



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

IDENTIFICACIÓN DE SNPs ASOCIADOS A DT2 QUE MODIFICAN LA UNIÓN DE PROTEÍNAS AL DNA

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

MIRIAM HERNÁNDEZ CASTAÑEDA

DIRECTOR: DR. FERNANDO SUÁREZ SÁNCHEZ

ASESORA: DRA. RAQUEL RETANA UGALDE



CDMX

AGOSTO 2017.



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

A **mi madre** por apoyarme en cada paso que doy, por impulsarme a siempre seguir adelante, enseñarme a no darme por vencida en ningún momento, por contribuir en gran medida a mi formación personal y profesional, porque no sólo eres mi madre, eres como una hermana y la mejor amiga que podría tener.

A **mi hermano** por brindarme su apoyo incondicional en cada una de mis decisiones y confiar en mí, y sobre todo porque a pesar de la distancia siempre estás con nosotras.

A **mis tíos y tías** por su apoyo, cariño, consejos, sobre todo por creer en mí y compartir logros como éste.

Al **Dr. Fernando Suárez** por brindarme la oportunidad de concluir este proyecto, por su confianza, paciencia y apoyo.

A la **Dra. Raquel Retana** por proporcionarme los conocimientos académicos y por su apoyo para lograr concluir este trabajo.

A la **Dra. Rocío Suárez, Dra. Clara Ortega, M en C. Raúl Barzalobre y al Dr. Jaime Gómez** por brindarme su experiencia profesional, apoyo y consejos para finalizar este trabajo.

A **mis amigas** por escucharme cada vez que lo necesitaba, por sus palabras de aliento y por creer en mí, Sandra, Yamile, Ángeles, Diana, Joselyn y Erika, son increíbles personas, a veces lejanas pero siempre siento su apoyo.

A las **doctoras, compañeros y amigos** de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica muchas gracias por permitirme ser parte de este gran equipo y por hacer de mi estancia en el laboratorio una bonita experiencia. Sus conocimientos, apoyo incondicional y consejos me ayudaron mucho a concluir mi trabajo. Dra. Margarita, Dra. Rebeca, Mari Carmen, Abigail, Elizabeth, Georgina, Vanessa, Gloria, Ema, Rafael, Aldo, Miguel Alexander, Miguel Ángel, Diego, Sarai, David, Osiris, Aaron, Miguel, Diana, Karina, Ale, Lety, Francisco, Erika y Mtra. Martha gracias por todos aquellos momentos de pláticas y risas.

Y sobre todo gracias a dios por brindarme la oportunidad de conocer a todas estas personas maravillosas al ponerlas en mi camino y permitirles que compartieran un ratito de su vida conmigo.

Este trabajo es un logro compartido con todos ustedes,

Muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al **Apoyo Financiero para el Desarrollo de Protocolos de Investigación en Salud del IMSS** por el financiamiento del proyecto “Análisis de la variación en la expresión y splicing del mRNA en pacientes con diabetes tipo 2 y participantes sanos” con clave de registro FIS/IMSS/PROT/G14/1333.

A la **Unidad de Investigación Médica en Bioquímica** del Hospital de Especialidades “Bernardo Sepúlveda Gutiérrez”, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, por permitirme realizar mis experimentos en sus instalaciones.

A la carrera de **Química Farmacéutico Biológica** de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por brindarme los conocimientos para mi preparación académica.

DEDICATORIA

Todos mis logros son dedicados a la persona que más amo en mi vida, mi mejor amiga y madre, Miriam Castañeda. Eres la persona más increíble en mi mundo, siempre estás conmigo, en los peores y mejores momentos. Me enseñaste los mejores valores que una persona puede tener para salir adelante en la vida, respeto, honestidad, perseverancia, humildad, tolerancia, bondad, amistad y amor son algunos de ellos. Me enseñaste a superar cada obstáculo y luchar por mis sueños sin rendirme en ningún momento.

A mi hermanito Noe, siempre apoyándome de todas las formas posibles, tus palabras de aliento, cariño y tu confianza me han ayudado a salir adelante, te amo y extraño demasiado.

A mi papá Joel Hernández, mi abuelito Max, mi tío Jesús y mi abuelita Teresa, daría lo que fuera para que estuvieran conmigo viendo culminar este bonito logro, sin embargo, su ausencia me enseña a ser fuerte cada día y luchar contra lo que sea para cumplir mis más grandes sueños.

A mi familia Castañeda por poner toda su fe en mí, su apoyo hacia mi madre y hacia a mí contribuyeron en gran medida a finalizar satisfactoriamente esta gran meta. Sus consejos y ese enorme cariño que me han ayudado a continuar luchando por lo que quiero en la vida.

A mi familia Hernández porque a pesar de la distancia siento su apoyo y cariño. Estoy segura que festejan conmigo este bonito logro.

A los más pequeños de mis dos familias, Regina, Antonio, Josué, Ángel, Edgar, Karen, Kim, Christopher, Kevin, Memphis, Dianita, Moni, Lenin, Polet, Said, Yair,

Azul y los dos Ian, recuerden que los sueños son posibles sólo si realmente los desean, siempre luchen por cumplirlos y vivirlos al máximo.

Y a todos los que me regalaron una sonrisa, un abrazo o un simple “todo va a salir bien” siempre que lo necesitaba.

Todos ustedes creyeron en mí y de cada uno he aprendido infinidad de cosas. Concluir esta etapa de mi vida es una maravillosa experiencia y compartirla con ustedes es un privilegio.

*“No debemos tener miedo a equivocarnos,
hasta los planetas chocan y del caos nacen estrellas”.*

Charles Chaplin.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ABREVIATURAS	iv
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. MARCO TEÓRICO	7
3.1. Aspectos generales de la diabetes.....	7
3.2. Diabetes Tipo 2.....	7
3.3. Epidemiología	9
3.4. Páncreas.....	9
3.5. Fisiopatología.....	13
3.6. Expresión génica.....	16
3.6.1. Transcripción	18
3.6.2. Traducción.....	22
3.6.3. Unión proteína-DNA	25
3.7. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs).....	29
3.8. Desequilibrio de ligamiento	31
3.9. <i>TGF-β1</i>	32
3.10. <i>SIRT1</i>	36
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	39
5. HIPÓTESIS.....	41
6. OBJETIVOS.....	41
6.1. Objetivo General	41
6.2. Objetivos específicos	41
7. MATERIALES Y MÉTODOS	42
7.1. Material Biológico.....	42
7.2. Extracción de RNA.....	43
7.3. Tratamiento con DNAsa.....	44
7.4. Síntesis de cDNA.....	45
7.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final.....	46
7.6. Diseño de oligonucleótidos de doble cadena	46
7.7. Alineación de oligonucleótidos	48

7.8.	Extracción de proteínas nucleares	48
7.9.	Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	49
7.10.	Ensayo de Cambio en la Movilidad Electroforética (EMSA)	50
7.10.1.	Gel de poliacrilamida	50
7.10.2.	Preparación de reacciones de unión	51
7.10.3.	Electroforesis.....	52
8.	RESULTADOS.....	53
8.1.	Expresión de <i>SIRT1</i> y <i>TGF-β1</i>	53
8.2.	Proteínas nucleares de células BxPC-3	56
8.3.	Oligonucleótidos de DNA	57
8.4.	Ensayo de Cambio de Movilidad Electroforética (EMSA)	58
9.	DISCUSIÓN	62
10.	CONCLUSIÓN	71
11.	PERSPECTIVAS.....	72
12.	ANEXOS	73
13.	REFERENCIAS.....	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de la diabetes de acuerdo a la ADA	8
Figura 2. Anatomía del páncreas adulto humano	10
Figura 3. Representación esquemática de los tipos celulares en el páncreas	11
Figura 4. Secreción de insulina por las células β pancreáticas.....	13
Figura 5. Transporte de glucosa por insulina	14
Figura 6. Elementos que componen a un gen	17
Figura 7. Representación del proceso de expresión génica	17
Figura 8. Secuencias que regulan el proceso de transcripción.....	19
Figura 9. Inicio de la transcripción.....	20
Figura 10. Elongación y terminación del proceso de transcripción	22
Figura 11. Proceso de traducción.....	25
Figura 12. Unión de un regulador de la transcripción al DNA.....	26
Figura 13. Motivos estructurales de los factores de transcripción.....	27
Figura 14. Características de las proteínas	28
Figura 15. Motivos de secuencia.....	28
Figura 16. Representación esquemática de un SNP.....	30
Figura 17. Entrecruzamiento durante la meiosis	31
Figura 18. Señalización TGF- β 1/Smads.....	35
Figura 19. Morfología de células BxPC-3 de adenocarcinoma pancreático	43

Figura 20. Integridad del RNA	54
Figura 21. Tratamiento con DNAsa	55
Figura 22. Expresión de <i>TGF-β1</i> y <i>SIRT1</i>	55
Figura 23. Regresión lineal de la curva estándar de Albúmina de Suero Bovino ...	57
Figura 24. Oligonucleótidos de DNA biotilizados.....	58
Figura 25. Oligonucleótidos de DNA no biotilizados	58
Figura 26. EMSA para el rs1800470 del gen <i>TGF-β1</i>	60
Figura 27. EMSA para el rs3758391 del gen <i>SIRT1</i>	60
Figura 28. EMSA para el rs932658 del gen <i>SIRT1</i>	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Células de los islotes de Langerhans y hormonas secretadas	12
Tabla 2. Criterios de diagnóstico para diabetes de acuerdo a la ADA	16
Tabla 3. Condiciones de PCR de punto final	45
Tabla 4. Condiciones para síntesis de cDNA	45
Tabla 5. Secuencia de oligonucleótidos	47
Tabla 6. Curva estándar con Albúmina de Suero Bovino	49
Tabla 7. Reacciones de unión para el Sistema Control EBNA	51
Tabla 8. Reacciones de unión para el Sistema de Prueba	51
Tabla 9. Características del RNA extraído	53
Tabla 10. Absorbancias de la curva estándar con Albúmina de Suero Bovino	56
Tabla 11. Concentración de la proteína nuclear de las células BxPC-3	57

ABREVIATURAS

A	Adenina	FADH	Flavín adenín dinucleótido reducido
HbA1C	Hemoglobina glucosilada	FID	Fundación Internacional de la Diabetes
ADA	Asociación Americana de Diabetes	Foxo1	Caja de horquilla O1
Akt	Quinasa serina/treonina	G	Guanina
AR	Artritis reumatoide	GK	Glucoquinasa
ATP	Adenosin trifosfato	GLUT-2	Transportador de glucosa 2
BSA	Albúmina de Suero Bovino	GLUT-4	Transportador de glucosa 4
C	Citosina	GWAS	Estudios de asociación del genoma completo
Ca ²⁺	Ión calcio	G6pase	Glucosa 6 fosfatasa
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario	LAP	Péptido asociado a la latencia
CDT	Dominio carboxiterminal	LD	Desequilibrio de ligamiento
CNV	Variación del número de copias	LEG	Lupus eritematoso generalizado
DEPC	Dietilpirocarbonato	iRNA	Ácido ribonucleico interferente
DNA	Ácido Desoxirribonucleico	MgCl ₂	Cloruro de magnesio
DT2	Diabetes tipo 2	miRNA	Micro Ácido ribonucleico
EBNA	Antígeno nuclear de Epstein Barr	mM	milimolar
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
EMSA	Ensayo de cambio de movilidad electroforética	mTorc2	Complejo 2 de blanco mecanístico de rampicina
ENSANUT	Encuesta nacional de salud y nutrición		

siRNA	Ácido ribonucleico de silenciamiento	SIRT1	Sirtuína 1 deacetilasa dependiente de NAD
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia	SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
NaCl	Cloruro de sodio	T	Timina
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido	TAE	Tris, ácido acético y EDTA
ND	Nefropatía diabética	TBE	Tris, ácido bórico y EDTA
pb	pares de bases	TBP	Proteína de unión a TATA
PBS	Buffer salino de fosfato	TβRI	Receptor de TGF-β tipo 1
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	TβRII	Receptor de TGF-β tipo 2
PDX1	Secuencia de DNA implicada en el desarrollo pancreático y duodenal 1	TGF-β1	Factor de crecimiento transformante beta 1
Pepck	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
PP	Polipéptido pancreático	U	Uracilo
PPAR-γ	Receptor de peroxisoma proliferador activado gamma	UCP2	Proteína de desacoplamiento 2
p27	Proteína inhibidora de cinasa	YY1	Factor de transcripción Yin Yang 1
RI	Resistencia a la insulina		
RNA	Ácido ribonucleico		
rNTP	Ribonucleótido trifosfatado		
RT-PCR	Transcriptasa inversa-PCR		
SFB	Suero Fetal Bovino		

1. RESUMEN

Un gran porcentaje de enfermedades crónicas se debe en gran medida a factores ambientales y factores genéticos como los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). Los SNPs son las variantes genéticas más comunes encontradas en el genoma humano y consisten en el cambio de una sola base en el DNA. Este cambio entre otras consecuencias puede provocar alteraciones en la expresión génica y con ello desencadenar y/o aumentar el riesgo de desarrollar una gran variedad de enfermedades entre las que destaca la DT2. Sin embargo, los mecanismos que provocan dichas alteraciones no están del todo estudiados. Trabajos previos en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Especialidades, C.M.N S.XXI, IMSS indican que el rs1800470 y rs3758391 se asocian con diferencias en la expresión de los genes *TGF- β 1* y *SIRT1*. Es por ello que en este trabajo se evaluó si los polimorfismos rs1800470 del gen *TGF- β 1*, rs3758391 del gen *SIRT1* (ambos asociados a DT2) y el rs932658 que se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el rs3758391, alteran la unión de proteínas al DNA, un paso relevante durante la expresión génica. Para lograr esto, se realizaron Ensayos de Cambio en la Movilidad Electroforética (EMSAs) empleando oligonucleótidos de alrededor de 30 pb que contenían los dos alelos de los tres SNPs en estudio. Los resultados mostraron que no existe unión de proteínas nucleares de las células BxPC-3 (derivadas de adenocarcinoma pancreático) a oligonucleótidos de DNA que contenían el alelo ancestral y el alelo variante para los rs1800470, rs3758391 y rs932658. Esto sugiere que en páncreas, los SNPs estudiados no se localizan en regiones importantes para la

unión de proteínas reguladoras de la transcripción y por lo tanto debe seguirse estudiando el mecanismo por el cual estos SNPs modifican la expresión génica.

2. INTRODUCCIÓN

La diabetes tipo 2 (DT2) es el tipo de diabetes más común entre la población adulta. Aparece cuando el páncreas no produce suficiente insulina, se desarrolla resistencia a la insulina (RI) o ambas¹. Esto genera un incremento de la glucosa sanguínea y una variedad de complicaciones si esta hiperglucemia no es controlada. En 2015, 415 millones de adultos en el mundo padecían diabetes; sin embargo, se prevé que esa cifra aumente a 642 millones para el año 2040, según la 7ª edición del Atlas de la Diabetes de la Fundación Internacional de la Diabetes (FID)². La DT2 es considerada una enfermedad multifactorial y los factores genéticos juegan un rol muy importante en su susceptibilidad.

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés) son las variantes genéticas más comunes encontradas en el genoma humano y consisten en el cambio de una sola base en el DNA (Adenina, Timina, Guanina, Citosina). Los SNPs se han asociado a una gran variedad de enfermedades tales como cáncer, obesidad, DT2, asma, lupus eritematoso generalizado (LEG), artritis reumatoide (AR), entre otras³. Estos cambios pueden provocar, entre otras alteraciones, modificaciones en la expresión génica. Durante la iniciación de la síntesis del mRNA, los factores de transcripción juegan un papel regulador al interactuar con regiones específicas del DNA que regulan la transcripción. El cambio de bases en estas regiones del DNA puede modificar positiva o negativamente la interacción proteína-DNA y detener el proceso de expresión génica o aumentar la síntesis del mRNA.

Hoy en día los Estudios de Asociación del Genoma Completo (GWAS, por sus siglas en inglés) han revelado asociaciones entre SNPs en diferentes regiones del

genoma y varias enfermedades⁴. Sin embargo, la asociación de una enfermedad con un determinado SNP no necesariamente significa que éste sea el polimorfismo funcional o causal de la enfermedad, ya que existe la posibilidad de que el SNP funcional esté en desequilibrio de ligamiento con el SNP asociado. El desequilibrio de ligamiento implica el intercambio de un conjunto de SNPs durante el entrecruzamiento en la meiosis, es decir, estos SNPs se heredan en bloque (haplotipo) y por lo tanto, al estudiar alguno de ellos es posible “predecir” el cambio de base (A, G, C, T) de los otros⁵.

En la actualidad se han identificado un gran número de SNPs asociados a DT2. Conocer cuáles de ellos genera alteraciones sobre la expresión génica y las modificaciones en los sistemas de regulación, ayudaría a dilucidar parte de los mecanismos que intervienen en el organismo para que se presente la DT2. En este trabajo se estudiaron polimorfismos de un solo nucleótido localizados en los genes *TGF-β1* (rs1800470) y *SIRT1* (rs3758391 y rs932658). El gen *TGF-β1*, ubicado en el cromosoma 19, codifica a la proteína TGF-β1 que pertenece a la superfamilia de factores de crecimiento transformante β de las citocinas. Esta proteína, entre otras funciones, participa en la regulación de la proliferación, diferenciación y apoptosis celular, modulación de la expresión y activación de factores de transcripción, y síntesis y depósito de proteínas de matriz extracelular en varios órganos⁶. Hathaway CK *et al.* (2015) y algunos otros investigadores han descrito que una elevada expresión de *TGF-β1* influye en la presencia de Nefropatía Diabética (ND), una complicación común en pacientes con DT2⁷. Estos resultados son respaldados por estudios de asociación entre el rs1800470 (869 T>C) y pacientes con ND⁸⁻¹¹. Estos trabajos reportan los genotipos CC y CT

asociados a susceptibilidad de ND en asiáticos, caucásicos y africanos. Valladares A *et al.* (2010) encontraron en población Mexicana que la frecuencia de los genotipos CC/CT para 869 T>C es mayor en pacientes con ND que en aquellos que no presentan ND y que la razón de momios (OR, por sus siglas en inglés) es de 1.818 cuando se compara con el genotipo TT (CI_{95%}=1.128-2.930, p=0.016) bajo un modelo dominante¹².

