENSINÓGENO

Es una alfa globulina que se encuentra en la posición 1q42-q43 del exón del cromosoma 1⁵⁰ (Fig. 4), sobre la que actúa la renina para dar angiotensina I. El sustrato de renina es sintetizado y liberado por el hígado. La secuencia de aminoácidos ha sido determinada por clonado molecular. Si bien esta proteína es producida en el hígado, otros tejidos que secretan angiotensina II sintetizan angiotensinógeno (riñón, cerebro, corazón, tejido adiposo). En la cascada metabólica para obtener angiotensina II, el angiotensinógeno no limita su síntesis.⁴⁸⁻⁵⁰

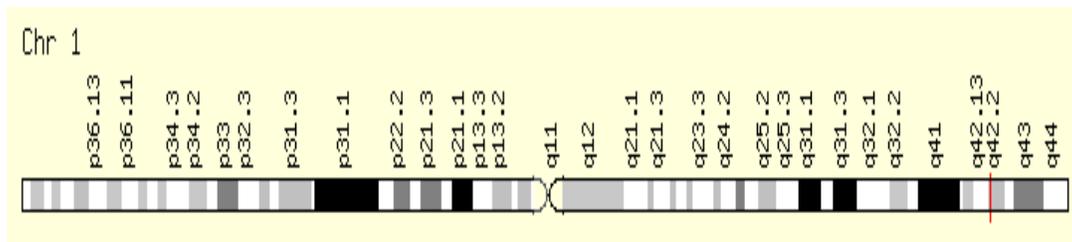


Fig. 4. Cromosoma 1⁴⁹

La proteína es involucrada en la estabilización de la presión arterial y en la patogénesis de hipertensión esencial y preeclampsia. Las mutaciones en este gen están asociadas con la susceptibilidad de la hipertensión esencial y puede causar diagénesis renal tubular, un grave desorden en el desarrollo renal tubular. Se han reportado 245 diferentes polimorfismos presentes en el angiotensinógeno.⁵¹

7.2 ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA

También llamada convertasa o quinasa II, es una gran proteína (1278 a.a.), que cataliza la conversión de angiotensina I a angiotensina II. Es una peptidil carboxipeptidasa poco específica, que rompe dipéptidos de sus sustratos; la angiotensina I (decapéptido), es convertida en angiotensina II (octapéptido).⁴⁸

Inactiva a las bradiquininas que son péptidos vasodilatadores, de esta acción dependen por lo menos dos efectos de los Inhibidores ECA (I-ECA).⁴⁸⁻⁵⁰

- Potencian el efecto hipotensor.
- Se ha incriminado la tos y el edema angioneurótico de los I-ECA con este bloqueo.

El sitio donde se produce la mayor tasa de conversión a angiotensina II, es el borde luminal endotelial del lecho vascular pulmonar; en menor escala en todo el lecho vascular y en aquellos órganos que producen angiotensina II localmente. En el plasma la actividad de ECA, es escasa.⁴⁸

7.3 ANGIOTENSINA I Y III

La angiotensina I prácticamente no tiene actividad fisiológica por su rápida conversión a angiotensina II. Cuando la convertasa está inhibida puede ejercer acciones similares a la angiotensina II, pero muy inferiores en cuanto a su potencia.⁴⁹

La angiotensina III, también ejerce acciones similares, e incluso, más potente que la angiotensina II pero su vida media es tan corta que sus efectos son débiles.⁴⁹

7.4 ANGIOTENSINA II

Esta hormona resultante de la cascada SRA tanto sistémica, como local cumple importantes funciones sobre varios órganos de la economía. Los blancos fundamentales son: el riñón, las suprarrenales y los vasos sanguíneos; a través de estos efectores, logra mantener una presión arterial, volemia y natremia adecuados a las necesidades fisiológicas del organismo.⁴⁹⁻⁵⁰

A nivel mesangial tiene una función tónica constrictora. En resumen, a nivel renal la angiotensina II tiene acciones vasculares, glomerulares, mesangiales y tubulares.⁴⁹

7.5 RECEPTORES DE ANGIOTENSINA II

La angiotensina II cumple su función fisiológica a través de receptores específicos. Se conocen dos tipos de receptores: AT1 y AT2. Los receptores AT1 se localizan en los riñones de los mamíferos adultos, principalmente en el glomérulo, túbulos corticales renales, células vasculares del músculo liso, células intersticiales medulares y ductos colectores. La estimulación de éste receptor produce retención de sodio, vasoconstricción, decremento en la tasa de filtración glomerular con hipertrofia en las células mesangiales, y por consiguiente disfunción renal, son más numerosos que los AT2; estos tienen una función trófica (de crecimiento), en embriones, no habiéndose descubierto su función en la vida extrauterina. Evidencia reciente indica que los receptores renales AT2 estimulan la dilatación de las arteriolas eferentes, disminuyen la hipertrofia de células mesangiales y tiene acción natriurética, sugiriendo un efecto benéfico con función opuesta a los receptores AT1.⁵¹⁻⁵²

8. MEDICINA GENÓMICA

El proyecto del genoma humano ha determinado la secuencia de los 3200 millones de nucleótidos del genoma humano y ha elaborado un mapa que ubica a los 30,000–40,000 genes con el cual se establecen las bases de lo que algunos han denominado medicina predictiva y medicina genómica.⁵³ La predisposición genética o susceptibilidad de las personas a una enfermedad no necesariamente significa que la vaya a contraer sino que éstas son el resultado de la pérdida de la homeostasis del organismo, ya sea por causas genéticas o ambientales, las primeras incluyen todos los cambios en la secuencia del genoma heredados o adquiridos y los segundos incluyen el resto de los factores del ambiente en el que se desarrolla el individuo, como una mala alimentación y la vida sedentaria.⁵⁴ El análisis del genoma humano ha permitido estudiar cerca de 1,000 genes causantes de enfermedades monogénicas y ha hecho evidente algunos de los polimorfismos o variaciones de un solo nucleótido (SNP).⁵⁵

9. VARIACIONES DEL DNA

Al completarse la secuenciación del genoma humano se ha incrementado el interés para identificar los cambios que se encuentran en el material genético. Ciertos cambios son de gran importancia clínica porque pueden estar asociados a padecimientos innatos o por exposición a determinados factores ambientales que pueden causar mutaciones.⁵⁶ La detección de estas variantes es la base central de la ciencia moderna de la genética molecular; al conocer la relación entre variaciones genéticas y funciones biológicas se vislumbran nuevos horizontes en áreas de la biología, evolución y patofisiología humana.⁵⁷

Las causas genéticas incluyen a todos los cambios en la secuencia del genoma humano sean heredados o adquiridos; los ambientales, incluyen al resto de los factores del medio ambiente en el cual se desarrolla el individuo, tales como alimentación, estilo de vida, exposición a agentes químicos o luz ultravioleta entre otros. En algunas enfermedades, como las monogénicas, los genes tienen un papel determinante en su fisiopatología. Sin embargo, las enfermedades multifactoriales como la diabetes, por su parte, se ven influenciadas tanto por componentes genéticos como ambientales.⁵⁸

La medicina genómica, definida como el uso rutinario de análisis genotípicos para mejorar el cuidado de la salud, tiene sus pilares en la capacidad de conocer los polimorfismos de un solo nucleótido ó SNPs de cada individuo y de modificar el medio ambiente en que se desarrolla.⁵⁹ De esta forma, la medicina

genómica dará como resultado una práctica médica más individualizada, predictiva y preventiva. Así será posible diagnosticar a cada individuo en forma pre-sintomática, lo que permitirá llevar a cabo medidas de atención a la salud que retrasen o eviten las manifestaciones clínicas, complicaciones y secuelas de las enfermedades comunes que tanto impacto tienen en la sociedad.⁶⁰⁻⁶¹

Tabla 2. Variaciones del DNA

Tipo	Consecuencia
IN/DEL	<p>Inserción/Delección</p> <p>Regiones cortas del DNA son perdidas o ganadas</p>
STR	<p>Repetidos cortos en tándem</p> <p>Pequeñas regiones de DNA (solo unas cuantas bases), son duplicados en lugares contiguos, son empleados ampliamente como marcadores para diferenciar entre individuos.</p>
VNTR	<p>Variantes en el número de repetidos en tándem</p> <p>Número variable de repeticiones, pueden ser tripletes</p>
SNP	<p>Polimorfismos de un solo nucleótido</p> <p>Es la causa más frecuente de variación del DNA en el genoma humano. Son cambios en una sola base nitrogenada con una frecuencia mayor del 1%.</p>

9.1 POLIMORFISMO DE UN SOLO NUCLEÓTIDO (SNP)

Al completarse el proyecto del genoma humano se ha facilitado la búsqueda y descubrimiento de millones de SNPs y su estudio en la asociación a enfermedades mono y poligénicas.⁶²

Un polimorfismo genético es toda aquella variación que se encuentra en la secuencia del DNA. Los SNPs son la variación de la secuencia de DNA que ocurre cuando un solo nucleótido se sustituye por otro en la secuencia del genoma. Para que una variación sea considerada un SNP, debe ocurrir por lo menos en el 1% de la población en estudio. Los SNPs constituyen cerca del 90% de toda la variación genética humana y se encuentran una vez cada 500–1,000 nucleótidos; sin embargo, existen regiones (hot spots) donde ocurren cada 100–300 bases, a lo largo de 3 mil millones de bases del genoma humano.⁶²

Los SNPs pueden ocurrir en regiones codificantes del gen (exones), en regiones no codificantes (intrones), en regiones promotoras y en sitios “splicing” del genoma. Muchos SNPs aparentemente no tienen ningún efecto sobre la función de la célula, pero se ha demostrado que otros podrían predisponer a enfermedad o modificar la respuesta a medicamentos.⁶³

10. SNPs DEL ANGIOTENSINÓGENO

En varios estudios se han investigado los polimorfismos del angiotensinógeno, los cuales pueden predisponer a pacientes con diabetes a desarrollar nefropatía, el genotipo TT del polimorfismo M235T ha sido asociado con nefropatía diabética en diabetes tipo 1,⁶⁴ mientras que otros estudios en diabetes tipo 1 y 2 no se ha encontrado dicha asociación.⁶⁵⁻⁶⁸ En estudios realizados a poblaciones asiáticas, específicamente a la Taiwanesa, se demostró que en personas con nefropatía diabética se observa una mayor frecuencia en la presencia del polimorfismo C3889T del angiotensinógeno que anteriormente no se habían reportado.⁶⁹ Aunque no se han reportado genotipos específicos del polimorfismo T174M asociados a la nefropatía diabética ni DT2, el genotipo TT de éste gen ha sido asociado a hipertensión arterial de una manera significativa en una población española,⁷⁰⁻⁷³ lo que sugiere su relación con fallas renales.

11. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La DT2 es una enfermedad crónica degenerativa que afecta a la población mundial, cuyo incremento es alarmante en años recientes por su alta morbilidad, la nefropatía diabética es su principal complicación, la cual es causante de falla renal en etapa terminal, seguida de los trastornos de la circulación periférica, la letalidad por complicaciones agudas ha disminuido con el uso de la insulina y de los hipoglucemiantes orales y han permitido la sobrevivencia de los enfermos por más tiempo, pero a la vez han propiciado el incremento de las complicaciones crónicas. Debido a que las causas genéticas de la nefropatía diabética no están bien definidas, es importante aportar más información que permita conocer el papel que tienen los polimorfismos de genes como el angiotensinógeno en la susceptibilidad al desarrollo de esta complicación de la diabetes, en particular en los habitantes de la Ciudad de México.

Se ha demostrado que los SNPs pueden afectar la actividad del gen, la estructura y función de las proteínas y esto puede influir en el riesgo del desarrollo de nefropatía diabética. Por lo anterior, es importante identificar la frecuencia del SNP C3889T del angiotensinógeno y determinar, mediante el análisis estadístico, si hay asociación entre la frecuencia de los genotipos y el desarrollo de nefropatía diabética.

12. OBJETIVO GENERAL

- Determinar la frecuencia del SNP C3889T (M235T; rs4762) del angiotensinógeno y su asociación con el desarrollo de nefropatía diabética en pacientes con DT2 de la ciudad de México.

12.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la frecuencia del SNP C3889T del angiotensinógeno en pacientes con DT2.
- Establecer si el C3889T del angiotensinógeno, se encuentra relacionado con las características antropométricas y bioquímicas que presenta el paciente diabético.
- Determinar si el C3889T del angiotensinógeno, está asociado con la nefropatía diabética.

13. HIPÓTESIS

Existe diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia del genotipo de riesgo TT al desarrollo de la enfermedad renal, entre el grupo con nefropatía diabética y el grupo sin nefropatía diabética.

14. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

14.1 TIPO DE ESTUDIO

Estudio transversal, comparativo y prolectivo.

14.2 POBLACIÓN EN ESTUDIO

Universo de trabajo. La población de estudio estuvo formada por derechohabientes del IMSS CMN siglo XXI, cuyo tamaño de muestra se basó en la frecuencia del alelo menor al 5%, por lo que se propuso que cada grupo de estudio estuviese formado por 400 pacientes, lo cual permitió detectar al menos un homocigoto para la variante del SNP C3889T, que teóricamente estuvo en equilibrio de Hardy-Weinberg. Esto es, **q** (alelo de menor frecuencia) igual a 0.0025, **qp** 0.095 y **p** de 0.9025. Así que $0.0025 \times 400 = 1$ individuo.

Los pacientes participantes conformaron dos grupos:

Grupo sin nefropatía diabética (SND): 460 pacientes de entre 45 y 70 años de edad, sin evidencia de albuminuria, con 10 años o más de diagnóstico de DT2.

Grupo con nefropatía diabética (ND): 350 pacientes de entre 45 y 70 años de edad, con 10 años o más de diagnóstico de DT2, con microalbuminuria (relación albúmina/creatinina en orina entre 30 a 300 mg/g, o con creatinina sérica \geq a 1.5 mg/dL) o con macroalbuminuria (relación albumina/creatinina

en orina mayor de 300 mg/g) que incluyó también a pacientes con terapia de diálisis.

A dichos pacientes se les determinaron las medidas antropométricas (cintura, cadera, talla y peso), con las cuales se obtuvo el índice de masa corporal e índice de cintura cadera; datos de hipertensión. Se tomó una muestra de sangre periférica con y sin anticoagulante para realización de las pruebas bioquímicas (glucosa, colesterol, creatinina, HDL, LDL) y obtención del DNA. A los dos grupos se les solicitó una muestra de orina para cuantificar albúmina.