Por otro lado, el gen *SIRT1* codifica una proteína de la familia de las sirtuinas, homólogas a la proteína Sir2 de levadura. SIRT1 interviene en la diferenciación y proliferación celular, biogénesis mitocondrial, resistencia al estrés, apoptosis, metabolismo energético y silenciamiento de la cromatina. Luu L *et al.* (2013) y otros investigadores han reportado que SIRT1 participa en el proceso de secreción de insulina y tolerancia a la glucosa¹³. Investigaciones previas en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica localizada en el Hospital de Especialidades, “Dr. Bernardo Sepúlveda Gutiérrez”, en Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social reportan una elevada expresión de *TGF-β1* y *SIRT1* en presencia del genotipo TT (aproximadamente dos veces más que el genotipo CC) y genotipo TT (aproximadamente dos veces más que el genotipo CC) para el rs1800470 y rs3758391, respectivamente, en una población mexicana de niños^{14,15}. Por otro lado, en una población mexicana de adultos sanos y pre diabéticos se observaron resultados muy parecidos a los anteriores, ya que el aumento estadísticamente significativo de la expresión de *TGF-β1* se asoció con los genotipos TT (p=0.005) y CT (p=0.047) al compararlos con el genotipo CC, mientras que la expresión de *SIRT1* se eleva con la presencia del genotipo TT comparado contra el genotipo CC (p=0.001)¹⁶. Hu Y *et al.* (2015) reportaron

resultados similares estudiando al rs3758391 en *SIRT1* en una población china. Ellos demostraron que la expresión de *SIRT1* es significativamente más elevada con el genotipo TT que con los genotipos TC y CC en pacientes sanos¹⁷. El rs3758391 se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el rs932658, por lo que en este trabajo se estudió su posible efecto funcional en la regulación de la expresión génica aunque este polimorfismo no ha sido asociado a DT2. En conjunto estas investigaciones sugieren que el aumento de expresión de *TGF-β1* y *SIRT1* por la presencia del alelo T de los SNPs evaluados está implicada en gran medida en la aparición de DT2 y enfermedades asociadas a ésta.

En el presente trabajo se evaluó si los polimorfismos rs1800470, rs3758391 y rs932658 se localizan en regiones de unión proteína-DNA y si los cambios de base modifican esta unión. Para ello se emplearon cultivos de células de adenocarcinoma pancreático (línea celular BxPC-3) crecidos en medio RPMI-1640 suplementado con 10% SFB y 1% Penicilina/Estreptomicina, incubados a 37°C y en atmósfera de CO₂ al 5%. Posteriormente se realizó la extracción de RNA de las células para evaluar la expresión de los genes a estudiar. Finalmente, a partir de 2x10⁶ células BxPC-3 se llevó a cabo la extracción de proteínas nucleares con el Kit “NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents” (Thermo Fisher Scientific), las cuales junto a oligonucleótidos de DNA de doble cadena con el alelo ancestral (G para rs1800470, T para rs3758391 y G para rs932658) y el alelo variante (T para rs1800470, C para rs3758391 y C para rs932658) se sometieron a los ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA, por sus siglas en inglés) con el Kit “LightShift Chemiluminescent EMSA” (Pierce/Thermo Fisher Scientific) para determinar la interacción de proteínas con el DNA.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Aspectos generales de la diabetes

De acuerdo con la Asociación Americana de Diabetes (ADA, por sus siglas en inglés), la diabetes es un grupo de enfermedades metabólicas que se caracteriza por hiperglucemia producida por defectos en la secreción de insulina, en la acción de la misma o ambas¹. Es común que las personas que la padecen presenten síntomas característicos como polidipsia, poliuria, polifagia, pérdida de peso y visión borrosa; sin embargo, dichos síntomas no son tan intensos e incluso pueden estar ausentes dependiendo del paciente. La hiperglucemia crónica se acompaña de alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, que su vez se asocian a largo plazo con la disfunción y el fallo de varios órganos, especialmente los ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos¹. Existe una manera general de clasificar a los diferentes tipos diabetes debido a su frecuencia en la población como aquellas más frecuentes y menos frecuentes. La ADA clasifica a la diabetes en cuatro tipos¹⁸ (Figura 1). En esta tesis, nos centraremos en la descripción de la diabetes tipo 2 (DT2).

3.2. Diabetes Tipo 2

La diabetes es una enfermedad crónica cuya prevalencia ha ido en aumento al paso de los años en todo el mundo y ha tenido un impacto negativo en diferentes aspectos de la vida del paciente y su familia, y en la sociedad. Para el paciente y su familia, la diabetes significa un desgaste físico y emocional, debido a las complicaciones y a los decesos que esta enfermedad genera. Por otro lado, el gasto que realizan las instituciones para combatir esta enfermedad ha aumentado, ya que la diabetes implica una gran inversión económica encaminada a mejorar la

calidad de vida del diabético, surtir fármacos para las diferentes clínicas y hospitales que atienden pacientes con diabetes, pagar a médicos y personal de salud, invertir en investigaciones sobre la enfermedad y la búsqueda de nuevos fármaco para el tratamiento de la diabetes.

La diabetes ha tenido un gran impacto en la economía mundial, debido al incremento de la prevalencia de la enfermedad. Datos de la FID indican que 12% del gasto mundial en salud, alrededor de \$673 billones, se destina a la diabetes.

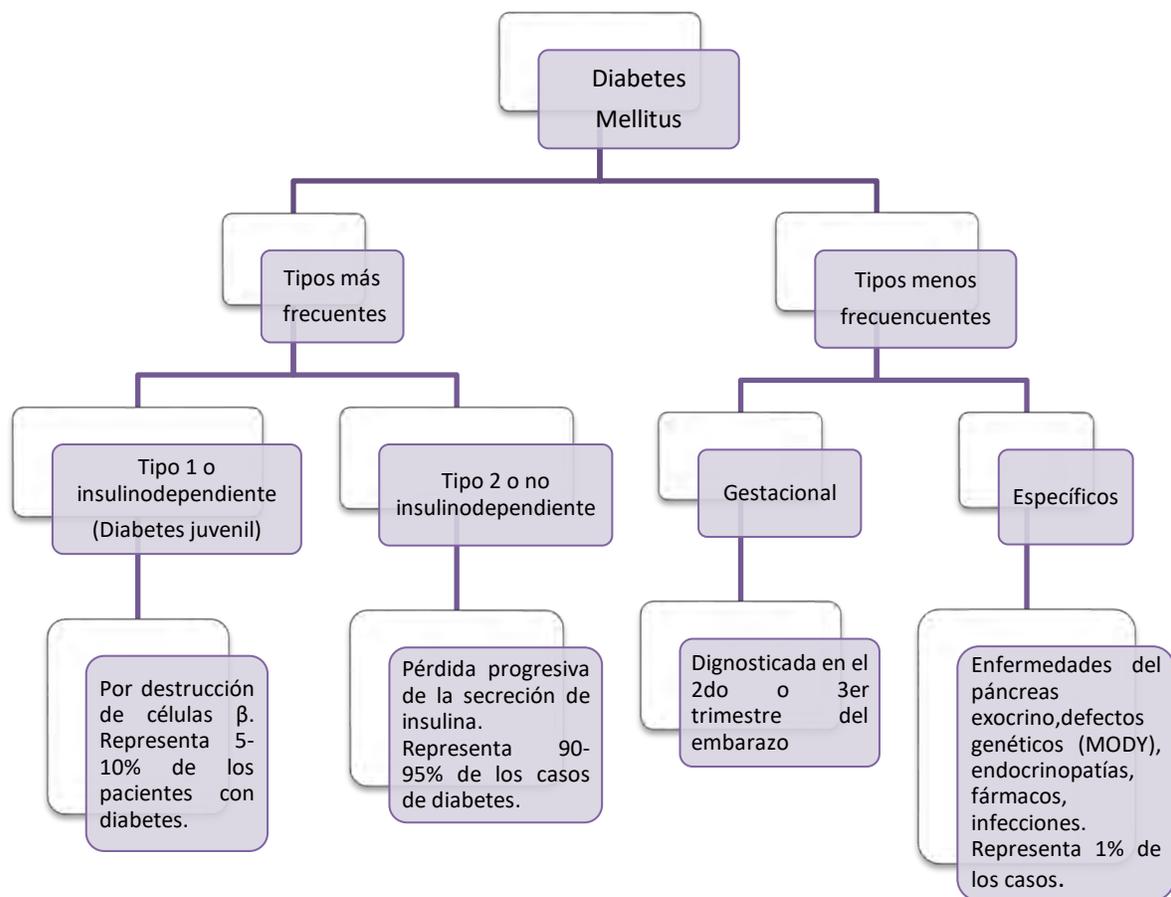


Figura 1. Clasificación de la diabetes de acuerdo a la ADA, Diabetes Care (2016)¹⁸.

La diabetes tipo 2 (DT2) es el tipo de diabetes más común entre las personas, aparece cuando el páncreas no produce suficiente insulina o las células no responden adecuadamente a la insulina¹⁹, lo que genera un incremento de la

glucosa sanguínea y una variedad de complicaciones cuando esta hiperglucemia no es controlada. Generalmente este tipo de diabetes se observa en adultos mayores de 45 años, pero en la actualidad se ha visto un aumento en incidencia en niños y adolescentes con sobrepeso u obesidad.

3.3. Epidemiología

En 2015, 415 millones de adultos en el mundo padecían diabetes, sin embargo esa cifra se prevé que aumente a 642 millones para el año 2040 según la 7ª edición del Atlas de la Diabetes de la Federación Internacional de la Diabetes (FID)². La DT2 se ha convertido en una enfermedad común en el mundo y amenaza una gran cantidad de países, generalmente de bajos y medios ingresos. Se sabe que es más común en afroamericanos, latinos/hispanos, indígenas americanos, estadounidenses de origen asiático, nativos de Hawái y otros isleños del Pacífico²⁰. En México, la prevalencia de DT2 en población adulta según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) del 2016 pasó de 9.2% en 2012 a 9.4% en 2016²¹. Entre esta población, la mujeres reportan mayores valores de diabetes (10.3%) que los hombres (8.4%) tanto en localidades urbanas como rurales.

3.4. Páncreas

El páncreas humano es una glándula lobulada que pesa entre 60 y 170 g, mide entre 13 y 25 cm de longitud y se localiza inmediatamente abajo del estómago y junto al hígado a lo largo del tubo digestivo (Figura 2). Su cabeza (porción proximal) queda ubicada en el ángulo del duodeno y su cola (porción distal) contacta con el bazo. También se encuentra cercano a varios vasos sanguíneos de gran calibre, como la aorta, la vena cava inferior y la vena y la arteria

mesentéricas superiores, y está en contacto directo con las venas porta y esplénica²².

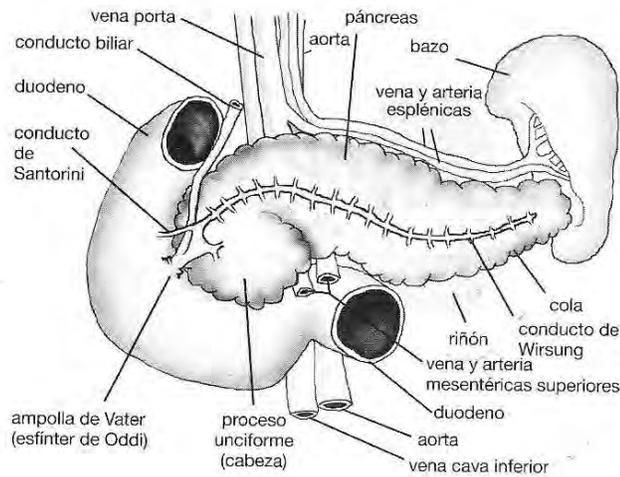


Figura 2. Anatomía del páncreas adulto humano. Tomada de Kahn CR (2006)²².

Este órgano tiene dos funciones, una exocrina y otra endocrina. El páncreas exocrino constituye la mayor parte del tejido pancreático y consta principalmente de células acinares (Figura 3). Éstas se organizan en ácinos, que son invaginaciones epiteliales localizadas en los extremos de un entramado ramificado de conductos. Estas células secretoras se unen entre sí mediante uniones intercelulares comunicantes extensas y se encuentran flanqueadas por células centroacinares en el cuello de los ácinos. En las células acinares se encuentran numerosos gránulos que contienen enzimas digestivas encargadas de digerir los alimentos. Estas enzimas son las amilasas, proteasas, nucleasas y lipasas, se secretan hacia el duodeno como proenzimas inactivas y posteriormente son activadas por una proteólisis limitada una vez que entran en el tubo digestivo por la ampolla de Vater²².

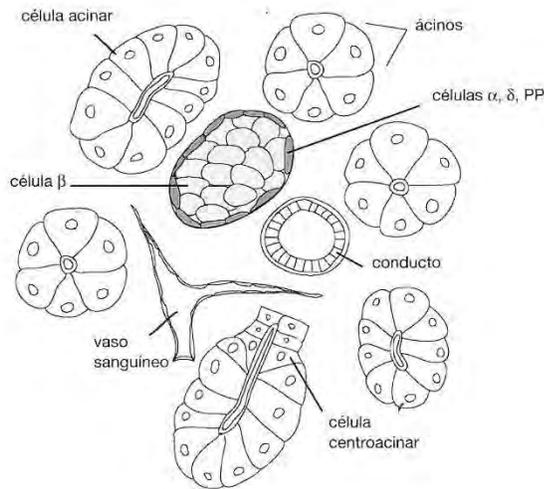


Figura 3. Representación esquemática de los tipos celulares en el páncreas. Un islote se encuentra rodeado de tejido exocrino más abundante. Se indican las células beta (gris claro) y las células no beta periféricas (gris oscuro). Los ácidos están constituidos por células acinarias y centroacinares. También se representan un conducto y un vaso sanguíneo. Ambos forman entramados extensos a lo largo del tejido pancreático y habitualmente discurren en proximidad a los islotes. Tomada de Kahn CR (2006)²².

Por otro lado, la función endocrina del páncreas depende de diversos tipos celulares en los islotes de Langerhans, los cuales son agregaciones celulares identificadas en 1869 por el médico alemán Paul Langerhans. Los islotes de Langerhans se componen de cuatro tipos celulares: α , β , δ y PP (secretoras de polipéptidos pancreáticos; también denominadas células γ). En la mayoría de los mamíferos, las células beta se localizan en medio del islote y se encuentran rodeadas de una capa delgada de células α , δ y PP (de una a tres células de grosor, Figura 3). En los islotes de Langerhans, estas células se encuentran en diferentes proporciones y cada una secreta ciertas hormonas²² (Tabla 1).

Tipo de Célula	Porción en Islotes de Langerhans	Hormonas secretadas
Células β	70-80%	Insulina: Regula el metabolismo de la glucosa, ayudando a que ésta entre en las células y las provea de energía.
Células α	15-20%	Glucagón: Aumenta los niveles de glucosa en sangre en ayuno al liberar la reserva de glucógeno almacenado en hígado.
Células δ	5%	Somatostatina: Inhibe secreción de insulina y glucagón.
Células PP	1%	Polipéptido pancreático: Regula la secreción pancreática exocrina.

Tabla 1. Células de los islotes de Langerhans y hormonas secretadas.

La función principal de las células β del páncreas es la producción, almacenamiento y secreción regulada de insulina. En circunstancias normales, las células β mantienen una reserva de insulina fácilmente disponible que puede secretarse en respuesta a un estímulo, como una elevación de glucosa. Dicha liberación es compensada con un aumento en la biosíntesis de insulina, de manera que la reserva de insulina en la célula β se mantiene constante²³. La señalización para la secreción de insulina comienza cuando la glucosa entra a la célula β a través del transportador GLUT-2, ya en el citosol la glucoquinasa (GK) cataliza la fosforilación de glucosa generando glucosa-6-fosfato, esencial para el inicio de la glucólisis y por tanto la formación de piruvato. El piruvato entra al ciclo de Krebs en la mitocondria, donde se generan las moléculas reducidas de NADH y FADH, las cuales transfieren electrones a la cadena respiratoria, desencadenando la hiperpolarización de la membrana mitocondrial y generación de ATP. El ATP es transferido al citosol de la célula provocando un aumento de la relación ATP/ADP. Este incremento de ATP provoca el cierre de los canales de potasio sensibles a ATP causando la despolarización de la membrana citoplasmática, que a su vez provoca la apertura de canales de calcio (Ca^{2+}) dependientes de voltaje, de tal

manera que el Ca^{2+} extracelular entra a la célula y el aumento de concentración de éste junto con otros factores estimula la movilización de los gránulos de insulina hacia la membrana citoplasmática y la secreción de insulina²⁴ (Figura 4).

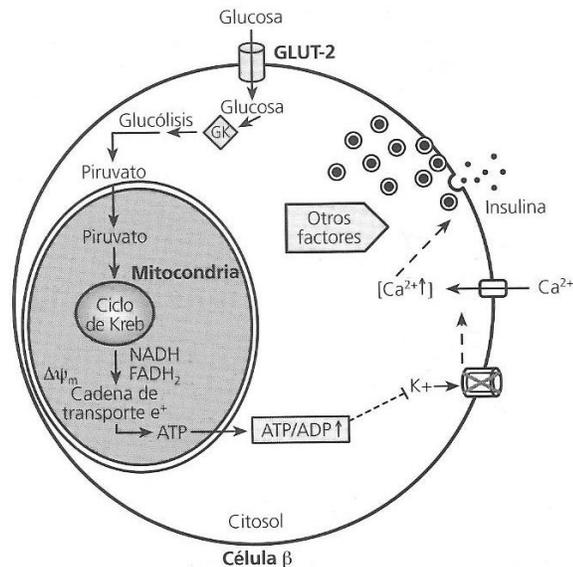


Figura 4. Secreción de Insulina por las células β pancreáticas. Tomada y modificada de Gomis R (2007)²⁴.

3.5. Fisiopatología

La DT2 es considerada una enfermedad crónico degenerativa, que aparece debido a una serie de factores ambientales como sedentarismo, sobrepeso, obesidad, hipertensión, aumento de la edad y factores genéticos como SNPs y Variaciones del Número de Copias (CNVs, por sus siglas en inglés).

En un individuo sano, la insulina secretada por las células β se libera a la vena porta en respuesta a un aumento de glucosa y se une a sus respectivos receptores de insulina en diferentes tipos celulares como por ejemplo en células de músculo (miocitos) y del tejido adiposo (adipocitos)²⁵. Posteriormente mediante una cascada de señalización intracelular que implica múltiples eventos de fosforilación/desfosforilación de cinasas de tirosina y serina/tirosina, el

transportador GLUT-4 se trasloca a la membrana citoplasmática y permite la entrada y el almacenamiento de glucosa en las células²⁵ donde participa en diferentes actividades, principalmente en la glucólisis (Figura 5). Sin embargo, con una producción insuficiente de insulina y la disminución de la capacidad de la insulina para ejercer su acción en tejidos como el músculo, el hígado y el tejido adiposo, la glucosa se acumula en la sangre y no es transportada de manera adecuada a las células, provocando que las células no produzcan ATP y con el tiempo puede causar daño en diferentes órganos y sistemas²³. Debido a la gran concentración de glucosa acumulada en sangre, al inicio de la enfermedad los niveles de insulina también se encuentran elevados, lo que genera que los receptores de las células lleguen a un punto en el que ya no funcionan adecuadamente, es decir, hay una resistencia a la insulina (RI). Al paso del tiempo los niveles de insulina van decayendo poco a poco hasta que el páncreas deja de secretar más insulina, por lo tanto, en los estadios avanzados de la enfermedad, los pacientes con diabetes deben inyectarse insulina.

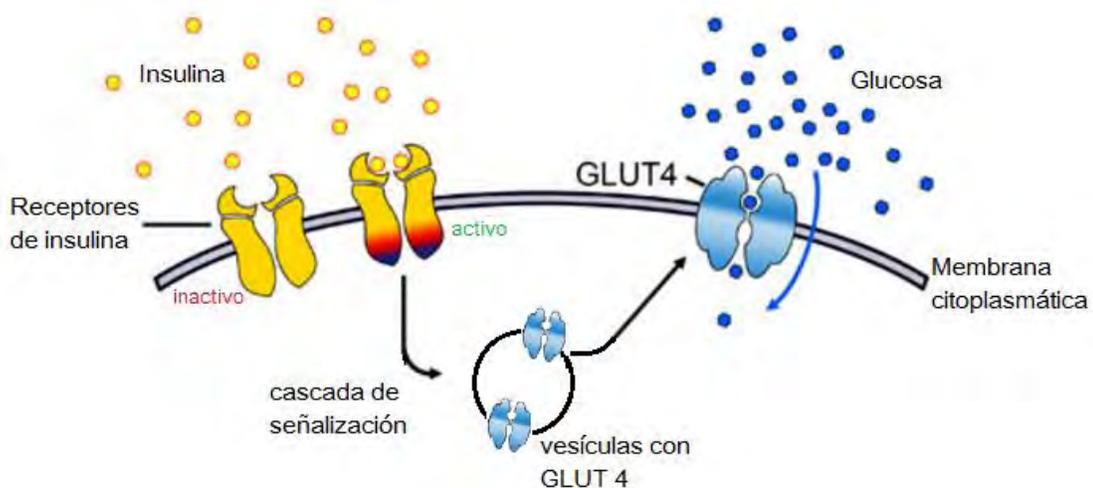


Figura 5. Transporte de glucosa por insulina. Una vez unida la insulina a su receptor, éste se encuentra activo para llevar a cabo la señalización y la consecuente entrada de glucosa a la célula. Tomada y modificada de <https://momentofisioex.wordpress.com/page/2/>

Las personas que padecen DT2 suelen presentar síntomas como cansancio, sed excesiva (polidipsia), aumento de apetito (polifagia), aumento excesivo de orina (poliuria), pérdida de peso, prurito, visión borrosa, infecciones frecuentes y heridas que tardan en cicatrizar²³. Al paso de los años suelen presentarse complicaciones como ND, neuropatía diabética, retinopatía diabética, ceguera, entre otras.

La DT2 nunca ha sido una enfermedad sencilla de diagnosticar, sin embargo, en la actualidad debido al incremento de casos de obesidad, DT2, hipertensión arterial y enfermedades asociadas a éstas, las campañas de salud en clínicas y hospitales, en conjunto con los medios de comunicación permiten que la población conozca más sobre la DT2, desde sus síntomas clásicos hasta sus complicaciones. La mayoría de las personas que padecen DT2 se diagnostican de acuerdo a los niveles de glucosa plasmática en ayunas, ya sea a través de una prueba rápida de glucosa en plasma o de una prueba de tolerancia a la glucosa que indica cómo el organismo responde a la glucosa ingerida. Existe otra prueba fundamental para el diagnóstico de la enfermedad, la prueba de hemoglobina glucosilada (HbA1C) que sirve como referencia para determinar los niveles de glucosa en la sangre durante los últimos 2 ó 3 meses^{26,27}. Los criterios de diagnóstico para diabetes según la ADA²⁰ se muestran en la tabla 2.

Generalmente el tratamiento para la DT2 consiste en una dieta saludable, actividad física y una combinación de fármacos como los hipoglucemiantes orales (metformina, glibenclamida), estatinas (atorvastatina), antihipertensivos con la finalidad de controlar no sólo DT2 sino también las enfermedades relacionadas como obesidad e hipertensión arterial, y prevenir la aparición de complicaciones.

Criterios diagnósticos para diabetes ADA 2016
Glucosa en ayuno ≥ 126 mg/dL (no haber tenido ingesta calórica en las últimas 8 horas).
ó
Glucosa plasmática a las 2 horas ≥ 200 mg/dL durante una prueba oral de tolerancia a la glucosa. La prueba debe ser realizada con una carga de 75 gramos de glucosa anhidra disuelta en agua.
ó
Hemoglobina glicosilada (A1C) $\geq 6.5\%$. Esta prueba debe realizarse en laboratorios certificados de acuerdo a los estándares A1C del DCCT.
ó
Paciente con síntomas clásicos de hiperglicemia o crisis hiperglicémica con una glucosa al azar ≥ 200 mg/dL.

Tabla 2. Criterios de diagnóstico para diabetes de acuerdo a la ADA. Tomada de Guías ADA (2016)²⁷.

3.6. Expresión génica

La información genética de un individuo está determinada por una secuencia de cuatro bases nitrogenadas, Adenina (A), Timina (T), Guanina (G) y Citosina (C), contenidas en una doble hélice denominada Ácido Desoxirribonucleico (DNA, por sus siglas en inglés). La secuencia de las bases en un fragmento del DNA (genotipo) determina junto con el ambiente (dieta, estilo de vida, edad, etc.) las características de los individuos (fenotipo). El DNA se encuentra en el núcleo de las células compactado en estructuras denominadas cromosomas. En dicha compactación participan proteínas especializadas a fin de crear la cromatina, la cual tiene varios niveles de organización. La doble hélice de DNA es el nivel más simple y una vez asociados a complejos de histonas se forma el nucleosoma, éstos se pliegan para generar una fibra cromatínica que se compacta y forma bucles de tal manera que al comprimirse cada vez más llegan a formar el cromosoma. Existen dos tipos básicos de cromatina, la heterocromatina que es aquella que se encuentra en estado de alta condensación y la eucromatina que está en un estado más extendido^{28,29}. A la región del DNA encargada de

determinar la expresión y regulación de una característica heredable se le denomina gen³⁰ (Figura 6).

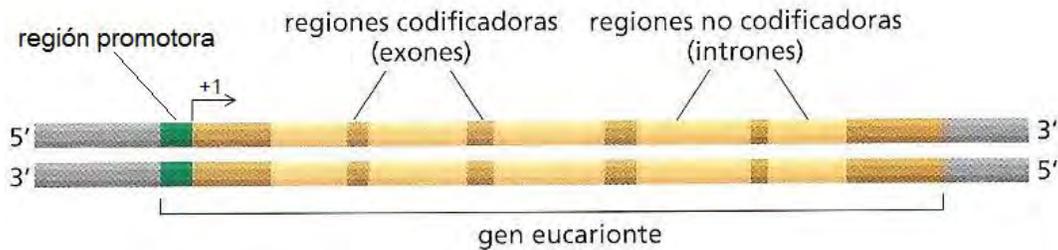


Figura 6. Elementos que componen a un gen. Las secuencias que codifican para un proteína (exones) están interrumpidas por secuencias no codificantes (intrones) en un gen. La región promotora se encuentra río arriba del inicio de la transcripción (flecha +1). Tomada y modificada de Alberts B (2011)²⁸.

El proceso por el cual la información codificada en un gen se transcribe en uno o varios RNA funcionales (tRNA, rRNA, mRNA, iRNA, miRNA, siRNA, por mencionar algunos) y se produce una proteína se denomina expresión génica²⁹. Consta de una serie de pasos que inicia con el proceso de transcripción, el cual es regulado por proteínas (factores de transcripción) que interactúan con regiones específicas del DNA, posteriormente se da la producción de un RNA funcional, como el mRNA, que se traduce a una proteína madura (Figura 7).

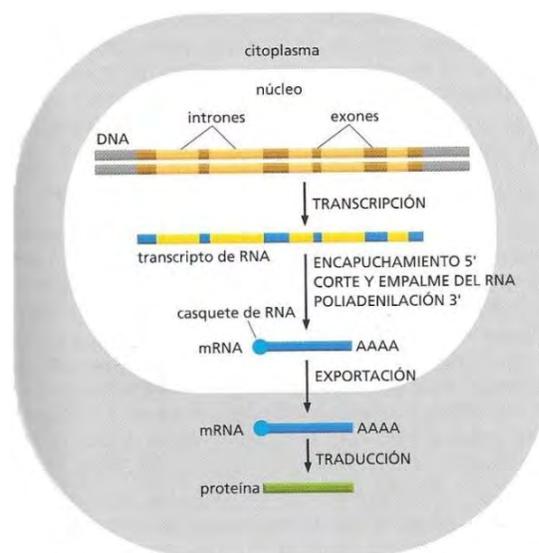


Figura 7. Representación del proceso de expresión génica. Tomada de Alberts B (2011)²⁸.

3.6.1. Transcripción

El inicio de la expresión génica ocurre en el núcleo y consiste en un cambio conformacional de la cromatina, el DNA se desenrolla del complejo de histonas para poder llevar a cabo la transcripción de los genes. El proceso de transcripción se refiere a la síntesis de una cadena de Ácido Ribonucleico (RNA, por sus en inglés) cuya secuencia es complementaria y antiparalela a una de las hebras del DNA (denomina hebra molde con dirección 3'—5')²⁸.

La interacción de proteínas con el DNA es fundamental para que este proceso se lleve a cabo correctamente. Existen regiones río arriba del inicio de transcripción con secuencias de nucleótidos específicas, también llamadas secuencias consenso, que participan en la regulación de la transcripción y que están contenidas en regiones promotoras²⁵ (Figura 8). Generalmente se conocen 3 tipos de promotores²⁵:

- Promotor basal: Contiene a la secuencia consenso Iniciador (Inr) localizada entre las posiciones -3 y +5, y a la caja TATA situada típicamente entre -25 y -35 pb. Esta última determina el inicio de la transcripción.
- Promotor proximal: Generalmente localizado a -200 pb río arriba del sitio de inicio de transcripción, incluye a las cajas GC y CAAT. El número y la posición de estas secuencias varía entre los promotores de los diversos genes.
- Promotor distal: Se ubica a más de 200 pb río arriba del sitio de inicio de transcripción, aunque también se han localizado río abajo (en extremo 3'). Incluye a los potenciadores encargados de aumentar la transcripción del gen y los silenciadores que inhiben la transcripción.



Figura 8. Secuencias que regulan el proceso de transcripción. Tomada y modificada de Salazar AM (2013)²⁵.

Los factores de transcripción son proteínas nucleares que se unen a las secuencias consenso en el promotor y participan en la regulación de la transcripción. Estas proteínas se unen al surco mayor del DNA a través de puentes de hidrógeno, enlaces iónicos e interacciones hidrófobas con las bases nitrogenadas. Existen diferentes estructuras de los factores de transcripción²⁵. Los factores de transcripción se han clasificado en dos grupos funcionales; los factores de transcripción generales o basales que son comunes a todos los genes y que se unen al promotor basal junto con la RNA polimerasa II, y los factores de transcripción inducibles o específicos que se unen a promotores proximales y distales en genes específicos²⁵.

Los pasos del proceso de transcripción son los siguientes^{25,28}.

1. Inicio. Se requiere de la participación de un conjunto de proteínas denominadas factores de transcripción generales, proteínas comunes a todos los genes que reconocen el promotor (caja TATA) y de factores de transcripción específicos, dependiendo de los genes a transcribir.

El TFIID reconoce la caja TATA de la hebra molde (dirección 3'—5') y se une a ella a partir de su región proteína de unión a TATA o TBP (Figura

9A), posteriormente se da la unión adyacente de TFIIIB y el resto de los factores de transcripción (TFIIIE, TFIIH y TFIIIF) con la RNA polimerasa II (Figura 9B). TFIIH separa la doble hélice en el punto de inicio de la transcripción permitiendo la exposición de la hebra molde del DNA, formándose la burbuja de transcripción. La RNA polimerasa II cataliza el enlace fosfodiéster de dos ribonucleótidos trifosfatos (rNTPs) iniciales complementarios a la hebra molde. TFIIH fosforila el dominio carboxiterminal (CDT) o cola de la RNA polimerasa II, lo que la libera de los factores de transcripción generales (Figura 9C).

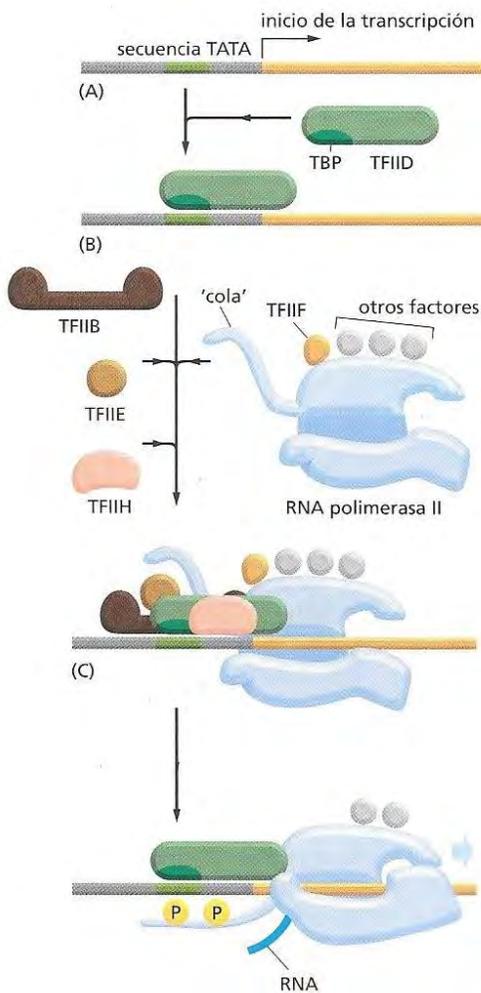


Figura 9. Inicio de la transcripción. Tomada y modificada de Alberts B (2011)²⁸.

2. Elongación. La RNA polimerasa II se mueve a lo largo de la hebra molde de DNA en dirección 3'—5'. A medida que la enzima avanza, el DNA se desenrolla para exponer un nuevo segmento de cadena sencilla de DNA molde, se van añadiendo rNTP's de Adenina, Guanina, Citosina y Uracilo, y se va sintetizando una cadena de RNA en dirección 5'—3' (Figura 10).

Para dicha síntesis, se lleva a cabo una polimerización de los ribonucleótidos por la RNA polimerasa II. El ribonucleótido que debe ser añadido en el extremo 3' de la cadena de RNA creciente es complementario al que se encuentra en la cadena de DNA molde, se forma un enlace fosfodiéster cuando la RNA polimerasa II cataliza una reacción entre el oxígeno del carbono 2 de la ribosa del rNTP previamente añadido y el fosfato de un rNTP nuevo. El complejo de elongación (RNA polimerasa II, DNA molde y RNA creciente) es muy estable.

3. Terminación. La mayor parte de los sitios de terminación se encuentran corriente arriba del punto donde realmente finaliza la transcripción, por lo tanto, el proceso concluye una vez transcrito el terminador. La RNA polimerasa II deja de sintetizar RNA, se libera la molécula de RNA recién sintetizada del complejo y la RNA polimerasa se disocia del DNA para volver a transcribir el mismo gen nuevamente u otro gen (Figura 10).

El RNA recién sintetizado es procesado antes de abandonar el núcleo para convertirse en un RNA mensajero maduro (mRNA). En el extremo 5' se llevaba a cabo el encapuchamiento (casquete del RNA), que consiste en añadir un nucleótido de Guanina (G) con un grupo metilo, posteriormente ocurre el proceso de corte y empalme del RNA, también conocido como "splicing", en el que se

eliminan las secuencias de intrones y se unen entre sí los exones, y por último en el extremo 3' ocurre la poliadenilación, que implica la adición de unos cientos de nucleótidos de Adenina, generando la cola de poli-A (Figura 7)²⁸.

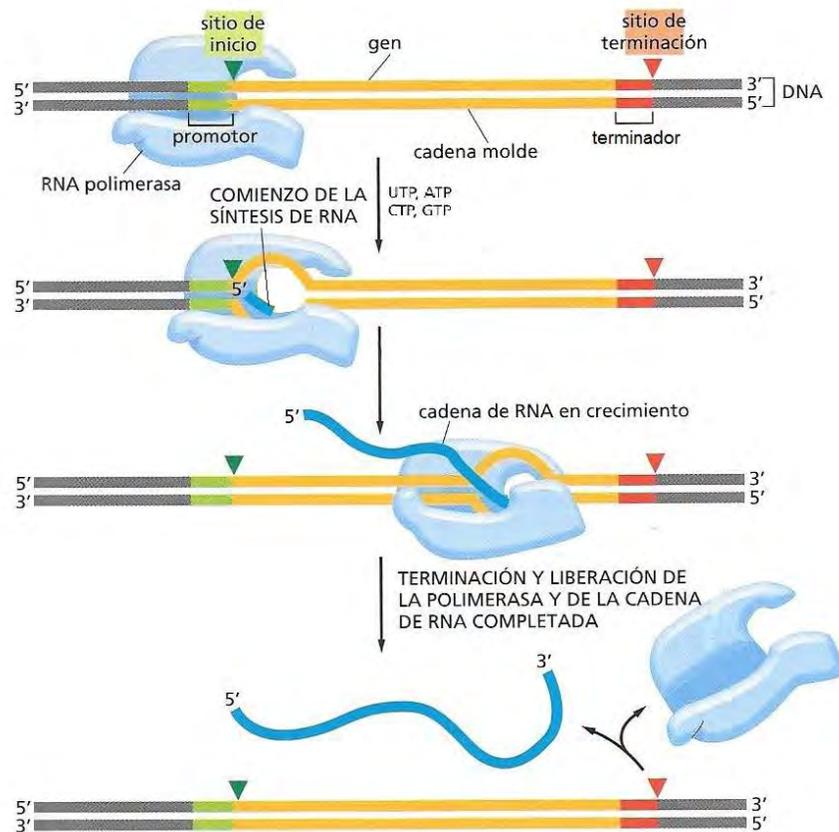


Figura 10. Elongación y terminación del proceso de transcripción. Tomada y modificada de Alberts B (2011)²⁸.

3.6.2. Traducción

Una vez que el mRNA es transportado del núcleo al citoplasma, la información que lleva es traducida a una proteína con ayuda de los ribosomas y RNAs de transferencia (tRNAs). Estas moléculas facilitan la formación de uniones peptídicas entre aminoácidos para formar una proteína completa. Los elementos necesarios para llevar a cabo la traducción son³¹:

- RNA mensajero (mRNA): Lleva la información genética transcrita del DNA, la cual se lee en conjuntos de secuencias de tres nucleótidos, llamadas codones o tripletes, codificando cada uno para un aminoácido.
- RNA de transferencia (tRNA): Encargado de decifrar los codones del mRNA, ya contiene un aminoácido específico para una secuencia de tres nucleótidos, un anticodón, que se aparea con las bases de su codón complementario presente en el mRNA.
- Ribosomas: Complejo formado por diversas moléculas de RNA ribosomal (rRNA) diferentes (5S, 5.8S, 18S y 28S) y un gran número de proteínas, organizados en una subunidad mayor (50S) y una subunidad pequeña (30S). Estas estructuras se mueven a lo largo del mRNA catalizando el ensamblaje de los aminoácidos en la cadena polipeptídica²⁵.