El proyecto está registrado y aprobado por el Comité Local de Investigación del Hospital de Especialidades Siglo XXI, IMSS. Cada participante debió contestar un cuestionario de identificación y firmar una carta de consentimiento informado.

14.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.

Los pacientes se evaluaron, para su inclusión, con los siguientes criterios:

- Pacientes derechohabientes del IMSS.

GRUPO SND: DT2 sin evidencia de albuminuria

Criterios de inclusión:

- Diagnóstico de DT2 (ADA) de 10 años o más.
- Sexo indistinto.

- Edades comprendidas entre 45 y 70 años.
- Acepten participar en el estudio.
- Glucemia en ayuno \geq 126 mg/dL.

Criterios de exclusión:

- Pacientes consanguíneos.

Criterios de eliminación:

- Pacientes en los cuales no se hayan completado los estudios clínicos y bioquímicos correspondientes.
- Muestra sanguínea inapropiada para la determinación del genotipo (muestra contaminada, muestra insuficiente, extracción errónea de ADN).

GRUPO ND: Pacientes con DT2 y Nefropatía diabética.

Criterios de inclusión:

- Diagnóstico de DT2 (ADA) de 10 años o más.
- Sexo indistinto.
- Edades comprendidas entre 45 y 70 años.
- Acepten participar en el estudio.
- Glucemia en ayuno \geq 126 mg/dL.

- Microalbuminuria (relación albúmina/creatinina en orina entre 30 y 300 mg/g o con creatinina sérica \geq a 1.5 mg/dL).
- Macroalbuminuria (relación albúmina/creatinina en orina mayor a 300 mg/g) que incluye a pacientes con terapia de diálisis.

Criterios de exclusión:

- Pacientes consanguíneos.

Criterios de eliminación:

- Pacientes en los cuales no se hayan completado los estudios clínicos y bioquímicos correspondientes.
- Muestra sanguínea inapropiada para la determinación del genotipo (muestra contaminada, muestra insuficiente, extracción errónea de ADN).
- Pérdida de la muestra de DNA.

14.4 VARIABLES

Variable independiente:

- SNP C3889T del angiotensinógeno.

Variable dependiente:

- Presencia de la nefropatía diabética.
- Tiempo de evolución de la diabetes.

- Microalbuminuria.
- Macroalbuminuria.

14.5 METODOLOGÍA

Las técnicas realizadas en el procedimiento experimental fueron las siguientes:

EXTRACCIÓN DEL DNA

La extracción de DNA se realizó mediante columnas de QIAamp DNA Blood Midi/Kit Handbook (Qiagen, USA), las cuales se procesaron de acuerdo a las especificaciones del fabricante, como se indica:

Se resuspendió el paquete celular de leucocitos con PBS 1X y se agitó, se adicionó proteasa Quiagen, y regulador (AL), se mezcló e incubó. Posteriormente se adicionó etanol y se mezcló, se dejó reposar a temperatura ambiente y se agitó, se transfirió a una columna QIAamp Midi y se centrifugó. Al terminar, se descartó el filtrado y se colocó en el tubo de 15 mL, se adicionó el regulador de lavado (AW1) y se centrifugó. Posteriormente se adicionó el segundo regulador de lavado (AW2) y se centrifugó, enseguida la columna se retiró del tubo y se colocó en un tubo nuevo, y se incubó a 70°C, al enfriarse se adicionó el regulador de eluido (AE) al centro de la membrana, se incubó y centrifugó, se repitió este último paso y el DNA obtenido, se guardó en refrigeración.

CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL DNA

Para determinar la integridad del DNA obtenido, se preparó un gel de agarosa al 0.9% en TBE (Tris-Borato-EDTA 0.5M pH=8.0), y se adicionó bromuro de etidio, se colocaron en cada pozo del gel DNA y amortiguador de carga (azul de bromofenol y xilencianol en glicerol) y se realizó electroforesis. Después el gel se observó en el analizador de geles equipado con una fuente UV.

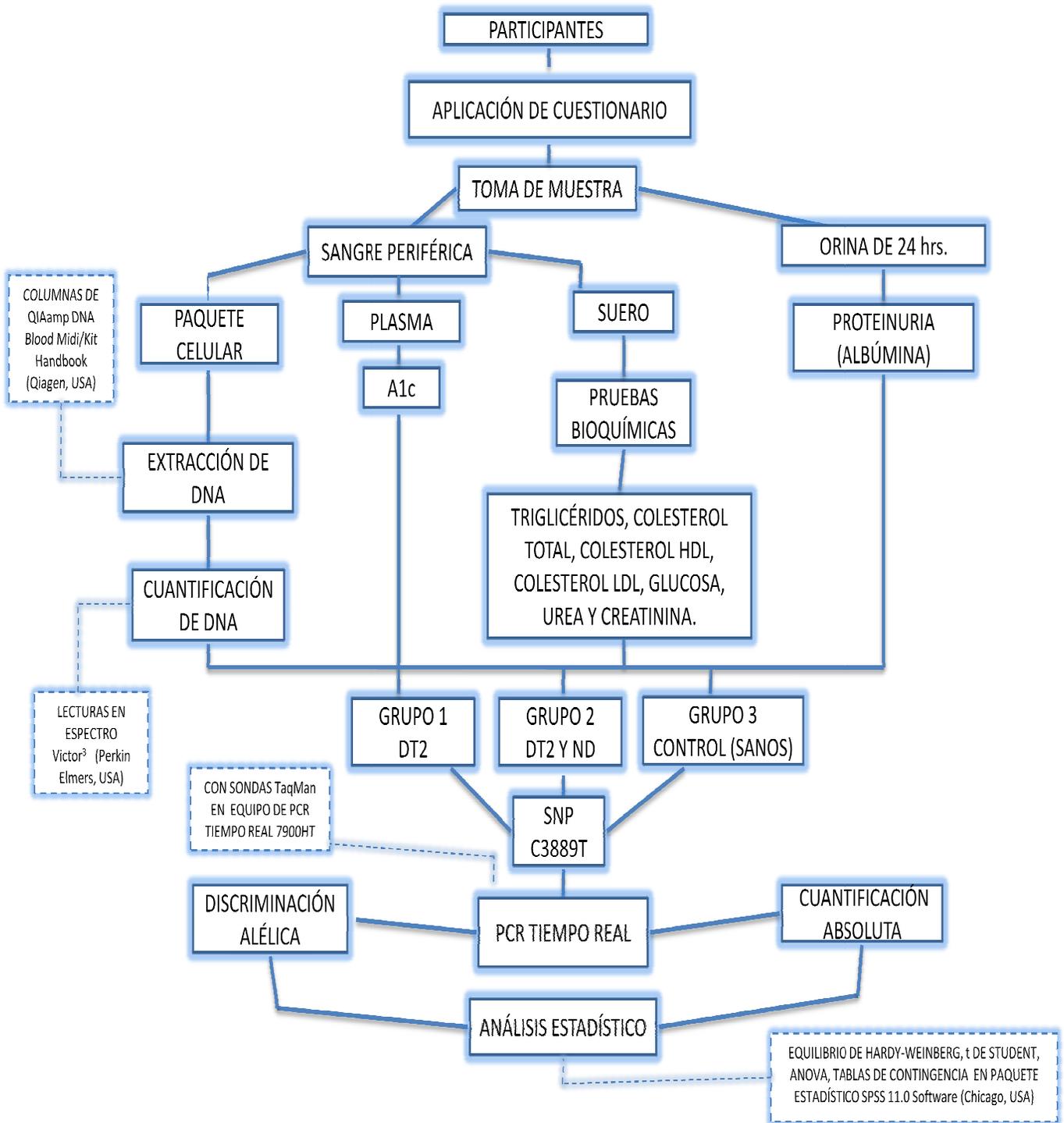
El DNA a cuantificar se homogenizó y se tomaron las lecturas correspondientes a 260 y 280 nm para cada muestra y calcular la concentración en el espectrofotómetro Victor³ (Perkin Elmers, USA).

AMPLIFICACIÓN POR PCR EN TIEMPO REAL DEL FRAGMENTO DEL SNP DEL GEN DEL ANGIOTENSINÓGENO

Se utilizó un DNA íntegro y con pureza de 1.7 a 2.0, se prepararon diluciones a una concentración de 20 ng/ μ L. Posteriormente, se preparó la mezcla de reacción con los reactivos de Applied Biosystems: Master Mix, sonda al 40X (Applied Biosystems: C___1985480_20), DNA y agua inyectable.

Se colocaron la mezcla y el DNA en cada pozo de la placa y ésta se selló con la cubierta. Se corrió la reacción de PCR, el 10% de las muestras se corrieron por duplicado.

15. DIAGRAMA DE FLUJO



16. DISEÑO ESTADÍSTICO

El equilibrio de Hardy-Weinberg para la distribución de genotipos se determinó por chi cuadrada. Se empleó la t de Student y ANOVA para el análisis de los datos bioquímicos y clínicos. Estos estudios de asociación SNP con albuminuria se llevaron a cabo con las tablas de contingencia 2x3 y se evaluó el riesgo en los expuestos. Un valor de $p < 0.05$ y α del 95%, se consideró significativo. Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 11.0 software.

17. RESULTADOS

Como primer paso se procedió a analizar las características clínicas y bioquímicas de los pacientes diabéticos con y sin nefropatía, mostradas en la tabla 3. Los pacientes del grupo SND (sin nefropatía diabética) tenían función renal normal y normoalbuminuria. Ambos grupos fueron similares de edad, duración de la diabetes, índice de masa corporal, proporción de géneros, hemoglobina glucosilada y colesterol ($P > 0.05$). Los grupos tampoco difirieron significativamente ($P < 0.05$) en cuanto a la presión arterial.

Tabla 3. Características clínicas y bioquímicas de la población estudiada.

CARACTERÍSTICA	SND (n= 460)	ND (n= 350)
EDAD (AÑOS)	59.0 ± 9.4	59.6 ± 9.0
DURACIÓN DE DIABETES (AÑOS)	17.0 ± 5.8	16.0 ± 7.6
ÍNDICE DE MASA CORPORAL	29.0 ± 4.7	27.6 ± 5.2
PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA (mmHg)	126.0 ± 18.0	134.0 ± 20.0
PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA (mmHg)	80.0 ± 9.0	89.0 ± 10.0
Ac1%	9.0 ± 2.2	8.7 ± 2.6
COLESTEROL TOTAL (mg/dL)	219.0 ± 45.0	220.0 ± 58.0
TRIGLICÉRIDOS (mg/dL)	229.0 ± 159.0	232.0 ± 142.0
COLESTEROL-LDL (mg/dL)	127.0 ± 34.0	129.0 ± 44.0
COLESTEROL-HDL (mg/dL)	46.0 ± 10.0	44.0 ± 16.0

Los datos son expresados como la media ± desviación estándar. Los datos no mostraron diferencias significativas $p > 0.05$.

SND= Sin Nefropatía Diabética

ND= Nefropatía Diabética

Posteriormente se analizaron las características de los pacientes en relación con los genotipos del gen del angiotensinógeno, esto se realizó para verificar influencia de un genotipo específico en alguna de las características bioquímicas. Todas la características fueron similares entre los pacientes que presentaron diferentes genotipos ($P>0.05$).

Las frecuencias encontradas tanto en los sujetos del grupo SND como los del grupo ND se presentan en la tabla 4. Las frecuencias de los sujetos sin y con nefropatía diabética fueron comparadas para verificar si un polimorfismo se encontraba en mayor proporción en un grupo que en otro, sin embargo no se encontró ninguna diferencia significativa ($P>0.05$).

Tabla 4. Distribución de genotipos del SNP C3889T de angiotensinógeno.

GENOTIPOS	SND n=460	ND n=350
CC	3.0	2.0
CT	20.0	24.0
TT	77.0	74.0
ALELOS		
C	0.13	0.14
T	0.87	0.86

Los datos son expresados en porcentaje
 SND= Sin Nefropatía Diabética
 ND= Nefropatía Diabética

18. DISCUSIÓN

Se realizó un estudio de 810 pacientes con DT2, incluidos 460 pacientes (hombres y mujeres) sin daño renal, agrupado como el grupo SND y 350 pacientes (hombres y mujeres) con daño renal, agrupados como el grupo ND. Ambos grupos se encuentran diagnosticados con DT2 desde hace por lo menos 10 años de evolución. En este estudio, el grupo de individuos con nefropatía tuvieron una edad semejante que el grupo con sólo DT2, sin embargo, no hubo diferencias significativas entre ambos grupos, al igual que no se encontraron diferencias significativas en edad, tiempo de evolución e índice de masa corporal.

En el presente trabajo se determinó la frecuencia del SNP C3889T del gen del angiotensinógeno que pudiese estar asociado con la aparición de la nefropatía diabética a consecuencia del padecimiento de DT2, que no han sido reportados con anterioridad.

La variante en el rs4762 del gen del angiotensinógeno no ha sido reportada como factor fundamental para el desarrollo o la predisposición a desarrollar la ND, sin embargo los genes de los componentes del sistema renina-angiotensina (RAS) han sido considerados prioritariamente como genes candidatos a estar asociados con la hipertensión arterial esencial (HTA) y por ende el posible desarrollo a una afección renal, ya que dicho sistema desempeña un papel crucial en la homeostasis de las sales y del agua y en el mantenimiento del tono vascular.⁴⁷ Dentro de los genes del RAS ha sido el del angiotensinógeno (AGT) el primero y el

más ampliamente estudiado, dado que existen varias observaciones compatibles con una relación directa entre el AGT y la presión arterial: correlación significativa entre las concentraciones plasmáticas de AGT y los niveles de presión arterial, descenso de la presión arterial tras la administración de anticuerpos anti-AGT, expresión del gen del AGT en tejidos directamente implicados en la regulación de la presión arterial, y el hecho de que la inducción de cambios en la expresión del gen del AGT en ratones de lugar a cambios en la presión arterial.⁷² Jeunemaitre y colaboradores encontraron en 1992 evidencia de ligamento entre el gen del AGT y la HTA en dos poblaciones (una de Utah y otra de París), utilizando un marcador altamente polimórfico localizado en el lado 3' del gen.⁷⁴ Tras este hallazgo, identificaron 15 polimorfismos dialélicos en el gen del AGT, de los cuales dos mostraron relación con la HTA en un estudio de asociación llevado a cabo en las mismas poblaciones. Estos dos polimorfismos dialélicos fueron el T174M (presencia de treonina o de metionina en la posición 174 de la proteína debida a la presencia de C o de T en la posición +521 del gen) y, sobre todo, el M235T (presencia de metionina o de treonina en la posición 235 de la proteína debida a la presencia de T o de C en la posición +704 del gen). Las variantes 235T y 174M fueron las que se asociaban con HTA. Los autores concluyeron, que estos polimorfismos podrían tener una implicación directa en los niveles de presión arterial.⁷⁴

Así entonces, el análisis realizado con las diferentes características clínicas y bioquímicas de la población estudiada no mostró ninguna diferencia significativa con respecto al genotipo.