El proceso de traducción se compone de tres pasos²⁵:

1. Iniciación. El mecanismo inicia cuando la subunidad menor del ribosoma se une al extremo 5' del mRNA, para posteriormente desplazarse hasta encontrar el codón de inicio situado en la secuencia de Kozak (5'-ACCAUGG-3'). El anticodón del tRNA iniciador que transporta el primer aminoácido (metionina) reconoce al codón AUG del mRNA. La lectura del codón se lee en dirección 5'—3' por el anticodón, que se unirá en sentido inverso, de 3'—5'. Ya formada la unión, la subunidad mayor se acopla al complejo formado, de tal manera que el tRNA queda en el sitio P del ribosoma para continuar con el proceso de traducción (Figura 11A).

2. **Elongación.** La formación de una cadena polipeptídica implica la incorporación de nuevos aminoácidos, transportados por su respectivo tRNA. Los aminoácidos van formando enlaces peptídicos a partir de la unión del extremo carboxi-terminal (radical carboxilo, -COOH) del aminoácido iniciador con el extremo amino-terminal (radical amino, -NH₂) del nuevo aminoácido. Esto ocurre de forma cíclica, de tal manera que a medida que el ribosoma se mueve a lo largo del mRNA, nuevos tRNA con su aminoácido se van incorporando al sitio A, se genera la unión codón-anticodón y la formación de enlaces peptídicos entre los aminoácidos hasta formar un polipéptido. Cada que llega un nuevo tRNA al sitio A, el anterior se mueve al sitio P y posteriormente al sitio E para salir del ribosoma, y así sucesivamente, leyendo el mRNA en dirección 5'—3' (Figura 11B).
3. **Terminación.** El proceso finaliza cuando al sitio A se posiciona algunos de los codones de terminación (UAA, UGA ó UAG), los cuales tienen como característica no codificar para ningún aminoácido, el mRNA se libera del ribosoma para leerse de nuevo, el ribosoma se desensambla y se libera la proteína formada (Figura 11C).

Las proteínas adquieren diferentes estructuras en el espacio (primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria) y sufren ciertas modificaciones postraduccionales (glucosilación, fosforilación, acetilación, metilación, hidroxilación, entre otras) en los diferentes grupos funcionales de los aminoácidos y en sus extremos amino y carboxilo terminal, cambios necesarios para su funcionamiento en la célula²⁵.

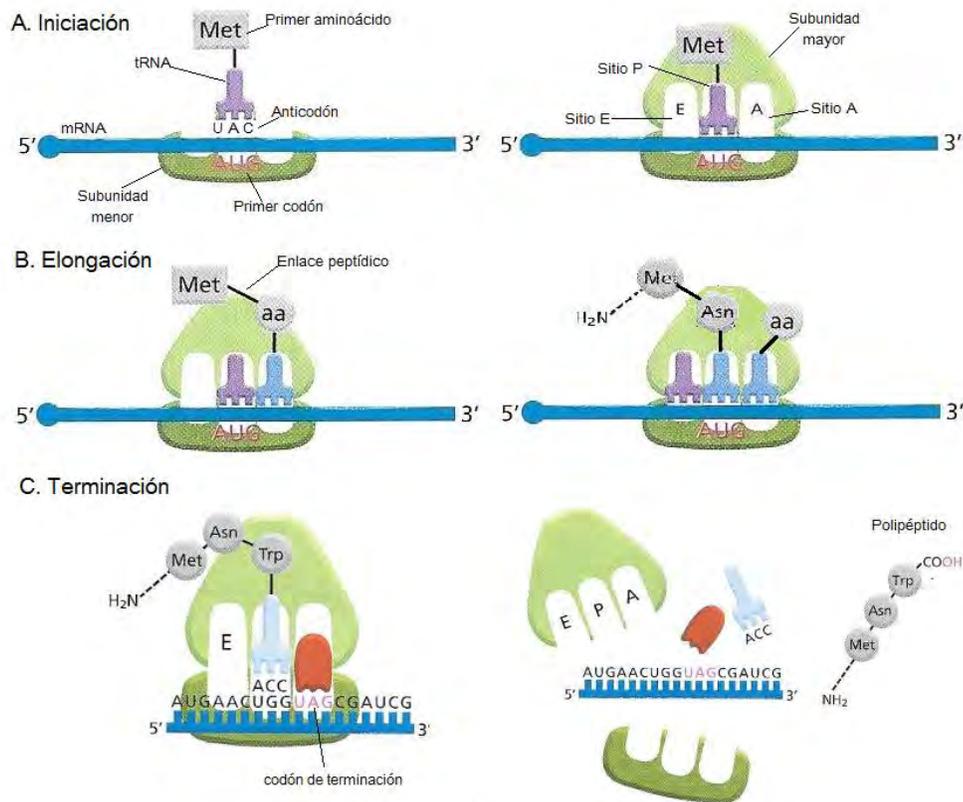


Figura 11. Proceso de traducción. Tomada y modificada de Alberts B (2011)²⁸.

3.6.3. Unión proteína-DNA

La interacción de proteínas con regiones específicas del DNA es fundamental para el desarrollo de muchos procesos biológicos ocurridos dentro de las células, como el empaquetamiento del DNA, replicación del DNA, transcripción de genes, el “splicing”, la reparación del DNA y hasta procesos que se llevan a cabo durante una infección viral³². Algunas de las proteínas más comunes implicadas en la interacción proteína-DNA son los factores de transcripción. Conocer los sitios donde se lleva a cabo la interacción proteína-DNA es clave para comprender los procesos biológicos antes mencionados y su relación con ciertas enfermedades.

En la mayoría de los casos, las proteínas se unen a regiones específicas en el surco mayor del DNA a través de puentes de hidrógeno, enlaces iónicos e

interacciones hidrófobas con las bases nitrogenadas, sin alterar las uniones entre bases. Típicamente, la unión proteína-DNA consiste en 10 a 20 contactos como el de la Figura 12, cada uno involucra diferentes aminoácidos que contribuyen a dicha interacción. Muchas proteínas forman dímeros que se unen al DNA, por lo tanto, la dimerización duplica el área de contacto con el DNA e incrementa de este modo la fuerza y especificidad de la interacción proteína-DNA²⁸.

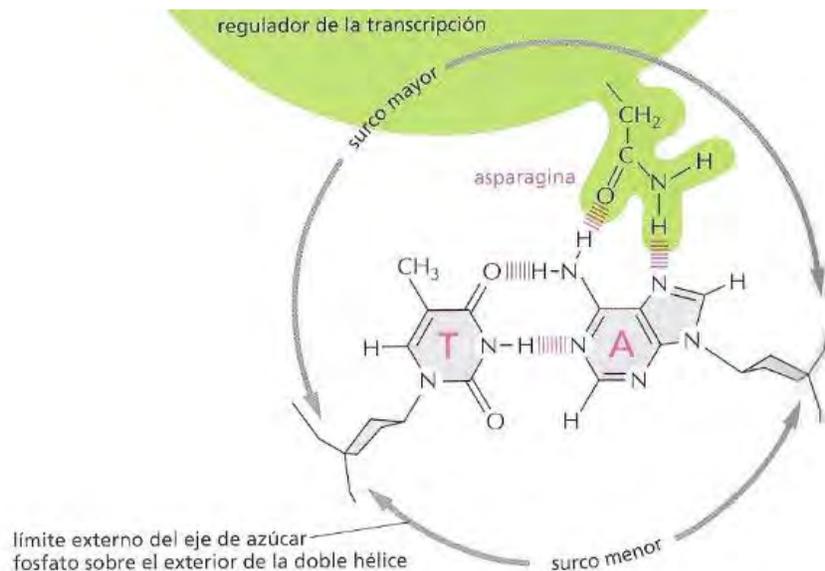


Figura 12. Unión de un regulador de la transcripción al DNA. Tomada de Alberts B (2011)²⁸.

La secuencia del DNA es fundamental para el acoplamiento de las proteínas. Por lo tanto, la presencia de mutaciones como deleciones, inserciones, duplicaciones, secuencias repetidas y presencia de SNPs en regiones específicas de unión de proteínas al DNA, afectaría en gran medida la interacción proteína-DNA.

Por otro lado, los aminoácidos que forman a las proteínas tienen propiedades diferentes dependiendo de los grupos funcionales que los conforman. Esto genera la presencia de residuos cargados, residuos polares y residuos hidrofóbicos en los 20 aminoácidos conocidos. Generalmente, los residuos con carga positiva son

más propensos a interactuar con la carga negativa del DNA³². La secuencia de aminoácidos adquiere una disposición espacial, dando lugar a motivos estructurales de la proteína²⁵, los cuales encajan con el DNA y forman asociaciones estrechas con un segmento corto de pares de bases del DNA. Algunos de los motivos estructurales que se han descubierto se pueden apreciar en la Figura 13.

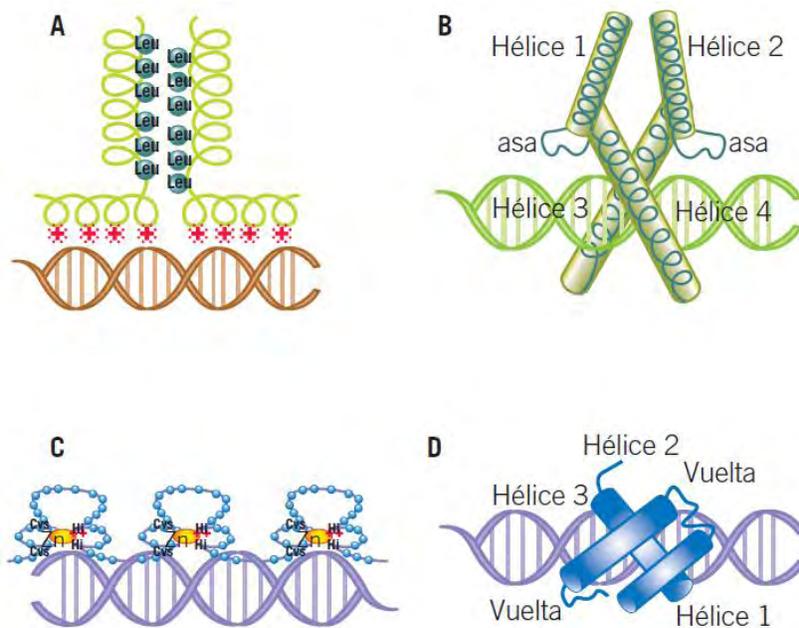


Figura 13. Motivos estructurales de los factores de transcripción. Cremallera de leucinas (A), hélice-asa-hélice (B), dedos de zinc (C) y hélice-vuelta-hélice (D). Tomada de Salazar AM (2013)²⁵.

Hoy en día, existen técnicas experimentales que permiten identificar la interacción proteína-DNA, entre ellas destacan los EMSAs, inmunoprecipitación de cromatina (ChiP), MicroChiP, Fast ChiP, cristalografía de Rayos X y espectroscopia de resonancia magnética nuclear. Sin embargo, en las últimas décadas se han desarrollado herramientas computacionales para predecir los sitios posibles de uniones proteína-DNA³². Éstos facilitan el desarrollo de las técnicas mencionadas y aceleran la caracterización de la interacción proteína-DNA. Generalmente, estas

herramientas se basan en ciertas características de la proteína para predecir los sitios posibles de unión al DNA (Figura 14) y en datos de referencia de otras herramientas computacionales como las bases de datos³². Entre los resultados que arrojan estas nuevas estrategias se encuentran los motivos de secuencia, patrones cortos y recurrentes en el DNA que indican sitios de unión específicos de secuencia para proteínas tales como nucleasa y factores de transcripción³³. La representación de estos motivos de secuencia se puede observar en la Figura 15, donde se aprecia la secuencia de las base del DNA en diferentes tamaños. Las bases más altas presentan mayor afinidad para la unión de proteínas.

Características de secuencia	Características estructurales	Características físicas y químicas
<ul style="list-style-type: none"> • Secuencia de aminoácidos • Conservación de secuencias • Residuos conservados evolutivamente 	<ul style="list-style-type: none"> • Motivos estructurales • Estructuras vecinas • Flexibilidad estructural • Estructuras secundarias • Área de superficie accesible 	<ul style="list-style-type: none"> • Hidrofobicidad • Potenciales electrostáticos • Carga neta y momento dipolo y cuadrupolo

Figura 14. Características de las proteínas. Las características de las proteínas para predecir sitios de unión proteína-DNA se dividen en características de secuencia, estructurales, físicas y químicas³².

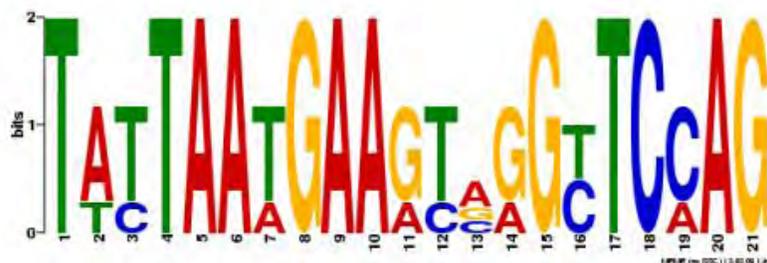


Figura 15. Motivos de secuencia. Tomada de <http://kueckgen677s09.weebly.com/motifs-gene.html>

3.7. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs)

Enfermedades como la obesidad, hipertensión arterial, DT2, asma, LEG, AR, entre otras, son enfermedades multifactoriales³, es decir, que involucran la participación e interacción de múltiples genes y factores ambientales presentes en una población para determinar la aparición de la enfermedad.

Los estudios de la variación del genoma humano indican que aproximadamente el 99.9% de la secuencia del DNA es idéntica entre los individuos, por lo tanto el restante 0.1% es el que hace que cada persona sea única. Esa pequeña diferencia representa a más de 3 millones de pares de bases diferentes en el DNA, considerando que el genoma humano contiene 3,200 millones de pares de bases²⁹. Los SNPs son las variantes genéticas más comunes encontradas en el genoma humano. Consisten en el cambio de una sola base en el DNA y su frecuencia es de 1 por cada 1000 pares de bases (Figura 16)^{3,29}. A cada variación presente en un gen se le denomina alelo. Dependiendo de sus frecuencias en la población, los SNPs se pueden clasificar en alelo ancestral (presente en mayor frecuencia en una población) y alelo variante (aquel que está en menor frecuencia en una población).

Los SNPs están íntimamente relacionados con la susceptibilidad a varias enfermedades y la respuesta a fármacos, debido a que los cambios que se presentan pueden provocar, entre otras alteraciones, modificaciones en la expresión génica. Los SNPs pueden alterar la correcta interacción de los factores de transcripción con el DNA, lo cual impide o favorece el proceso de transcripción. La interacción proteína-DNA puede ser débil o nula, lo que generaría una deficiente transcripción y con ello una baja o ninguna producción de proteína, es

decir, hay una baja o nula expresión génica. Por el contrario, la expresión génica puede aumentar si la interacción de los factores de transcripción con el DNA se hace más fuerte en presencia de un SNP, de tal modo que el cambio de base favorece el proceso de transcripción y a su vez la producción de proteína.

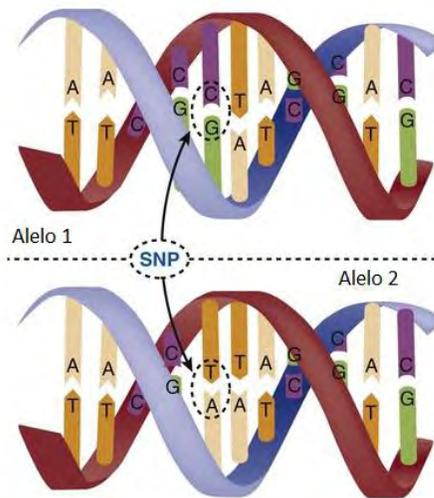


Figura 16. Representación esquemática de un polimorfismo de un solo nucleótido. Tomada y modificada de <http://clinicalgate.com/genetics-and-genomics-in-critical-care/>

Un ejemplo de esto lo descubrió Silverman ES *et al.* (2004) quienes determinaron que el polimorfismo C-509T en el promotor del gen *TGF-β1* se asocia a asma y la presencia del alelo T (alelo variante) aumenta la unión del factor de transcripción YY1 (Yin Yang 1) al promotor de *TGF-β1*. Esto aumenta la expresión de *TGF-β1* y por consecuencia es posible que exista un incremento de la proteína TGF-β1, la cual participa en la remodelación de vías aéreas y estimula la síntesis de matriz extracelular provocando fibrosis³⁴. En este trabajo estudiamos si los rs1800470, rs3758391 y rs932658 modifican la unión de proteínas reguladoras en los genes *TGF-β1* y *SIRT1*.

3.8. Desequilibrio de ligamiento

Las diferencias genéticas entre los individuos se deben principalmente al proceso de recombinación genética ocurrido durante la meiosis, debido al entrecruzamiento de genes (“crossing over”) entre cromátides de cromosomas homólogos diferentes (Figura 17)²⁹. Inicialmente dentro de la célula se encuentran los cromosomas homólogos con cromátides hermanas idénticas, cada una de las cuales posee los alelos A y B para un cromosoma y los alelos a y b para el otro. Sin embargo, después del entrecruzamiento hay un intercambio entre las cromátides, lo que genera nuevas combinaciones de alelos para cada una. Una de las cromátides del cromosoma 1 tiene los alelos A y B, mientras que la otra cromátide tiene alelos a y B, y en el caso del cromosoma 2 se presentan los alelos a y b para una cromátide y los alelos b y A para la segunda.

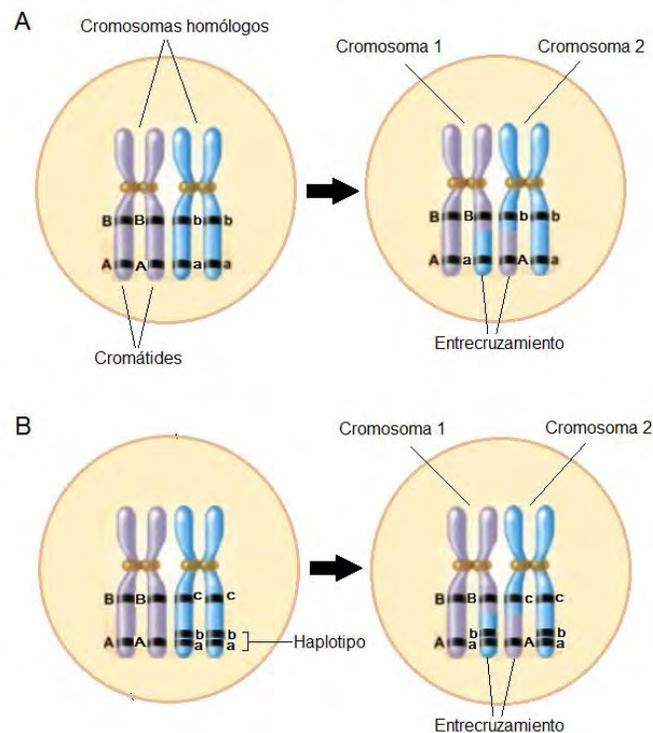


Figura 17. Entrecruzamiento durante la meiosis. El entrecruzamiento ocurre entre cromátides de cromosomas homólogos diferentes Tomada y modificada de McGraw Hill³⁵.