19. CONCLUSIONES

- ❖ No hay diferencias significativas en los parámetros bioquímicos ni en las frecuencias genotípicas entre los grupos SND y ND en el polimorfismo C3889T.
- ❖ El polimorfismo C3889T del gen del angiotensinógeno no presentó alguna asociación significativa en la progresión de la nefropatía diabética. Tampoco presentó una diferencia significativa con la presión arterial.

20. PROPUESTAS

En la actualidad la identificación de SNPs es una de las bases de la biología molecular moderna y es la técnica más minuciosa para la determinación de variantes genéticas a nivel de DNA.

A pesar de que en este trabajo se identificó un SNP y no se asoció a alguna de las características bioquímicas y antropométricas de la población diabética con daño renal, aun debe realizarse otras investigaciones a nivel de estructura y función de proteína, estudios histológicos a nivel renal; y se propone que en estudios posteriores de pacientes DT2 con nefropatía y sin nefropatía, se amplíe el estudio a un número mayor de muestras y con grupos más homogéneos.

21. REFERENCIAS

1. American Diabetes Association. Implications, of the Diabetes control and complications trail. Diabetes Care. 2008:S88-90.
2. Kuri M., Vargas C., Zárate H., Juárez V. La diabetes en México. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud, 2001.
3. Lerman I., Gómez-Pérez FJ, Quibrera R. Epidemiology of diabetes in Mexico. En: Ekoe JM, Zimmet P, Williams R. The epidemiology of diabetes. And international perspectives. Baffins Lane, Chichester, West Sussex, England:John Wiley and Sons Ltd. 2001; pp 177-186.
4. Bennet-Johnson S. Methodological issues in diabetes research. Measuring adherence. Diabetes Care 1992;15:1658-1667.
5. Kurtz SM. Adherence to diabetes regimens: Empirical status and clinical applications. Diabetes Educator. 1990;16:50-56
6. Historia de la diabetes
[http://www.iqb.es/d_mellitus/historia/historia05.htm]
7. Berkow R., Beers M. Manual Merck de Información Médica para el Hogar. Ed. Oceano. España. 1998;748-754.
8. Owen R., McCarthy M. Type 1 and type 2 diabetes-chalk and cheese? Diabetología. Oxford 2009.
9. Rodríguez Rial JM. Diabetes mellitus tipo 2 en la infancia y la adolescencia BSCP Can Pet. 2006;30:21-24.
10. Jean M. Unraveling the causes of diabetes. Science. 2002;296:686- 689.

11. División y prevención y control de enfermedades programa de enfermedades no – transmisibles Organización Panamericana de la Salud Organización Mundial de la Salud. Iniciativa de diabetes para las América (DIA): plan de acción para América Latina y el Caribe 2001 – 2006 [en línea]: México, 2001 <<http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/NC/DIA-Plan-de-Accion-01-06.PDF>> [consulta: 13 noviembre 2009].
12. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus Report. *Diabetes Care*. 2002;1:1-32.
13. Guías ALAD 2000 para el diagnóstico y manejo para la Diabetes mellitus tipo 2 con medicina basada en evidencia. *Rev. Asoc. Latinoam. Diab.*; 2001; supl. 1, ed. Extraordinaria.
14. Hernández M., Zárate A. Conceptos recientes en la etiopatogenia de la diabetes gestacional. *Ginecol Obstet. México*. 2005;73:371-377
15. Rodríguez Rial J.M. Diabetes Mellitus Tipo 2 en la infancia y adolescencia *BSCP Can Ped*.2006;30:21-24.
16. Gugliucci A. glycation as the glucose link to diabetic complications. *JAOA*, 2000;100:621-634.
17. Meléndez H., Sánchez D., Ramírez P., Cravioto A., Cervantes E. Diabetes mellitus: aspectos modernos de la problemática *Rev Fac Med UNAM*. 2007; 50:121-24.
18. Caramori MLA, Mauer M: Pathophysiology of renal complications. In: *Ellenberg and Rifkin's Diabetes Mellitus*, 6th Ed., edited by Porte D Jr, Sherwin RS, Baron A, New York, McGraw-Hill. 2003;697–722.

19. Arredondo A, Zúñiga A. Economic consequences of epidemiological changes in diabetes in middle income countries. *Diabetes Care*. 2004; 27:104–109.
20. Ha H., Lee HB. Oxidative stress in diabetic nephropaty: basic and clinical information. *Curr Diab Rep*.2001; 1:282-297.
21. Singh R., Song R., Alavi N., Pegoraro A., Singh A., Leehey D.. High glucose decreases matrix metalloproteinase – 2 activity in rat mesangial cells via transforming growth factor-beta 1. *Exp. Nephrol*. 2001;9:249.
22. Torres A., Castillo Z. Nefropatía diabética: *Revista del Hospital General Doctor Manuel Gea González*. 2002;5:24-32.
23. NIDDKD National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Los riñones y su funcionamiento U.S. Department of Health and Human Services, 2006;1-13.
24. Venkatachalam MA, Kriz W. *Anatomy of the kidney. En Heptinstall's Pathology of the Kidney, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1998;3-66.*
25. Farquhar, M.G, Kanwar, Y.S. Characterization of anionic sites in the glomerular basement membranes of normal and nephrotic rats. In *Renal pathophysiology*. A. Leaf, G. Giebisch, L. Bolis, and S. Gorini, Raven Press. 2006;1:57–74.
26. Savige Judy, Rana Kesha, Tonna Stephen, Buzza Mark, Dagher Hayat, Wang Yan Yan Thin basement membrane nephropathy *Kidney International*, 2003; 64: 1169–1178.
27. Xia L., Wang H., Goldberg H.J., Munk S., FAntus I.G., Whiteside. Mesangial cell NADPH oxidase upregulation in high glucose is protein kinase C

- dependent and required for collagen IV expression. *Am J. Physiol Renal Physiol*, 2006; 290:F345-56.
28. Mahan John D, Sisson-Ross Susan, Vernier Robert. Glomerular basement membrane anionic charge site changes early in aminonucleoside. Nephrosis *Am J Pathol*, 1986; 125:393-401.
29. Takemoto Minoru, He Liqun, Norlin Jenny, Jaakko Patrakka, Xiao Zhijie, Petrova Tatiana, Bondjers Cecilia, Asp Julia, Wallgard Elisabet, Sun Ying, Samuelsson Tore, Mostad Petter, Lundin Samuel, Miura Naoyuki, Sado Yoshikazu, Alitalo Kari, Quaggin Susan E, Tryggvason, Karl, Betsholtz Christer. Large-scale identification of genes implicated in kidney glomerulus development and function. *The EMBO Journal*, 2006; 25:1160–74.
30. Siu Brian, Saha Jharna, Smoyer William E, Sullivan Kelli A, Brosius III Frank C. Reduction in podocyte density as a pathologic feature in early diabetic nephropathy in rodents: Prevention by lipoic acid treatment *BMC Nephrology*, 2006; 7:(6):1-11
31. NKUDIC 2006 (National Kidney and Urologic Diseases Information Clearinghouse). 2006; 1-5.
32. Torres Vitoria A, Zacarias Castillo R, Nefropatia Diabetica *Rev. Hosp. Dr M Gea Gonzalez*, 2002; 5:24-27.
33. Satko Scott G., Sedor John R, Iyengar Sudka K, Freedman Barry I. Familial clustering of chronic kidney disease. *Seminars in Dialysis* 2007; 20(3):229-36.
34. Mullally S., Wilkinson R, O'Donoghue D., Bakran A. Diabetes hipertensión y enfermedades cardiovasculares. *CKD* 2005; 1-4.

35. Diz-Lois Martínez Fernando. Guías Clínicas: Nefropatía diabética, 2003; 3:11-16.
36. Guzmán J., Madrigal B. Revisión de las características clínicas, metabólicas y genéticas de la Diabetes mellitus; Bioquímica. 2003; 28: 14-23.
37. Benitez A., Cormín J, Ricart Y, González MT, Cortés M, Roca M, Díaz MC, Ramos M. Diabetic Nephropathy. Rev. Esp. Med. Nucl. 2002; 21(1): 6-12.
38. Torres V., Zacarías C. Nefropatía Diabética Rev. Hosp. Dr M Gea Gonzalez. 2002; 5: 24-27.
39. Soriano Cabrera F. Definición y clasificación de los estadios de la enfermedad renal crónica. Prevalencia. Claves para el diagnóstico precoz. Factores de riesgo de enfermedad renal crónica. Nefrología. 2004; 234:28-34.
40. Freedman B., Bostrom M., Daeihagh P., Bowden D. Genetic factors in diabetic nephropathy. Clin J Am Soc Nephrol. 2007; 2: 1306-1316.
41. Find G. Genetic Determinants of Diabetic Nephropathy: The Family Investigation of Nephropathy and Diabetes. The family investigation of nephropathy and diabetes research group. J Am Soc Nephrol. 2003; 14: S202–S204.
42. Fava S., Hattersley A. The role of genetic susceptibility in diabetic nephropathy: evidence from family studies. Nephrol Dial Transplant. 2002; 17:1543–1546.
43. Kodl C., Seaquist R., Practical strategies to normalize hyperglycemia without undue hypoglycemia in type 2 diabetes mellitus. Current diabetes reports. 2008; 8:375-82.

44. Satko S., Sedor R., Iyengar K., Freedman B. Familial clustering of chronic kidney disease. *Seminars in Dialysis*. 2007; 20:229-36.
45. Gnudi L., Thomas SM., Viberti G. Mechanical forces in diabetic kidney disease: a trigger for impaired glucose metabolism. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18: 2226-2232.
46. Quinn M., Angelico M., Warram J., Krolewski A. Familial factors determine the development of diabetic nephropathy in patients with IDDM. *Diabetología*. 1996; 39: 940–945.
47. Mogensen Carl E. Genetics and diabetic Renal Disease. *Diabetes Care*. 2003; 26: 1-7.
48. Lindner T., Monks D., Wanner C., Berger M. Genetic aspects of diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2003; 84:S186 –S191L.
49. Gogolin E., George R., Sharma K., Ziyadeh F., Spielman R. Assessment of 115 Candidate Genes for Diabetic Nephropathy by Transmission/Disequilibrium Test. *Diabetes*. 2005; 54: 3305.
50. Lupia E., Ellit S., Lenz O., Zheug F., Hattori M., Striker G., Striker J. IGF-1 decreases collagen degradation in diabetic NOD mesangial cells: Implications for diabetic nephropathy. *Diabetes*. 1999; 48: 1638–1644.
51. Jacoben P., Tarrow L., Carstensen B., et. al. Genetic Variation in the Renin-Angiotensin System and Progression of Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2003; 14: 2848-2850.
52. Osawwa N., Koya D., Araki S., et. al. Combinational effect of genes for the renin angiotensin system in conferring susceptibility to diabetic nephropathy. *J Hum Gent*. 2007; 52: 143-151.

53. Luño J. Sistema renina Angiotensina en la nefropatía diabética. *Nefrología*. 2005; 25: 73-81.
54. Ruiz O., Gómez G., Larg, et. al. El sistema renina angiotensina en la enfermedad renal progresiva. *Nefrología*. 1998; XVIII: 30-36.
55. Pérez D., Hiriart M., Olivares R., Robles D. Receptores para la angiotensina II diferentes a los clásicos receptores membranales AT1 y AT2: Características y su papel en el funcionamiento celular. *Rev. de Educación Bioquímica*. 2006; 25: 55-60.
56. Griffiths A, Wessler S, Lewontin R, Gelbart W, Susuki D, Miller J. *Introduction to genetic analysis*. 8th ed. Freeman and company, 2005; 611-679.
57. Indap Amit R, Gabor T Marth, Craig A Struble, Tonellato Peter, Michael Olivier1 Analysis of concordance of different haplotype block partitioning algorithms. *BMC Bioinformatics*, 2005; 6(303): 1-13.
58. Abrisqueta JA. Genes y discriminación. *Revista de Derecho y Genoma humano*.1999; 11:155-63.
59. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt S, Kakol J, Stein L, Marth G, Sherry S, et al: A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001, 409(6822):928-933.
60. Villalobos Torres Ma. De Carmen. Frecuencias alélicas de tres marcadores genéticos polimórficos en una muestra de la población del noreste de México. *El DNA y sus estudios en el individuo*. Tesis de Maestría. 2006, 1-130.

61. Jiménez-Sánchez G. Implicaciones Médicas y Sociales del Genoma Humano en la Sociedad Mexicana. En: Musik-Asali GA and Medina-Gonzalez S (eds): *México 2020: Retos y perspectivas.*, Ed. Mexico D.F., CONACyT, 1999.
62. NCBI
<<http://www.genecards.org/cgiin/carddisp.pl?gene=AGTR2&search=agtR2>>
[consulta: septiembre 2009].
63. Abrisqueta J. Genes y discriminación. *Revista de derecho y genoma humano.* 1999; 11: 155-156.
64. Medicina genómica: el inicio de una nueva era en la práctica médica. [Consulta 2009] [<http://www.uag.mx/27/genética/genómica.PDF>]
65. Sachidanandam R., Weissman D., Schmidt S., Kakol J., Stein L., Marth G., Sherry S., et al. A map of human sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature.* 2001; 409: 928-933.
66. Sevilla S. Metodología de los estudios de asociación genética. *Insuficiencia cardiaca.* 2007; 2:1-5.
67. Higasa K., Hayashi K. Periodicity of SNP distribution around transcription start sites. *BMC Genomics.* 2006; 7: 1-8.
68. Fogarty DG, Harron JC, Hughes AE, Nevin NC, Doherty CC, Maxwell AP. A molecular variant of angiotensinogen is associated with diabetic nephropathy in IDDM. *Diabetes.* 1996; 45: 1204-1208.
69. D. Ritz E. Angiotensinogen gene M235T polymorphism is not associated with diabetic nephropathy. The Diabetic Nephropathy Study Group. *Nephrol Dial Transplant.* 1996; 11: 1755-1761.