Al conjunto de alelos o SNPs cercanos entre sí en un mismo cromosoma, se le denomina haplotipo, y dado a que están ligados, los alelos o SNPs, tienden a heredarse juntos²⁹ (Figura 17B). Por lo tanto, al estudiar un SNP contenido en un haplotipo, es posible conocer el cambio de base (A, T, C, G) de los otros SNPs del haplotipo. Cuando esto ocurre, se dice que los SNPs están en desequilibrio de ligamiento (LD, por sus siglas en inglés) puesto que el equilibrio durante el entrecruzamiento solo se alcanza si éste se presenta de manera aleatoria⁵. La medida más común para el LD entre dos SNPs es usando valores entre 0 a 1, donde valores muy próximos a 1 representan un completo desequilibrio de ligamiento (los SNPs se heredan juntos siempre). Por el contrario, valores más cercanos a 0 representan menor desequilibrio de ligamiento entre los dos polimorfismos (los SNPs se segregan aleatoriamente).

De acuerdo con los GWAS, una gran cantidad de enfermedades, entre ellas la DT2, se asocia con la presencia de SNPs⁴. Sin embargo, en la mayoría de los casos, no existe la certeza sobre el efecto funcional de dichos SNPs, haciendo necesario realizar estudios encaminados a descubrir el efecto funcional del polimorfismos y si el SNP funcional es realmente el asociado o lo es algún SNP en desequilibrio de ligamiento con éste.

3.9. *TGF-β1*

El gen *TGF-β1* (factor de crecimiento transformante β1) humano se localiza en el brazo corto del cromosoma 19 en la posición 13.2 (19q13.2). Contiene 7 exones, tiene una longitud de 17.52 Kb y es expresado en muchos tipos de células³⁶.

Este gen codifica para una proteína multifuncional, la TGF-β1, que es secretada en forma latente (unida a una secuencia de aminoácidos, conocida como péptido

asociado a la latencia o LAP) por linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, epiteliales, fibroblastos y células epiteliales de vías aéreas, hígado y riñón entre otras. Una vez que TGF- β 1 se convierte en una proteína madura, al separarse de LAP principalmente por proteólisis, participa en la regulación de la proliferación, diferenciación, crecimiento y apoptosis celular. Además puede modular la expresión y activación de otros factores de transcripción mediante la señalización conjunta con proteínas de la familia Smad y estimular la síntesis y depósito de proteínas de matriz extracelular. También participa en el control del sistema inmune y muestra diferentes actividades en varios tipos de células⁶. Durante la señalización con proteínas Smad, TGF- β 1 maduro se une directamente al receptor II (T β RII) para formar un complejo activo con el receptor I (T β RI). Este complejo tetramérico fosforila a las Smad 2 y 3 (R-Smads o activadas por el receptor), las cuales se asocian con la Smad 4 (C-Smad o mediadora común). El nuevo complejo formado se transloca al núcleo donde funciona como un coactivador transcripcional de genes de respuesta a TGF- β 1. Las Smad 6 y 7 (I-Smad o inhibitorias) pueden interactuar con T β RI-T β RII e impedir que se fosforilen las R-Smad⁶ (Figura 18). Esta señalización de TGF- β 1 es esencial para el desarrollo fetal y el crecimiento de los islotes pancreáticos, regulación de la transcripción del gen de insulina y presenta asociación con cáncer pancreático³⁷⁻⁴⁰. Lin HM *et al.* (2009) a partir de experimentos con células INS-1, islotes pancreáticos de ratón, siRNA y sobreexpresión para Smad3, demostraron que la señalización TGF- β /Smad3 reprime la transcripción de insulina, al reducir los niveles de insulina y secreción de insulina, sugiriendo de esta manera que una inactivación farmacológica de la señalización TGF- β /Smad3 podría ser útil para

mejorar la disfunción de las células β durante la diabetes³⁸. Por su parte Suzuki T *et al.* (2013) reportan que la inhibición de la señalización de TGF- β reduce la acumulación nuclear de p27, una proteína inhibidora de cinasas que bloquea la entrada a la fase S del ciclo celular, y como resultado se promueve la proliferación de células β ⁴¹.

Actualmente se conocen varios SNPs distribuidos tanto en las regiones intrónicas y exónicas como en la región promotora de este gen, que se distribuyen en diferentes poblaciones del mundo y se han asociado a algunas enfermedades, tales como asma, cáncer, hipertensión arterial, aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, DT2, nefropatía diabética, entre otras^{12,34,42-46}.

Entre los SNPs que se han asociado a ND y algunas enfermedades cardiovasculares en el gen *TGF- β 1* se encuentra el rs1800470 (también denominado 869T/C o T29C en algunas investigaciones). Este SNP se localiza en un sitio conservado ubicado en el primer exón del gen y produce un cambio de la base Citosina (alelo ancestral) por la base Timina (alelo variante). Debido a que se encuentra en una región codificante, genera un cambio en el aminoácido que corresponde al codón 10, de Prolina (Pro) por el aminoácido Leucina (Leu)⁴⁷.

Se ha reportado que una mayor expresión de *TGF- β 1* influye en el desarrollo de la hipertrofia renal y en la acumulación de la matriz extracelular generando fibrosis, de aquí su asociación con la Nefropatía Diabética, una complicación común en pacientes con DT2^{7,37,48}. Por su parte, la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica localizada en el Hospital de Especialidades, "Dr. Bernardo Sepúlveda Gutiérrez", en Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social ha reportado en investigaciones previas con una población de niños

mexicanos de 6 a 14 años de edad, que la expresión de *TGF-β1* es mayor en aquellos niños con el genotipo TT (2.0 ± 0.2) en comparación con los que presentan el genotipo CC (1.1 ± 0.2 , $p=0.003$). Resultados similares se presentan en una población mexicana de adultos de 30 a 66 años de edad, donde la presencia del genotipo TT y alelo T en el genotipo CT del rs1800470 provocan un aumento estadísticamente significativo de la expresión de *TGF-β1* al comparar con el genotipo CC ($p=0.005$ y $p=0.047$, respectivamente)¹⁴⁻¹⁶.

Mou X *et al.* (2016) reportan que en una población china los genotipos CC y CT (rs1800470) presentan mayor susceptibilidad a ND⁸. En general, la mayoría de las investigaciones arrojan que el alelo C y genotipos CC/CT se asocian a una susceptibilidad para complicaciones de DT2 como es la ND en asiáticos, caucásicos y africanos, mientras que el alelo T y genotipo TT resultan ser protectores^{9-11,46}. Los resultados de Valladares A *et al.* (2010) para una población Mexicana, sugirieron que el alelo T (869 T>C) confiere protección contra ND¹².

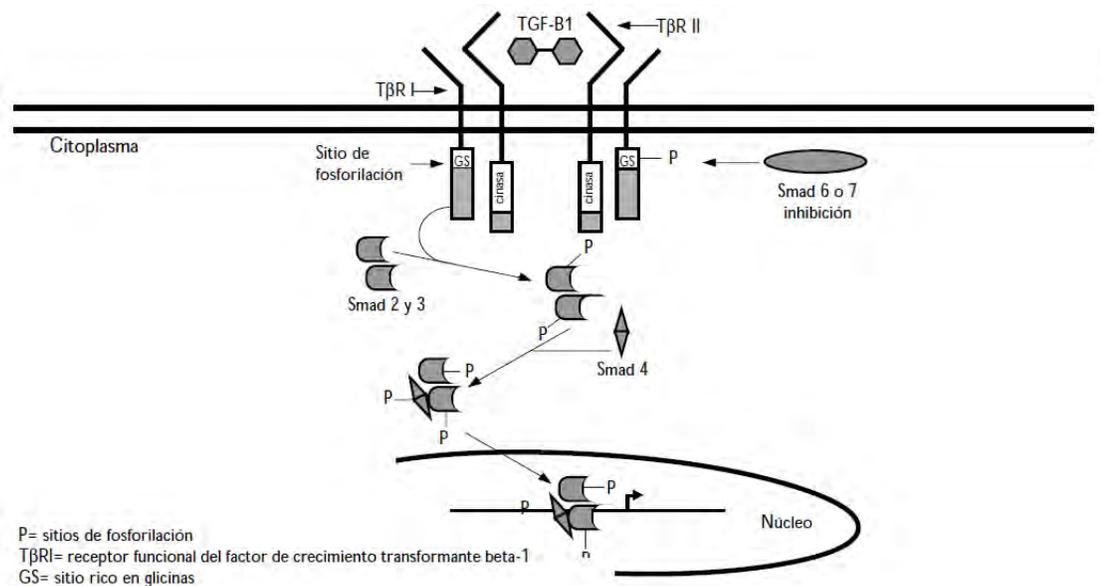


Figura 18. Señalización TGF-β1/Smads. Tomada de Peralta O *et al.* (2011)⁴⁹.

3.10. SIRT1

El gen *SIRT1* se localiza en el cromosoma 10 y codifica para una proteína homóloga a la proteína Sir2 de levadura. La proteína SIRT1 es una de las siete sirtuinas de los mamíferos que funciona como una deacetilasa dependiente de NAD⁺ sobre factores de transcripción, proteínas co-reguladoras transcripcionales, e histonas. Participa en una amplia variedad de funciones celulares, como diferenciación y proliferación celular, biogénesis mitocondrial, resistencia al estrés, apoptosis, el metabolismo energético y silenciamiento de la cromatina. Algunos de los procesos que modula SIRT1 en diferentes órganos son el metabolismo hepático, la glucólisis, la gluconeogénesis, la secreción de insulina y la acumulación de grasa en tejido adiposo^{50,51}. En las mitocondrias de las células β pancreáticas, la proteína UPC2 se encarga de controlar el desacoplamiento metabólico al disminuir el ATP en la célula, lo que genera una disminución en la secreción de insulina. Sin embargo, en presencia de la desacetilasa SIRT1 la expresión de *UPC2* es reprimida provocando un mejoramiento de la secreción de insulina y de la tolerancia a la glucosa^{13,52,53}.

Wang RH *et al.* (2011) encontraron que Sirt1 regula positivamente la transcripción del gen que codifica a Rictor (componente del complejo mTorc2), desencadenando una cascada de fosforilación de Akt y Foxo1, y por consecuencia una disminución de la transcripción de genes que participan en la gluconeogénesis como *G6pase* (glucosa-6-fosfatasa) y *Pepck* (fosfoenolpiruvato carboxiquinasa). Por lo tanto, una deficiencia de SIRT1 en hígado, causaría la sobreproducción de glucosa hepática e hiperglucemia crónica que podría conducir a la resistencia a la insulina⁵⁴. Por otro lado, Picard F *et al.* (2004) reportan que la sobreexpresión de

Sirt1 atenúa la adipogénesis debido a que *Sirt1* se une a PPAR- γ , provocando la represión de genes controlados por PPAR- γ y necesarios para que se lleve a cabo la diferenciación de los adipocitos⁵⁵.

Debido a esto, SIRT1 está implicada en la prevención de enfermedades relacionadas con la edad entre las que destacan la sarcopenia, Alzheimer, enfermedades cardiovasculares y DT2^{17,56-59}.

SIRT1 desempeña una importante función en el desarrollo del páncreas y formación de células β , ya que Wang RH *et al.* (2013) demostraron que SIRT1 regula positivamente la transcripción de *PDX1*, esencial en la formación de páncreas embrionario⁶⁰.

Como cualquier gen, en la secuencia de *SIRT1* se pueden encontrar SNPs, uno de ellos es el rs3758391 que se encuentra en la región promotora del gen y produce el cambio de base Timina (alelo ancestral) por Citosina (alelo variante)⁴⁷. Dado que este SNP se localiza en la región promotora, las funciones de *SIRT1* como regulador de la gluconeogénesis y la secreción de insulina podrían verse alteradas. En la UIMB del Hospital de Especialidades, “Dr. Bernardo Sepúlveda Gutiérrez”, en C.M.N Siglo XXI del IMSS, se reportó que en una población de niños mexicanos de 6 a 14 años de edad, el genotipo TT del rs3758391 provoca un aumento en la expresión de *SIRT1* (1.99 ± 0.68) comparado con el genotipo CC ($p=0.02$)^{14, 15}. En la misma unidad se demostró que en una población mexicana de adultos de 30 a 66 años de edad, la expresión de *SIRT1* se eleva con la presencia del genotipo TT comparado contra el genotipo CC ($p=0.001$)¹⁶. Hu Y *et al.* (2015) también han reportado que la expresión *SIRT1* es significativamente

más elevada con el genotipo TT que con los genotipos TC y CC en pacientes sanos de origen asiático¹⁷.

El rs3758391 se encuentra en desequilibrio de ligamiento con algunos otros SNPs, a los cuales no se les ha atribuido una asociación con las enfermedades antes mencionadas. Sin embargo, evaluar el efecto que tiene sobre la expresión génica la presencia de los SNPs en desequilibrio de ligamiento con el rs3758391, ayudaría a identificar si alguno de ellos es el SNP funcional que es responsable de la asociación descrita entre el rs3758391 y la DT2.

El rs932658 está ubicado a 209 pb río arriba de *SIRT1* y en un sitio conservado con una secuencia de bases que sugiere que es un sitio de unión proteínas-DNA. Este SNP produce un cambio de Guanina (alelo ancestral) por Timina (alelo variante)⁴⁷. La presencia de dicho SNP se ha asociado a Hernia inguinal y a la enfermedad del Parkinson^{61,62}.

Las variaciones en los niveles de expresión por la presencia de los SNPs son bastante evidentes según las investigaciones ya mencionadas, sin embargo, los mecanismos por los cuales se llevan a cabo dichas modificaciones no han sido del todo estudiados. Dado que estos mecanismos permitirían conocer más a fondo la fisiopatología de la DT2, en el presente trabajo se busca conocer el efecto que tiene la presencia de los SNPs en la interacción de proteínas reguladoras de la transcripción, paso que influye en gran medida en la regulación de la expresión génica.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En las últimas décadas la prevalencia de enfermedades crónicas como la obesidad y DT2 ha ido en aumento, esto es debido a cambios en el estilo de vida de las personas y a la predisposición genética. Los hábitos alimenticios, la edad, el sedentarismo y los factores genéticos, dentro de los cuales destacan los SNPs, tienen un impacto en la susceptibilidad de los individuos a padecer ciertas enfermedades (enfermedades multifactoriales), debido a que este cambio en el DNA pueden provocar, entre otras alteraciones, modificaciones en la expresión génica.

Hoy en día existen en el mundo varias enfermedades consideradas multifactoriales, entre ellas están el Alzheimer, asma, cáncer, enfermedades cardiovasculares, hipertensión arterial y DT2. La DT2 se ha convertido en una enfermedad común en el mundo siendo México y Estados Unidos dos de los países con una mayor incidencia de nuevos casos. A pesar de que hasta la fecha existen varios fármacos para controlarla, la DT2 es un padecimiento que ha cobrado muchas vidas durante los últimos años debido a las complicaciones que ésta conlleva.

La susceptibilidad a padecer DT2 aumenta con la presencia de SNPs de riesgo en varios genes ya identificados. Generalmente la asociación de la enfermedad con estos SNPs se confirma a través de modificaciones en la expresión génica, entre las que destacan alteraciones en los niveles de expresión de ciertos genes en presencia del alelo variante. Sin embargo, no existe la certeza de que el SNP asociado sea realmente el causal de dichas modificaciones, ya que en la mayoría de los casos, los SNPs asociados están en desequilibrio de ligamiento con otros

SNPs. Por lo tanto, éstos tienen la posibilidad de ser los SNPs causales o funcionales. Esto hace que la DT2 se convierta en una enfermedad aún más interesante para seguir evaluando los mecanismos responsables de su aparición. Investigaciones en la UIMB del Hospital de Especialidades, “Dr. Bernardo Sepúlveda Gutiérrez”, en C.M.N Siglo XXI del IMSS y en otras partes del mundo, indican que la presencia del alelo variante T del rs1800470 en *TGF-β1* y el alelo T del rs3758391 en *SIRT1*, generan un aumento de la expresión de estos genes en pacientes con DT2. Retomando estos hallazgos y considerando que la unión de proteínas al DNA es un paso clave durante la regulación de la expresión génica, en el presente trabajo se planteó la siguiente pregunta de investigación ¿el cambio de base del polimorfismo rs1800470 del gen *TGF-β1* y, rs3758391 y rs932658 del gen *SIRT1*, alteran la unión proteína-DNA?

5. HIPÓTESIS

La presencia de los rs1800470 y rs3758391 genera modificaciones en los niveles de expresión de *TGF-β1* y *SIRT1*, por lo que suponemos que el cambio de base de estos SNPs y el rs932658 en desequilibrio de ligamiento con el rs3758391 modificará positiva y/o negativamente la unión de proteínas al DNA.

6. OBJETIVOS

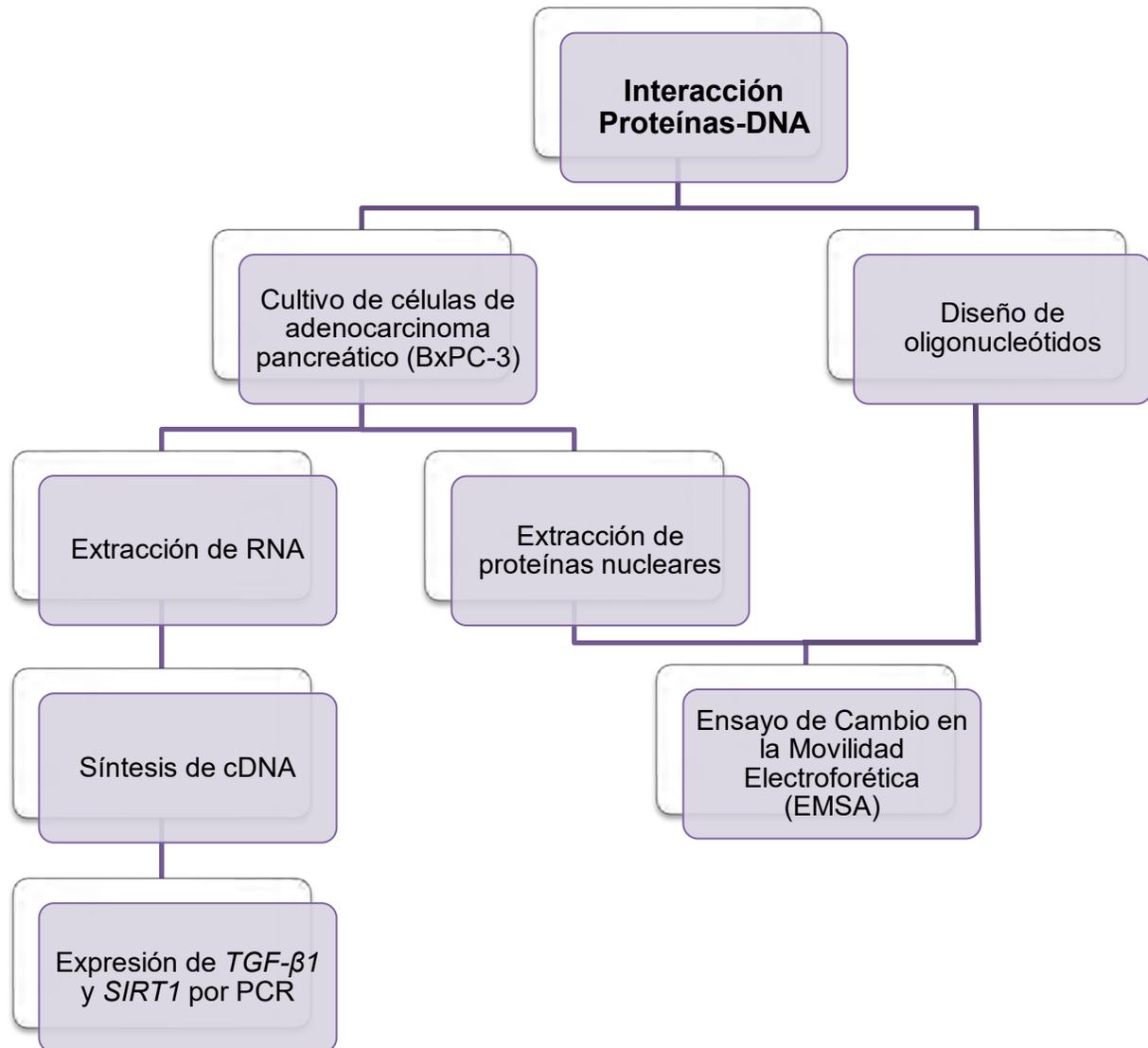
6.1. Objetivo General

Determinar si los polimorfismos rs1800470 del gen *TGFβ1* y, rs3758391 y rs932658 del gen *SIRT1* se localizan en sitios de unión de proteínas nucleares y evaluar si los cambios de nucleótidos alteran la unión de proteína-DNA.

6.2. Objetivos específicos

- Diseñar oligonucleótidos de doble cadena que contengan los alelos C y T para el rs1800470, T y C para el rs3758391 y G y T para el rs932658.
- Verificar la expresión de los genes *TGF-β1* y *SIRT1* en la línea celular BxPC-3 mediante PCR de punto final.
- Extraer proteínas nucleares a partir de la línea celular de adenocarcinoma pancreático BxPC-3.
- Determinar si los polimorfismos rs1800470 del gen *TGF-β1* y, rs3758391 y rs932658 del gen *SIRT1* se localizan en sitios de unión proteína-DNA e identificar si el alelo de riesgo favorece o inhibe esta unión utilizando la técnica de Ensayo de Cambio en la Movilidad Electroforética (EMSA, por sus siglas en inglés).

7. MATERIALES Y MÉTODOS



7.1. Material Biológico

Para los cultivos celulares se utilizó la línea celular BxPC-3 (ATCC CRL-1687). Éstas son células adherentes de adenocarcinoma pancreático y de morfología epitelial, provenientes de una mujer caucásica de 61 años de edad (Figura 19). Se propagaron en cajas de Petri de 100 x 15 mm, en medio RPMI-1640 (ATCC 30-2001) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB ATCC 30-2020) y 1%

de Penicilina-Estreptomicina (Gibco), se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%.

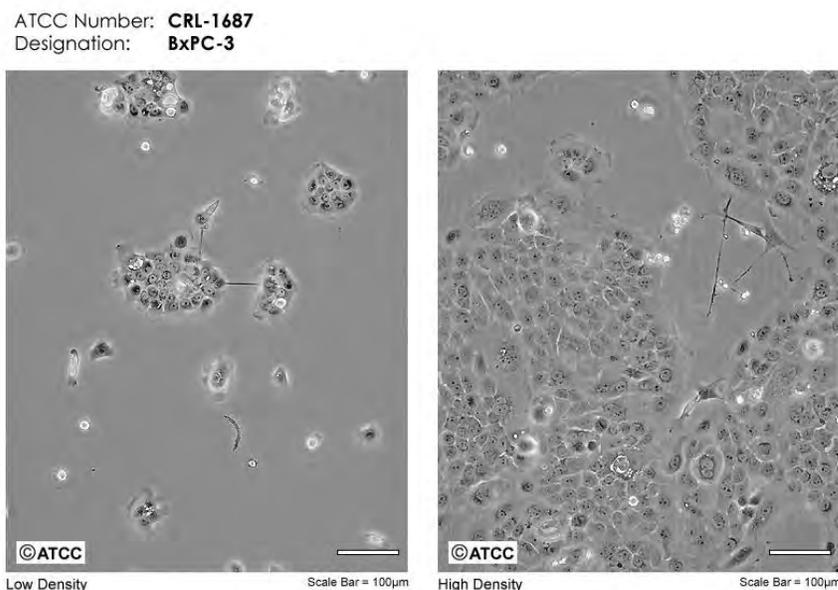


Figura 19. Morfología de células BxPC-3 de adenocarcinoma pancreático. Baja densidad células (a la izquierda) y alta densidad de células (a la derecha).

Tomada de <https://www.atcc.org/Products/All/CRL-1687.aspx#characteristics>

7.2. Extracción de RNA

A partir de una caja P-100 al 80% de confluencia de células BxPC-3 se realizó la extracción de RNA, para la cual se rasparon y resuspendieron las células en 4 mL de "Tripure Isolation Reagent" (Roche). El volumen total se dividió en 5 tubos microtubos de 1.5 mL. Posteriormente, se agregaron 160 µL de cloroformo a cada tubo y se homogenizaron en el vórtex. El RNA se separó por centrifugación a 12,000 xg por 15 minutos a 4°C y se tomó la fase acuosa (fase superior). El RNA se precipitó con isopropanol (relación 1:1) y se incubó a -70°C durante 1 hora, y se purificó mediante lavados con etanol al 75%. El pellet obtenido por centrifugación a 7,500 xg por 5 minutos a 4°C se dejó secar al aire y se resuspendió en 40 µL de agua DEPC. Se repitió el proceso de extracción con 500 µL de Tripure, 100 µL de

cloroformo, isopropanol (relación 1:1) y 15 μL de acetato de amonio, esta vez incubando a -70°C durante una noche y el pellet se resuspendió en 90 μL de agua DEPC.

La pureza y concentración se determinó por espectrofotometría calculando la relación 260nm/280nm y 260nm/230nm en el espectrofotómetro EPOCH (BioTek), mientras que la integridad se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio.

7.3. Tratamiento con DNAsa

Los residuos de DNA en el RNA obtenido, se eliminaron mediante el tratamiento con la endonucleasa DNAsa del Kit "Thermo Scientific DNase molecular biology" (Thermo Fisher Scientific). El tratamiento consistió en adicionar 1 μL de Buffer 10X, 1 U de DNAsa y 4.8 μL de agua DEPC a 1 μg de RNA. La mezcla se incubó 30 minutos a 37°C en un termociclador marca Axygen Maxygen, posteriormente se adicionó 1 μL de EDTA 50 mM y se incubó a 65°C durante 10 minutos en el termociclador para inactivar a la enzima.

Para comprobar la efectividad del tratamiento con DNAsa, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final con el Kit "Platinum Taq DNA Polymerase" (Invitrogen). El volumen de la mezcla para la reacción de PCR fue de 25 μL , conteniendo 2.5 μL de PCR buffer 10X, 0.5 μL de dNTPs mix 10mM, 0.75 μL de MgCl_2 50 mM, 0.3 μM del iniciador sentido (5' ACAGGTTGCGGGAATCCAAA 3'), 0.05 μM del iniciador antisentido (5' GTTCATCAGCTGGGCACCTA 3'), 14.75 μL de agua DEPC, 0.5 μL de Plat Taq DNA Polimerasa (dilución 1:5) y 1 μL del RNA tratado con DNAsa. Las

condiciones de reacción se llevaron a cabo en un termociclador marca Axygen Maxygen de acuerdo con la Tabla 3. Los productos obtenidos se almacenaron a -20°C.

# ciclos	1 ciclo	35 ciclos			1 ciclo
Etapa	Incubación	Desnaturalización	Alineación de iniciadores	Amplificación	Enfriamiento
Temperatura	94 °C	94 °C	60°C	72°C	4°C
Tiempo	1:30 min	30 seg	30 seg	30 seg	∞

Tabla 3. Condiciones de PCR de punto final. Las abreviaturas min=minutos y seg=segundos

7.4. Síntesis de cDNA

El mRNA tratado con DNAsa se sometió a la técnica de transcriptasa inversa-PCR (RT-PCR) para la obtención de cadenas de cDNA usando el Kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription” (Applied biosystems). La mezcla de reacción de PCR fue de 20 µL, conteniendo 2 µL de bufer RT 10X, 0.8 µL de dNTPs mix 100 mM, 2 µL de iniciadores aleatorios 10X, 1 µL de Transcriptasa Reversa, 4.2 µL de agua DEPC y 10 µL de RNA tratado con DNAsa. Las condiciones de reacción de la Tabla 4 se llevaron a cabo en un termociclador marca Axygen Maxygen. Posteriormente los productos obtenidos se almacenaron a -20°C. Una vez obtenido el cDNA, se realizó una PCR de punto final para evaluar la expresión de los genes a estudiar.

Condiciones	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3
Temperatura	25 °C	37 °C	4 °C
Tiempo	10 min	120 min	∞

Tabla 4. Condiciones para síntesis de cDNA.

7.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final

Para corroborar la expresión de los genes a estudiar se llevó a cabo una PCR de punto final utilizando las condiciones de la Tabla 3 e iniciadores correspondientes a cada gen. Para *TGF-β1* se empleó el iniciador sentido 0.3 μM (5' GCTGAGGTATCGCCAGGAAT 3') y el iniciador antisentido 0.9 μM (5' TACCTGAACCCGTGTTGCTC 3'), para *SIRT1* el iniciador sentido 0.3 μM (5' ACAGGTTGCGGGAATCCAAA 3') y el iniciador antisentido 0.05 μM (5' GTTCATCAGCTGGGCACCTA 3'), y para el gen de referencia, PGK1, se utilizaron iniciadores 0.3 μM (sentido 5' CAAGAAGTATGCTGAGGCTGTCA 3' y antisentido 5' CAAATACCCCCACAGGACCAT 3').

Los productos de amplificación de PCR se analizaron mediante geles de agarosa al 3 %, teñidos con bromuro de etidio.

7.6. Diseño de oligonucleótidos de doble cadena

Investigaciones previas en la UIMB indican que existe un aumento de la expresión de *TGF-β1* y *SIRT1* asociada a la presencia de los polimorfismos rs1800470 y rs3758391, respectivamente. Mediante un análisis *in silico* empleando el software de "HaploReg v4.1-Broad Institute"⁶³ se determinó que el rs1800470 se encuentra en un sitio conservado, con posibilidad de unión a 4 proteínas y se ubica en una región codificante, el rs3758391 no está en un sitio conservado, no presenta proteínas de unión y se encuentra a 1.1 Kb del sitio de inicio de la transcripción, y el rs932658 está en un sitio conservado, con 23 proteínas de unión, se ubica a 209 pares de bases del sitio de inicio de la transcripción y además está en desequilibrio de ligamiento con el rs3758391 (LD=1, también representado como

D'). Por lo que se diseñaron oligonucleótidos de doble cadena que contenían a estos SNP. Estos oligonucleótidos se usaron en los ensayos EMSA.

Utilizando la secuencia reportada en NCBI se comenzó el diseño de oligonucleótidos de doble cadena que contenían en su secuencia el alelo ancestral y con el alelo variante de los SNPs de estudio. Para seleccionar la región a sintetizar y número de pares de base se utilizó la base de datos de “Regulatory motifs altered de HaploReg v4.1-Broad Institute”. Ésta contiene una lista que muestra sitios potenciales de unión de proteínas a DNA. El número de pares de bases para el diseño de los oligonucleótidos se eligió de tal manera que se abarcaron las posibles regiones de unión de cualquiera de las proteínas enlistadas. A partir de esto se diseñaron oligonucleótidos de 32 pares de bases para el rs1800470, 27 pares de bases para el r3758391 y 32 pares de bases para el rs932658 (Tabla 5).

Gen	SNP	Secuencia de oligonucleótido
<i>SIRT1</i>	rs3758391	5' GATCTACCA[T/C]GGGTTATATGGGTCCTT 3' 3' CTAGATGGT[A/G]CCCAATATACCCAGGAA 5'
<i>SIRT1</i>	rs932658	5' CGGCGGCCGGCGGCCCT[G/T]CCTCTTTGTGGCGA 3' 3' GCCGCCGGCCGCCGGGA[C/A]GGAGAAACACCGCT 5'
<i>TGF-β1</i>	rs1800470	5' GCTGCGGCTGCTGC[C/T]GCTGCTGCTACCGCTGC 3' 3' CGACGCCGACGACG[G/A]CGACGACGATGGCGACG 5'

Tabla 5. Secuencia de oligonucleótidos. Se muestra la secuencia de los oligonucleótidos de DNA diseñados con el alelo ancestral/alelo variante de cada SNP estudiado.

Se solicitaron oligonucleótidos biotilados en el extremo 5' de una hebra de la cadena de DNA y oligonucleótidos no biotilados para ser empleados con el Kit “LightShift Chemiluminescent EMSA” (Pierce/ Thermo Fisher Scientific) durante el Ensayo de Cambio en la Movilidad Electroforética (EMSA).

7.7. Alineación de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos biotilizados y no biotilizados se prepararon con un buffer de alineamiento de pH 7.5-8.0 que contenía Tris 10 mM, NaCl 50 mM y EDTA 1 mM. Se sometieron a un proceso de alineación en el termociclador marca Axygen Maxyge donde se calentaron a 95°C durante 2 minutos. Posteriormente, se disminuyó gradualmente la temperatura durante 45 minutos hasta alcanzar los 25°C. Se prepararon alícuotas y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

7.8. Extracción de proteínas nucleares

Para la extracción de proteínas nucleares se empleó el Kit "NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents" (Thermo Fisher Scientific).

Cuando las células BxPC-3 llegaron a una confluencia del 80% se cosecharon con 500 µL de Tripsina-EDTA 0.25%/500 µL de PBS 1X (Gibco, Novex) y se contaron en una cámara de Neubauer mediante la técnica de exclusión con una solución de Azul de Tripán 0.4% (Gibco). Únicamente 2×10^6 células se transfirieron a un microtubo de 1.5 mL y se centrifugaron a 500 xg por 2-3 minutos, se aspiró el sobrenadante, dejando el pellet lo más seco posible, enseguida se adicionaron 200 µL de CER I frío (con inhibidor de proteasa), se vortexeó por 15 segundos y se incubó en hielo durante 10 minutos. Posteriormente se adicionaron 11 µL de CER II frío, se vortexeó por 5 segundos, se incubó en hielo por 1 minuto, se volvió a vortexear por 5 segundos y se centrifugó a 16.000 xg durante 5 minutos para obtener el extracto citoplásmico (sobrenadante), el cual se almacenó a -70°C. Por otro lado, el pellet obtenido se resuspendió en 100 µL de NER frío (con inhibidor de proteasa), se colocó en hielo y se continuó vortexeando durante 15 segundos cada 10 minutos hasta un total de 40 minutos. Posteriormente se centrifugó a

16.000 xg por 10 minutos y se separó el extracto nuclear (sobrenadante) en un microtubo pre-enfriado y limpio, y se almacenó a -70°C.

7.9. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Las proteínas nucleares fueron cuantificadas por el método de Bradford, empleando para ello una curva estándar con Albúmina de Suero Bovino (BSA, por sus siglas en inglés).

- Reactivo de Bradford: Contení 100 mg de azul brillante de Coomasie, 50 mL de etanol al 95%, 100 mL de ácido fosfórico concentrado en un volumen final de 200 mL con agua destilada.
- Curva estándar: Se preparó con las condiciones de la Tabla. 6, se incubó durante 5 minutos con el reactivo de Bradford y enseguida se leyó la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro Perkin Elmer. La curva estándar se realizó por duplicado y del promedio resultante se extrapolo la absorbancia obtenida de las muestras problema.

Tubo	BSA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Reactivo de Bradford (mL)
1	0	5
2	0.02	5
3	0.04	5
4	0.06	5
5	0.08	5
6	0.10	5
7	0.12	5
8	0.14	5

Tabla 6. Curva estándar con Albúmina de Suero Bovino. Cada uno de los tubos se preparó a un volumen de 100 μL con la solución de Albúmina de Suero Bovino (1mg/mL) y agua destilada.

Muestra problema: Se preparó una dilución 1:5 de la muestra de proteínas extraídas (10 µL de proteínas + 40 µL de agua destilada), a 20 µL de la dilución se le adicionaron 80 µL de agua destilada y 5 mL del reactivo de Bradford. Se incubó 5 minutos y se leyó la absorbancia a 595nm.

7.10. Ensayo de Cambio en la Movilidad Electroforética (EMSA)

Para determinar si hay una interacción de las proteínas nucleares con el DNA, los extractos nucleares obtenidos y los oligonucleótidos biotinilados y no biotinilados se sometieron a un Ensayo de Cambio en la Movilidad Electroforética (EMSA) con el Kit "LightShift Chemiluminescent EMSA" (Pierce/ Thermo Fisher Scientific).

7.10.1. Gel de poliacrilamida

Se prepararon geles de poliacrilamida al 4%, para lo cual se colocaron 600 µL de Acrilamida/Bisacrilamida (29:1, Sigma Aldrich) en un vial de 10 mL, posteriormente se adicionaron 4158 µL de agua estéril, 1.2 mL de TBE 5X (Novex) y 42 µL de Persulfato de Amonio al 10% (Sigma Aldrich). Para acelerar la polimerización de la solución del gel de poliacrilamida, se resuspendieron 2.1 µL de tetrametiletilendiamina (Sigma Aldrich) en la solución anterior y enseguida se colocó entre los vidrios montados en el soporte espaciador, se colocó el peine y se esperó a que el gel polimerizara completamente.