70. Tarnow L, Kjeld T, et al. Lack synergism between long-term poor glycaemic control and three gene polymorphisms of the rennin angiotensin system on risk of developing diabetic nephropathy in type 1 diabetic patients. *Diabetología*. 2000; 43: 794-799.
71. Wong TY, Chang JC, Poon E, Li PK. Lack of association of angiotensin converting enzyme (DD/II) and angiotensinogen M235T gene polymorphism with renal function among Chinese patients with type II diabetes. *Am J Kidney Dis*. 1999; 33: 1064-1070.
72. Orsio S. Gene polymorphism of the renin-angiotensin system and progression of diabetic nephropathy. *Journal of nephrology*. 1999; 12: 9-17.
73. Marco J, Zabay JM, García-Marco MA, Gómez G, et al. Polimorfismo T174M del gen del angiotensinógeno: relaciones opuestas con la hipertensión arterial esencial y con la obesidad en una población homogénea de Mallorca (Islas Baleares). *Nefrología*. 2005; 25: 629-636.
74. Jeunemaitre X, Inoue I, Williams C, Charru A, Tichet J, Powers M, Sharma AM, Gimenez-Roqueplo A-P, Hata A, Corvol P, Lalouel J-M: Haplotypes of angiotensinogen in essential hypertension. 1997; *Am J Hum Genet* 60: 1448-1460.

22. ANEXO

METODOLOGÍA DETALLADA

EXTRACCIÓN DE DNA

Para la extracción de DNA se realiza mediante columnas de QIAamp DNA Blood Midi/Kit Handbook (Qiagen, USA) y se procesan de acuerdo a las especificaciones del fabricante, que son las siguientes:

Resuspender el paquete celular de leucocitos con 2 mL de PBS 1X y agitar vigorosamente en vortex, adicionar 200 µL de proteasa Quiagen, y 2.4 mL de regulador (AL), mezclar nuevamente en vortex, incubar a 70°C durante 4 horas en agitación constante (mezclar en vortex cada dos horas por periodos de 15 segundos). Posteriormente adicionar 2 mL de etanol y mezclar en vortex durante 15 segundos. Dejar la muestra durante 10 minutos a temperatura ambiente y agitar en vortex por 15 segundos. Transferir 4 mL de la mezcla anterior a una columna QIAamp Midi y colocar en un tubo de centrifuga de 15 mL, centrifugar a 3000 rpm durante 4 minutos a temperatura ambiente. Al terminar, descartar el filtrado y adicionar el volumen restante de la mezcla, centrifugar a 3000 rpm durante 4 minutos a temperatura ambiente. Remover la columna, descartar el filtrado y colocar la columna otra vez en el tubo de 15 mL, adicionar 2 mL de regulador de lavado (AW1) y centrifugar a 4100 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente adicionar 2 mL del segundo regulador de lavado (AW2) y centrifugar a 4100 rpm durante 20 minutos a temperatura

ambiente, después quitar la columna del tubo e incubar a 70 °C durante 10 minutos y al enfriarse colocar la columna en un tubo de centrifugación nuevo de 15 mL, adicionar 300 µL del regulador de eluido (AE) (previamente calentado a 40 °C) al centro de la membrana. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos y centrifugar a 4100 rpm durante 6 minutos a temperatura ambiente, agregar de nuevo 300 µL de AE, incubar 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente centrifugar a 4100 rpm durante 6 minutos a temperatura ambiente.

CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL DNA (FEIKE 1998)

Homogenizar el DNA a cuantificar y realizar una dilución de cada muestra 1:10. Tomar las lecturas correspondientes a 260 y 280 nm para cada muestra y calcular la concentración en el espectrofotómetro Victor³ (Perkin Elmers, USA). Las muestras que aceptadas para estudios posteriores son aquellas que tengan por lo menos 50 µg/mL de DNA. Calcular el cociente de las lecturas obtenidas a 260 nm y 280 nm con el fin de determinar la pureza, éste deberá ser de entre 1.8 y 2.0.

Una vez realizada la extracción, cuantificación y determinación de la pureza del DNA, realizar la prueba de integridad con objeto de observar la presencia ó ausencia de degradación, con la siguiente técnica:

Preparar un gel de agarosa al 0.9% en TBE (Tris-Borato-EDTA 0.5M pH=8.0), y adicionar 0.6 µL de bromuro de etidio (0.5 mg/mL), colocar en el pozo

del gel 2 μ L de DNA y adicionar 2 μ L de amortiguador de carga (azul de bromofenol y xilencianol en glicerol). Cargar el gel colocando 4 μ L de la mezcla y realizar electroforesis a 80 voltios por 1 hora. Después observar el gel en el analizador de geles equipado con una fuente UV (BIO-RAD modelo ET9970623-54).

AMPLIFICACIÓN POR PCR TIEMPO REAL DEL FRAGMENTO DEL SNP DEL GEN DEL ANGIOTENSINÓGENO

Utilizar la sonda TaqMan (Applied Biosystems, California USA), esta sonda está marcada con los fluoróforos VIC para el alelo "1" y FAM para el alelo "2" de acuerdo a la siguientes coordenadas (alelo X y Y se refieren a su ubicación espacial en las gráficas que da como resultados el equipo).

TÉCNICA TAQMAN PARA SNPS EN EL SOFTWARE S.D.S. VERSIÓN 2.2.2 PARA EL EQUIPO 7900HT

Utilizar un DNA íntegro y con la pureza adecuada, preparar diluciones de cada muestra de DNA a una concentración de 20 ng/ μ L. Es importante que las muestras tengan concentración uniforme para que se agrupen en los tres genotipos posibles: homocigotos 1, heterocigotos, homocigotos 2.

Posteriormente, preparar la mezcla de reacción con los reactivos de Applied Biosystems:

2.5 μL de Master Mix.

0.125 μL de sonda al 40X.

DNA 1 μL (20 ng/ μL), el rango va de 5-30 ng/ μL .

Agua inyectable: ajustar a 6 μL .

Nota: La Master Mix contiene el buffer, los dNTPs y la Taq Polimerasa.

Colocar 4.2 μL de la mezcla y 1 μL de DNA en cada pozo (uno por muestra) y se sellar con la cubierta. Correr con las siguientes condiciones de PCR.

Inicial (Hold)	2 min	50 °C
Steps (Hold)	10 min	95 °C
Melting	15 seg	95 °C
Alineación /extensión	1 min	60 °C
Número de ciclos:	45	

Termal Cycler Protocol Standar

Nota: Correr por duplicado el 10% de las muestras.

**PROGRAMACIÓN PARA DISCRIMINACIÓN ALÉLICA EN EL SOFTWARE
S.D.S. VERSIÓN 2.2.2 PARA EL QUIPO 7900HT DE APPLIED
BIOSYSTEMS.**

Paso para obtener una representación gráfica de los alelos.

Encender la computadora y el equipo de PCR en tiempo real 7900HT. Una vez que el equipo se haya estabilizado, acceder al programa S.D.S 2.2.2.

Seleccionar una plantilla nueva, aparece una ventana con varias opciones (cuantificación absoluta, discriminación alélica) y opciones de calibración como: Background (realizar cada mes ó cada semana dependiendo de el uso de el equipo) Pure Spectra (calibración) entre otras. Elegir la opción de cuantificación absoluta (Absolute Quantification), y seleccionar toda la placa.

Adicionar el detector, los NTC (No Template Control) y colocar como referencia pasiva a Rox, posteriormente abrir la pestaña "instrument", para verificar las condiciones de PCR ya mencionadas. Una vez terminada, guardar en un archivo para verificar resultados.

Al término de la cuantificación absoluta, abrir una plantilla nueva y seleccionar la opción de discriminación alélica y agregar el marcador, NTC y referencia pasiva (ROX). Guardar para verificar resultados.

Una vez terminado, abrir la plantilla de cuantificación absoluta y seleccionar la opción "instrument", dar click en "open/close", colocar la placa (previamente

cargada con la mezcla y DNA) en el brazo robótico y se dar clic nuevamente en “open/close”, cerrado el equipo, seleccionar “Start” y esperar alrededor de 2 hrs para que el equipo termine la reacción de PCR-tiempo real.

Una vez concluida la reacción de PCR, abrir la plantilla de discriminación alélica, en la pestaña de “instrument” dar click en “Post Read” y esperar alrededor de 2 min para que realice una lectura completa de la placa.

Realizar la revisión de resultados de ambas corridas.

FUNDAMENTO DE LAS SONDAS TaqMan

Una sonda Taqman es un oligonucleótido cuya secuencia es complementaria a la región central del amplicón. Tiene una secuencia de 13 a 18 nucleótidos que presenta en el extremo 5' una marca fluorescente (reportero) y en el extremo 3' un quencher o apagador que anteriormente era TAMRA (actualmente se utilizan apagadores no fluorescentes) de tal forma que cuando estas dos moléculas se encuentran unidas por la sonda, toda la fluorescencia emitida por el reportero, es absorbida por el apagador, por lo que la fluorescencia global observada es igual a cero, a este fenómeno se le conoce como FRET de Förster (o Fluorescent Resonant Energy Transfer). Las sondas Taqman, que tienen una T_m mayor que los primers, por lo que durante la etapa de alineación, la primera en unirse a su secuencia específica es la sonda, y posteriormente los primers, de tal forma que cuando la DNA polimerasa se une al extremo 3' del primer e inicia la elongación, en su paso se encuentra con la sonda y la degrada dada su actividad

exonucleasa 5'-3'. Al ser degradada, libera al reportero del apagador lo que suprime el fenómeno FRET y la fluorescencia emitida puede ser determinada por el sistema de detección. Dado que la fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de sonda degradada, y esta a su vez es proporcional a la cantidad de templado generado, este sistema permite visualizar el incremento de amplicón a lo largo de la reacción de PCR. La reacción se esquematiza en la figura 5.

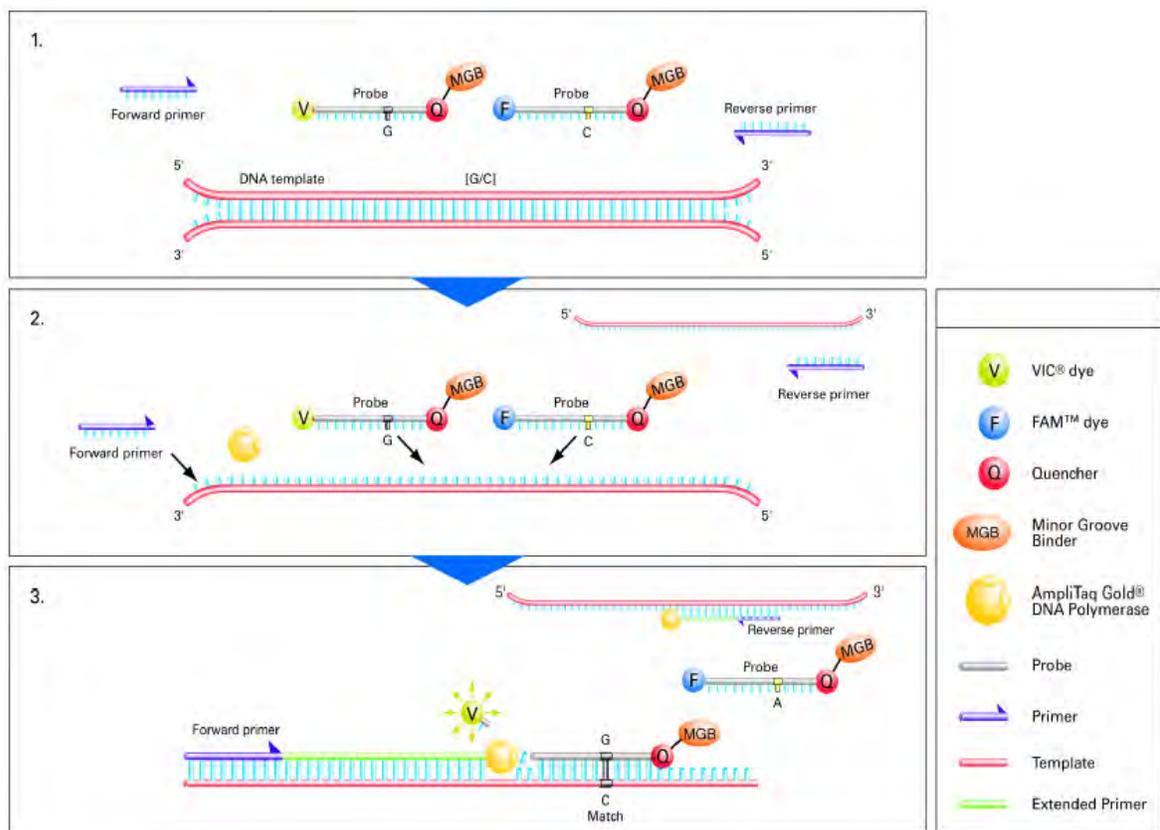


Figura 5. Discriminación alélica con sondas TaqMan. 1. DNA molde y componentes de la reacción, 2. Desnaturalización del DNA y alineamiento de las sondas, 3. Polimerización y generación de la señal. Cuadro de la derecha, leyenda.



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Fecha:

Folio:

“Análisis de Polimorfismos asociados a Diabetes Tipo 2”

La finalidad del estudio, es comprender por qué la diabetes y sus complicaciones ocurren con tanta frecuencia en nuestra población. Se me informó que mi participación consistirá en: contestar cuestionarios sobre mis hábitos y costumbres, enfermedades pasadas y presentes relacionadas con hipertensión, diabetes y cardiopatías. Se me practicará un examen médico completo que incluye: exploración física (medición de peso, talla, cintura cadera y presión arterial); estudios de laboratorio que consisten en la toma de muestras de sangre venosa, para medir glucosa, lípidos y de esa toma se me extraerá DNA para estudiar los genes que evaluaremos como marcadores predictivos a padecer diabetes tipo 2 o alguna de sus complicaciones.

El investigador principal y su grupo de médicos expertos se han comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento, así como responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos y beneficios; además de informarme de los resultados de la investigación.

Entiendo mi identidad es confidencial y que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte, ni perjudique la atención médica que recibo del Instituto, y que puedo consultar cualquier duda sobre este proyecto con el Dr. Miguel Cruz López, Jefe de la Unidad de Investigación Bioquímica, del Hospital de Especialidades del CMN-SXXI o al teléfono 5627-6900 ext. 21477.

Nombre y firma del paciente

Nombre y firma del investigador

Testigo 1

Testigo 2

Declaro que al obtener la firma de este documento, estoy enterado y acepto las obligaciones que conlleva la obtención de Consentimiento bajo información de un paciente.