Una vez polimerizado se retiró el peine con el mayor cuidado posible, los vidrios con el gel se ensamblaron en el soporte de electrodos y se colocaron dentro de la cámara de electroforesis vertical. El espacio interno y externo de los electrodos se llenó con TBE 0.5X hasta que los pozos quedaron sumergidos en el buffer. Los pozos se lavaron con mucho cuidado con el TBE 0.5X contenido en la cámara de electroforesis.

7.10.2. Preparación de reacciones de unión

Se prepararon las reacciones de unión para el Sistema Control EBNA (Kit Light Shift EMSA Optimization and Control, Tabla 7) y el Sistema de Prueba (con extractos de proteínas nucleares extraídos, Tabla 8) empleando los oligonucleótidos con el alelo ancestral y el alelo variante de cada SNP, se dejaron incubar 20 minutos para posteriormente adicionar 5 μ L del buffer de carga 5X.

Componentes	Concentración Final	Reacciones control		
		#1	#2	#3
Agua DEPC	---	12 μ L	11 μ L	9 μ L
Buffer de unión 10X	1X	2 μ L	2 μ L	2 μ L
Glicerol 50%	2.5%	1 μ L	1 μ L	1 μ L
MgCl ₂ 100 mM	5 mM	1 μ L	1 μ L	1 μ L
Poly (dl-dC) 1 μ g/ μ L	50 ng/ μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L
NP-40 1%	0.05%	1 μ L	1 μ L	1 μ L
DNA EBNA No Biotilinado	4 pmol	---	---	2 μ L
Extracto EBNA	1 Unit	---	1 μ L	1 μ L
DNA EBNA Control Biotilinado	20 fmol	2 μ L	2 μ L	2 μ L
Volumen Total	---	20 μ L	20 μ L	20 μ L

Tabla 7. Reacciones de unión para el Sistema Control EBNA.

Componentes	Concentración Final	Reacciones de Prueba		
		#1	#2	#3
Agua DEPC	---	8 μ L	5.5 μ L	3.5 μ L
Buffer de unión 10X	1X	2 μ L	2 μ L	2 μ L
Poly (dl-dC) 1 μ g/ μ L	50 ng/ μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L
Glicerol 50%	2.5%	1 μ L	1 μ L	1 μ L
NP-40 1%	0.05%	1 μ L	1 μ L	1 μ L
DNA No Biotilinado	4 pmol	---	---	2 μ L
Proteína nuclear de BxPcC-3	3 μ g	---	2.5 μ L	2.5 μ L
DNA Biotilinado	20 fmol	2 μ L	2 μ L	2 μ L
Volumen Total	---	15 μ L	15 μ L	15 μ L

Tabla 8. Reacciones de unión para el Sistema de Prueba.

7.10.3. Electroforesis

Se realizó una pre-corrída del gel durante 30-40 minutos y los pozos se volvieron a lavar una vez concluida ésta. Posteriormente los pozos se cargaron con las reacciones de unión preparadas y se dejarán correr a 100 V hasta que el colorante azul de bromofenol del buffer de carga migró aproximadamente 2/3 a 3/4 abajo de la longitud del gel. Enseguida se realizó la transferencia electroforética a membranas de nylon Biodyne B Pre-cortadas de 0.45 μm (Thermo Scientific) a 380 mA durante 30 minutos. La membrana de nylon se sometió a entrecruzamiento en el transiluminador Gel Doc 2000 (Bio Rad) durante 2:50 minutos y se guardó en un recipiente de plástico.

Al día siguiente se llevó a cabo la detección de DNA marcado con biotina por quimioluminiscencia utilizando el "Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module" (incluido en el Kit) para observar la unión de proteína-DNA. La membrana se incubó 15 minutos con buffer de bloqueo, después se incubó 15 minutos con buffer de bloqueo/estreptavidina-peroxidasa de rábano picante, se realizaron cinco lavados de 5 minutos cada uno, con buffer de lavado 1X y se incubó después durante 5 minutos con buffer de equilibrio. Enseguida, la superficie de la membrana se cubrió con la solución de Luminol y peróxido estable, dejándola incubar por 2 minutos. Finalmente la membrana se reveló en el equipo Fusion Fx (Vilber Lourmat), la membrana se colocó sobre la superficie superior y se observó mediante el software Fusion con 50 segundos de exposición para el rs1800470, 60 segundos para el rs3758391 y 30 segundos de exposición para el rs932658.

Cada EMSA se realizó por triplicado para cada uno de los SNPs de estudio.

8. RESULTADOS

8.1. Expresión de *SIRT1* y *TGF-β1*

Para corroborar la expresión de los genes de estudio en la línea celular BxPC-3 se realizó la extracción de RNA a partir de dos cajas de cultivos celulares. De cada caja se obtuvieron dos microtubos de RNA con las concentraciones y pureza representadas en la Tabla 9. La relación 260/230 nm indica la pureza del RNA frente a contaminantes como fenol, tiocianato de guanidina y algunas otras sustancias contenidas en los reactivos empleados durante la extracción. Por otro lado, la relación 260/280 nm se relaciona a la pureza del RNA con respecto a la contaminación con proteínas, ya que las proteínas absorben energía, principalmente, a una longitud de onda de 280 nm. La presencia de proteínas hace disminuir la relación, por lo que valores menores a 1.7 indican una cantidad alta de proteínas en la muestra y valores mayores a 2.0 sugieren rotura de las cadenas de RNA.

En el caso del RNA que se extrajo, la relación 260/230 nm para las muestras se encuentran ligeramente arriba del rango permitido. Sin embargo, la relación 260/280 nm indica un alto grado de pureza del RNA. La concentración obtenida de cada muestra fue la adecuada para realizar los experimentos planeados (Tabla 9).

Muestra	Relación 260/230 nm	Relación 260/280 nm	Concentración (ng/μL)
1	2.5	2.0	311
2	2.3	2.0	324
3	2.4	2.1	367
4	2.5	2.0	305

Tabla 9. Características del RNA extraído. La pureza (relación 260/230 nm y 260/280 nm) y concentración (ng/μL) del RNA extraído a partir de cultivos de células BxPC-3 se determinaron por espectrofotometría.

La integridad del RNA se corroboró mediante un gel de agarosa al 0.8% (Figura 20) donde se observan claramente las dos subunidades ribosomales (28S y 18S) de cada una de las muestras indicando un RNA de muy buena calidad.

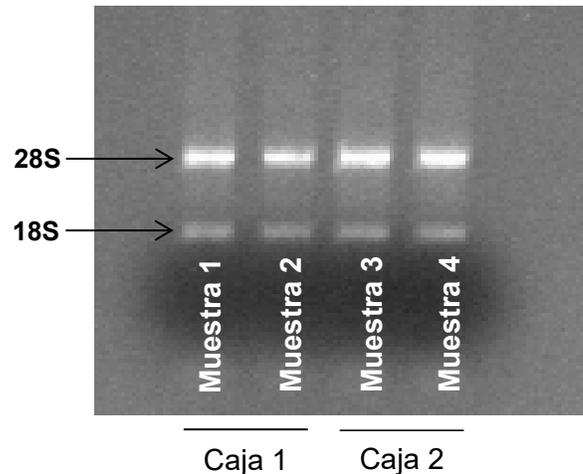


Figura 20. Integridad del RNA. Electroforesis del RNA de las células BxPC-3 en gel de agarosa al 0.8%.

Se realizó el tratamiento con DNAsa a partir de 1 μ g y 600 ng de RNA. La eficiencia del tratamiento con DNAsa se verificó mediante PCR de punto final. Los productos de amplificación se corrieron a 80 V durante 35 minutos en un gel de agarosa al 3% (Figura 21). No se observó amplificación de las muestras tratadas con DNAsa, lo que indica que el tratamiento fue suficiente para eliminar residuos de DNA para ambas cantidades de RNA.

Se realizó la síntesis de cDNA y posteriormente se corroboró la expresión de los genes *SIRT1* y *TGF- β 1* mediante PCR de punto final utilizando como control positivo el gen *PGK1*. En la Figura 22 se observan los productos de amplificación esperados. Para *SIRT1* se obtuvieron productos de amplificación de 155 pb, para *TGF- β 1* los productos fueron de 119 pb y para *PGK1* de 68 pb, por lo tanto se corroboró que las células BxPC-3 que se emplearon en este estudio expresan a *SIRT1* y *TGF- β 1*.

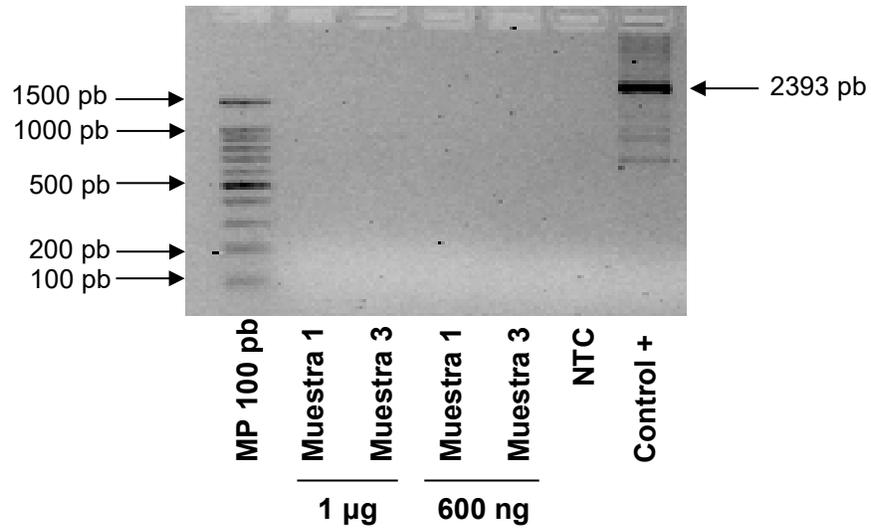


Figura 21. Tratamiento con DNasa. Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los productos de amplificación por PCR.

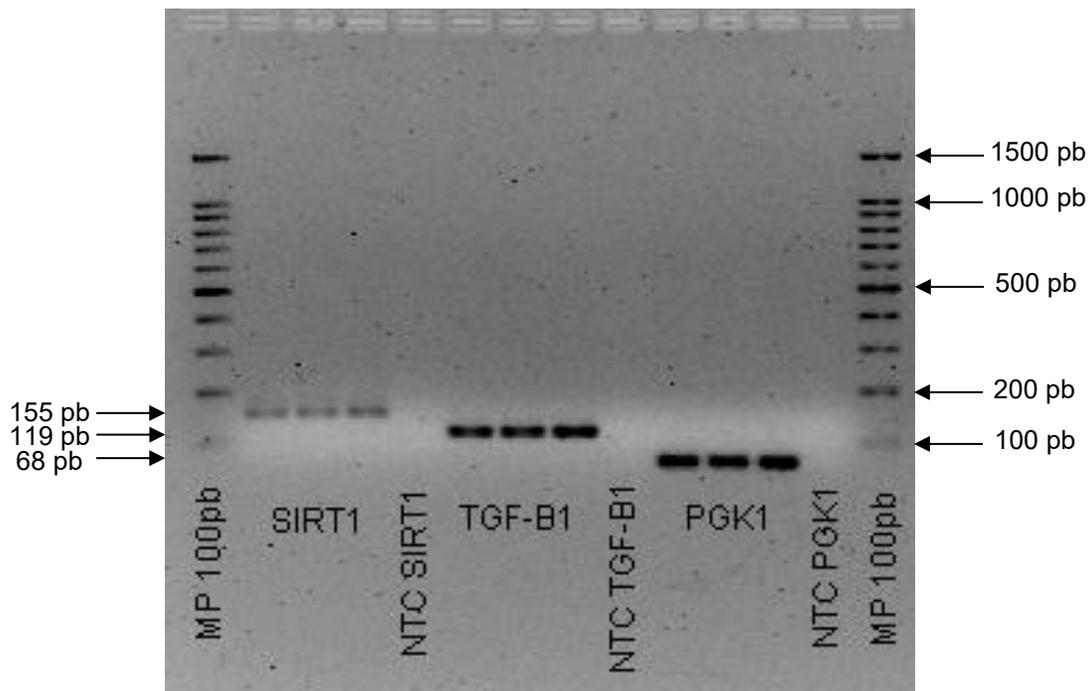


Figura 22. Expresión de *SIRT1* y *TGF-β1*. Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los productos de amplificación por PCR para verificar expresión de *SIRT1*, *TGF-β1*. *PGK1* se empleó como control para la reacción de amplificación.

8.2. Proteínas nucleares de células BxPC-3

Las proteínas nucleares obtenidas de las células BxPC-3 mediante la extracción con el Kit “NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents” (Thermo Fisher Scientific) se cuantificaron con el método de Bradford. En la Tabla 10 se muestran los valores de absorbancia obtenidos por espectrofotometría de la curva estándar con albúmina de suero bovino. Estos resultados se graficaron y se realizó una regresión lineal (Figura 23) que se utilizó para interpolar y obtener la concentración de la muestra de proteínas nucleares extraídas.

Tubo	BSA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Absorbancia
1	0	0.046
2	0.02	0.099
3	0.04	0.131
4	0.06	0.156
5	0.08	0.183
6	0.10	0.212
7	0.12	0.241
8	0.14	0.215

Tabla 10. Absorbancias de la curva estándar con Albúmina de Suero Bovino

En la Figura 23 se muestra la gráfica de la curva estándar (absorbancia vs BSA). De la ecuación de la recta obtenida se despejó x para obtener la concentración de la muestra, la cual resultó en $0.049 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína. Este resultado se multiplicó por 25, dado que el factor de dilución para preparar la muestra fue de 1:25. Por lo tanto, la concentración de la muestra de proteínas nucleares extraídas de las células BxPC-3 fue de $1.23 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Tabla 11).

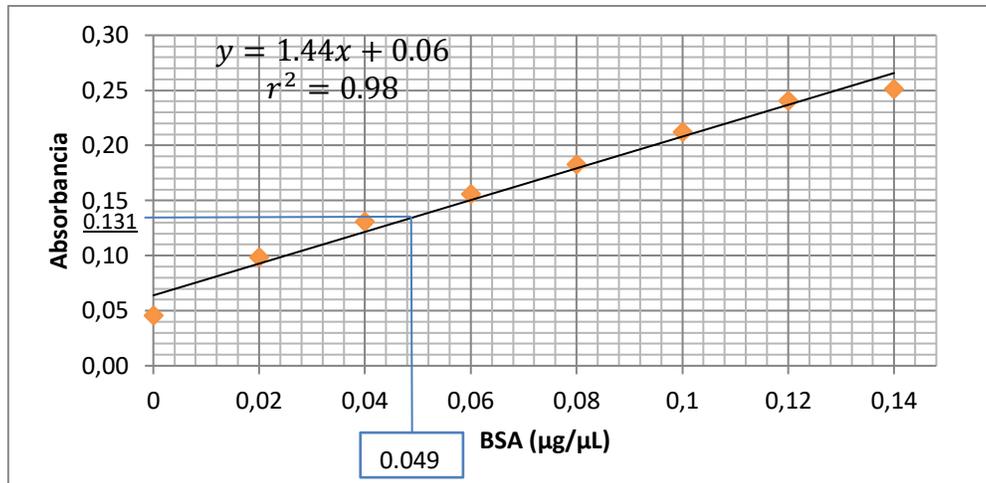


Figura 23. Regresión lineal de la curva estándar de Albúmina de Suero Bovino.

Proteína Nuclear	Concentración
BxPC-3	1.23 µg/µL

Tabla 11. Concentración de la proteína nuclear de las células BxPC-3

8.3. Oligonucleótidos de DNA

Los oligonucleótidos de DNA biotilizado y no biotilizado se sometieron al protocolo de alineación y posteriormente se corrieron en geles de agarosa al 4% a 80V durante 35 minutos para corroborar el alineamiento de las dos hebras. En la Figura 24 se muestran el corrimiento de 15 pmoles de los oligonucleótidos biotilizado para cada uno de los alelos (ancestral y variante) de cada SNP. Mientras que en la Figura 25 se observan 30 pmoles de los oligonucleótidos no biotilizados. En todos los casos se observó la banda correspondiente al DNA de doble cadena.

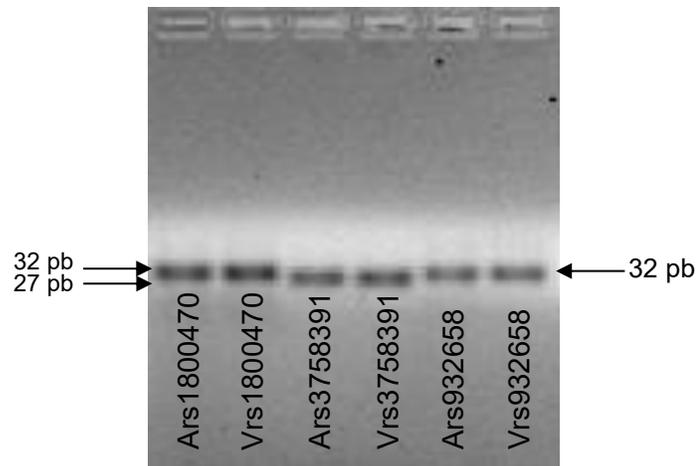


Figura 24. Oligonucleótidos de DNA biotilados. Electroforesis en gel de agarosa al 4% de oligonucleótidos de DNA biotilados. Alelo ancestral (A), alelo variante (V).

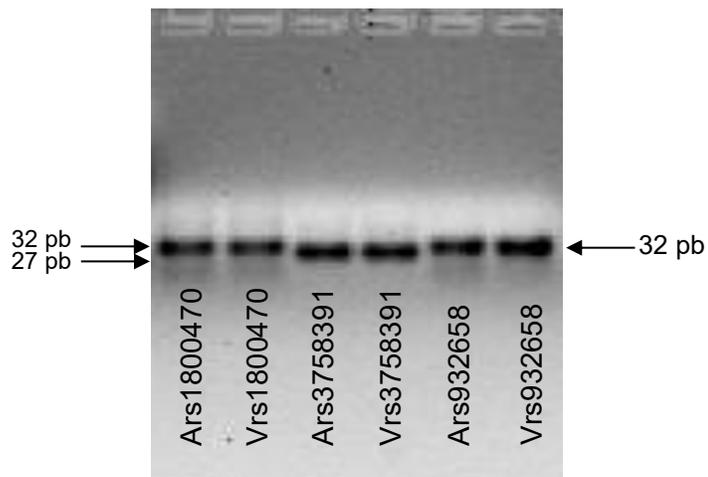


Figura 25. Oligonucleótidos de DNA no biotilados. Electroforesis en gel de agarosa al 4% de oligonucleótidos de DNA no biotilados. Alelo ancestral (A), alelo variante (V).

8.4. Ensayo de Cambio de Movilidad Electroforética (EMSA)

Con la finalidad de determinar la posible interacción de proteínas con las regiones del DNA donde se localizan los SNPs rs1800470, rs3758391 y rs932658, los extractos de proteínas nucleares obtenidos y los oligonucleótidos biotinilado y no biotinilado de cada SNP se sometieron a un Ensayo de Cambio en la Movilidad Electroforética (EMSA) con el Kit “LightShift Chemiluminescent EMSA” (Pierce/

Thermo Fisher Scientific). En este ensayo, la interacción de proteínas con el DNA se observará con un corrimiento más lento entre los complejos proteína-DNA respecto al DNA libre.

En todos los ensayos se incluyó el Sistema Control del Kit y el Sistema de Prueba. Este último contiene las reacciones de unión entre las proteínas nucleares de BxPC-3 con los oligonucleótidos del alelo ancestral (A) y del alelo variante (V) de cada SNP estudiado (rs1800470, rs3758391 y rs932658).

En la Figura 26 se muestra la membrana con las reacciones correspondientes al EMSA empleando los oligonucleótidos con los dos alelos del rs1800470 del gen *TGF- β 1*. No se observó ningún cambio de movilidad en los carriles que contenían la mezcla proteínas-DNA biotilizado, por lo que concluimos que no hubo una unión de las proteínas nucleares de las células BxPC-3 en presencia del alelo ancestral ni en presencia del alelo variante. En los carriles correspondientes el Sistema Control del kit se observó la distribución esperada de las bandas, lo cual corresponde a lo predicho en el protocolo del Kit “LightShift Chemiluminescent EMSA” (Thermo Fisher Scientific) en el Anexo 2.

Se obtuvieron resultados muy similares con los dos alelos del rs3758391 del gen *SIRT1*. En la Figura 27 se aprecia una sola banda para todas las reacciones del Sistema de Prueba, es decir, no existe unión de proteínas nucleares a este fragmento de DNA ni con el alelo ancestral, ni con el alelo variante. Por su parte, en la membrana de la Figura 28 para el rs932658 del gen *SIRT1* también se observó que no hay unión de proteínas a los alelos de este SNP, únicamente se ve el corrimiento del oligonucleótido biotilizado.

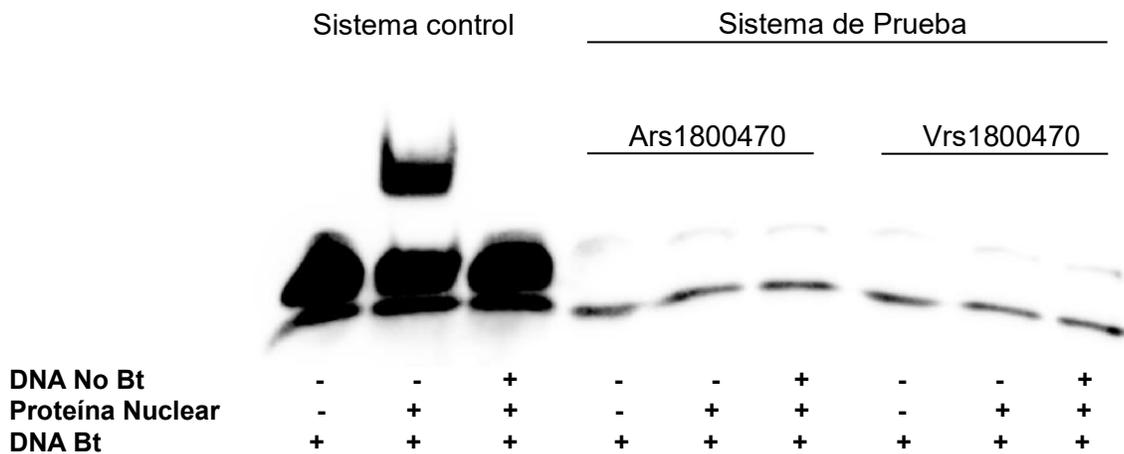


Figura 26. Ensayo de Cambio en la Movilidad Electroforética (EMSA) para el rs1800470 del gen *TGF-β1*. El Ars1800470 se refiere a las reacciones con los oligonucleótidos que contienen el alelo C (ancestral) y el Vrs1800470 contiene al alelo T (variante).

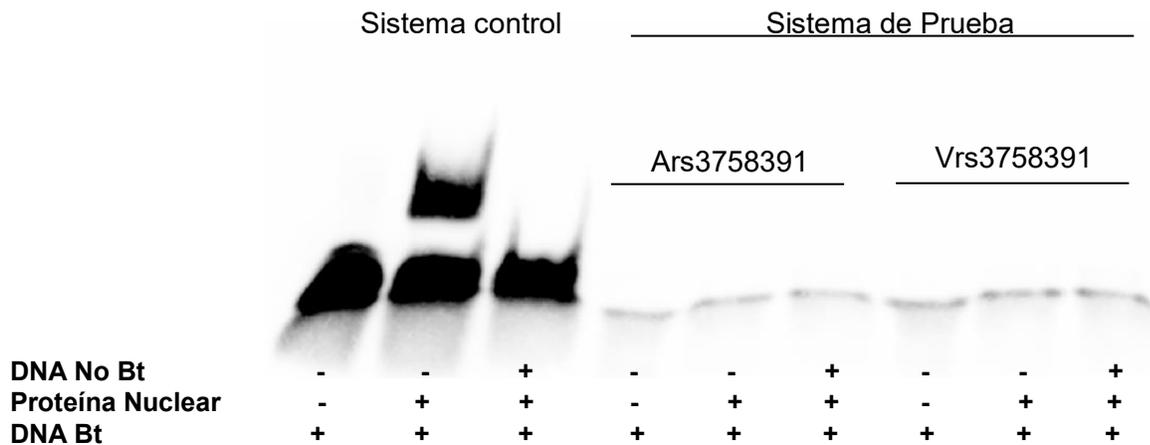


Figura 27. Ensayo de Cambio en la Movilidad Electroforética (EMSA) para el rs3758391 del gen *SIRT1*. El Ars3758391 se refiere a las reacciones con los oligonucleótidos que contienen el alelo T (ancestral) y el Vrs3758391 contiene al alelo C (variante).

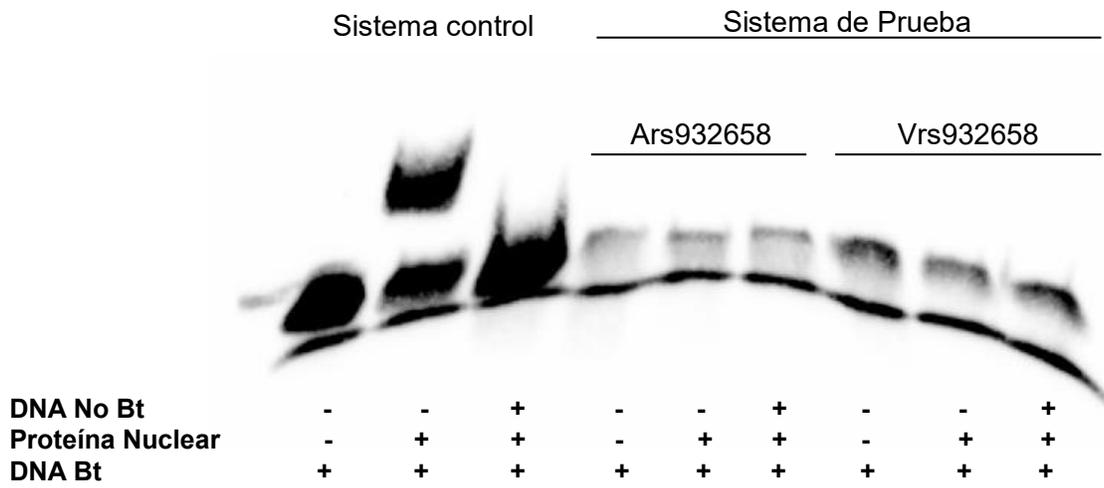


Figura 28. Ensayo de Cambio en la Movilidad Electroforética (EMSA) para el rs932658 del gen *SIRT1*. El Ars932658 se refiere a las reacciones con los oligonucleótidos que contienen el alelo G (ancestral) y el Vrs932658 contiene al alelo T (variante).

Por lo tanto las células BxPC-3 no expresan proteínas que se unan a las regiones estudiadas en las condiciones de cultivo empleadas.

9. DISCUSIÓN

El estilo de vida y los factores genéticos como los SNPs tienen gran influencia en la susceptibilidad de los individuos a padecer DT2. Los SNPs pueden provocar, entre otras alteraciones, modificaciones en la expresión génica. En el organismo deben existir determinados niveles de expresión de los genes para lograr la homeostasis y un buen funcionamiento de la maquinaria celular. Sin embargo, en algunas circunstancias la presencia de SNPs puede aumentar o disminuir la expresión de algunos genes, debido a que uno de los alelos favorece o inhibe la unión de factores de transcripción a regiones específicas del DNA.

Investigaciones previas en el laboratorio de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades, C.M.N S.XXI, IMSS y en otras partes del mundo, han reportado que los polimorfismos rs1800470 y rs3758391 se asocian con cambios en los niveles de expresión de los genes *TGF-β1* y *SIRT1*. Previamente se ha reportado la asociación de estos SNPs con DT2. La presencia del alelo variante T del rs1800470 en *TGF-β1* y el alelo T del rs3758391 en *SIRT1*, generan un aumento de la expresión de estos genes en pacientes con obesidad y DT2¹⁴⁻¹⁶. Sin embargo, hasta la fecha no hay investigaciones que determinen los posibles mecanismos por los cuales la presencia de estos alelos genera el aumento de expresión de *TGF-β1* y *SIRT1*.

Por ello en este trabajo se propuso determinar si la presencia del alelo T de los polimorfismos rs1800470 del gen *TGF-β1* y del rs3758391 del gen *SIRT1*, así como del rs932658 que está en desequilibrio de ligamiento con el rs3758391, se localizan en regiones de unión de proteínas reguladoras de la transcripción. Esta interacción es fundamental en el proceso de la transcripción.

Para lograr el objetivo mencionado se utilizó la línea celular BxPC-3. Un primer paso fue determinar si ambos genes son expresados en esta línea celular. El análisis de expresión de los genes *TGF-β1* y *SIRT1* en células BxPC-3 confirmó su expresión en dichas células, las cuales provienen de una paciente de 61 años con adenocarcinoma⁶⁴.

Fue importante corroborar la expresión de estos genes en las células BxPC-3 puesto que las líneas celulares presentan diferentes genotipos y fenotipos, dependiendo de su origen a pesar de que se ha confirmado que estas proteínas son expresadas en páncreas de donadores. Por otro lado, aunque la PCR de punto final utilizada no es considerada una técnica cuantitativa, si puede ser semicuantitativa, ya que la intensidad de las bandas obtenidas por electroforesis, es proporcional a la cantidad del producto amplificado²⁵. Por lo que, los resultados mostraron que ambos genes se expresan en esta línea celular. Esto coincide con lo reportado en la base de datos “Tissue-specific Gene Expression and Regulation” (TiGER) en relación a la expresión de estos genes en páncreas⁶⁵, así como reportes sobre su participación en diferentes procesos que ocurren en este órgano. Por ejemplo, se ha demostrado que SIRT1 tiene la capacidad de modificar y controlar numerosos factores de transcripción y cofactores, es un regulador positivo para la secreción de la insulina en respuesta a la disponibilidad de nutrientes, provocando una mayor capacidad de absorción y utilización de glucosa por otros tejidos como el hígado, músculo y adipocitos. El incremento de SIRT1 en células β pancreáticas mejora la tolerancia a la glucosa y secreción de insulina mediante la represión transcripcional de la proteína desacoplante 2 (UCP2) encargada de controlar el desacoplamiento metabólico al disminuir el ATP en la

célula⁶⁶. La supresión de *SIRT1* altera la secreción de insulina, generando un desorden metabólico que puede llegar a la resistencia a la insulina⁶⁷. También regula positivamente la transcripción de *PDX1* para el desarrollo del páncreas y formación de células β ⁶⁰. Así pues, la expresión de *SIRT1* en células pancreáticas es fundamental para el buen funcionamiento del páncreas. *SIRT1* también está presente en hígado, músculo esquelético, tejido adiposo y cerebro, donde participa en una amplia gama de funciones relacionadas con el metabolismo, regulación del ciclo celular, apoptosis, entre otras. Debido a esto, se dice que *SIRT1* juega un papel crítico en la regulación de la homeostasis metabólica local y sistémica^{54,55,68,69}.

Por su parte, la expresión de *TGF- β 1* en páncreas no resulta ser tan favorable como lo es *SIRT1*. *TGF- β 1* participa en la proliferación y diferenciación de varios tipos de células. En páncreas la señalización *TGF- β 1/Smads* genera la inhibición de la proliferación de células β . Por lo tanto, si se inhibe esta señalización la proliferación de las células tiende a aumentar descontroladamente. Suzuki T *et al.* (2013) con sus experimentos con una línea de células β pancreáticas de hámster (HITT15) sugieren que la inhibición de la señalización reduce los niveles de p27, una proteína inhibidora de cinasas que bloquea la entrada a la fase S del ciclo celular, y como resultado se promueve la proliferación de células β ⁴¹. Sin embargo, la interrupción de la señalización *TGF- β 1/Smads* puede generar el desarrollo de cáncer^{49,70}.

Debido a los antecedentes antes mencionados sobre *SIRT1* y *TGF- β 1*, se ve la importancia de mantener un equilibrio de su expresión en páncreas y en otros tejidos que participan en la homeostasis metabólica. Una desregulación de su

expresión por la presencia de los rs1800470 y rs3758391 puede tener consecuencias no deseadas que explicarían la asociación de estos SNPs con DT2.

El rs1800470 del gen *TGF-β1* al encontrarse en una región codificante (exón 1) es considerado como un polimorfismo funcional, ya que provoca un cambio de aminoácido de prolina a leucina y por tanto una modificación en la proteína codificada. El hecho de encontrarse en un exón y no en una región reguladora, no descarta la posibilidad de unión de proteínas en esta región como lo demostró el análisis *in silico*, al indicar la posible unión de 4 proteínas, POL2, PAX5C20, TFIIIC110 y ZBTB7A⁶³. Sin embargo, el modelo empleado en el presente trabajo no logró identificar alguna interacción de las proteínas nucleares con esta región del DNA. Hasta el momento no hay investigaciones que confirmen la unión de proteínas nucleares a sitios del DNA que presentan el rs1800470. Pero es posible encontrar algunos estudios que se han dado a la tarea de identificar como se ve afectada la unión de factores de transcripción en presencia de otros SNPs. Tal es el caso de Silverman ES *et al.* (2004) quienes encontraron que la elevada expresión de *TGF-β1* por la presencia del alelo T (alelo variante) del polimorfismo C-509T, asociado a asma, puede deberse a que con este alelo el factor de transcripción YY1 (Yin Yang 1) tiene mayor afinidad de unión al promotor de *TGF-β1*³⁴.

Por su parte, el rs3758391 del gen *SIRT1* se encuentra en una región promotora del gen (a 1.1 KB de *SIRT1*) y provoca modificaciones en la expresión del gen como se ha demostrado en trabajos previos en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica. De acuerdo a su ubicación este SNP tiene probabilidad de unión

de proteínas al DNA, sin embargo el análisis *in silico* no indicó posibilidad de unión a proteínas⁶³. A pesar de esto, otros trabajos como el de Naqvi A. *et al* (2010) han identificado que cerca de *SIRT1* hay una secuencia consenso para p53 en la cual el rs3758391 afecta la unión de p53 *in vitro*. Los resultados de sus EMSAs indicaron que p53 recombinante y p53 de extractos de células HEK293 se unen con menor afinidad al oligonucleótido con el alelo C en comparación con el oligonucleótido que contiene al alelo T⁷¹. Sin embargo, con nuestros experimentos con extractos de proteínas de células BxPC-3 no se logró observar interacción con el alelo ancestral (alelo T) ni con el alelo variante (alelo C). Probablemente la unión que describe Naqvi A. *et al* (2010) sea tejido específica.

Debido a que el análisis *in silico* del rs3758391 no mostró potencial para la unión de proteínas reguladoras de la transcripción, se seleccionó al rs932658 que se encuentra en desequilibrio de ligamiento con rs3758391 (LD=0.99) y que los análisis predictivos reportan como posible sitio de unión proteína-DNA. Este SNP se localiza en una región promotora del gen *SIRT1*, a 209 pb del sitio de inicio de la transcripción. Los análisis predictivos indicaron que existen 23 proteínas (POL2, NFKB, CMYC, CEBPB, E2F6, P300, por mencionar algunas) con capacidad de unión a esta región⁶³. Los resultados de este trabajo no permitieron observar una interacción de proteínas nucleares de las células BxPC-3 a los oligonucleótidos con los alelos ancestral y variante del rs932658.

Diferentes investigaciones han reportado que entre los factores de transcripción encargados de regular la expresión de *SIRT1* se encuentran FOXO1, PPAR α , PPAR β y CREB⁷². Por su parte, *TGF- β 1* está regulado por Sp1, AP1, NF1, entre otros⁴⁹. En este estudio no fue posible confirmar la unión de ninguna de estas

proteínas a las regiones donde se localizan los tres SNPs estudiados. Es posible que esto se debe a una o varios de los siguientes factores.

De acuerdo con estudios GWAS y otras investigaciones a nivel mundial, los rs1800470 y rs3758391 están asociados a DT2. Sin embargo, esto no necesariamente significa que estos SNPs sean los polimorfismos funcionales o causales de dicha enfermedad, ya que el SNP funcional puede estar en desequilibrio de ligamiento con el SNP asociado. Debido al alto número de SNPs que están en desequilibrio de ligamiento con los SNPs estudiados no fue posible evaluar la funcionalidad de ellos. Sin embargo, es importante que en futuros trabajos se determine si alguno de ellos es el polimorfismo funcional para lograr encontrar a los SNPs responsables del aumento de expresión del *SIRT1* y *TGF-β1*, y por consecuencia de la fisiopatología de la enfermedad.

Otra posible explicación sería que en nuestros experimentos las células BxPC-3 empleadas para este trabajo no regulen la expresión de *TGF-β1* y *SIRT1* a través de las regiones donde se localizan los SNPs estudiados, ya que en algunos casos los genes pueden ser regulados a partir de diferentes promotores que pueden ser activos en diferentes condiciones de crecimiento o diferentes tejidos del organismo humano. Por ejemplo, para *TGF-β*, se han descrito cuatro diferentes sitios de inicio de la transcripción en las posiciones +1, +271, +470 y +525, que se utilizan de manera diferencial dependiendo del estado de activación celular⁴⁹. Por lo tanto, es conveniente que se realicen nuevos experimentos obteniendo los extractos nucleares a partir de células de pacientes con obesidad o DT2 como se hizo en los análisis de expresión previos en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica.

De esta manera se comprobaría el hecho que la expresión de proteínas nucleares que regulan expresión de *TGF-β1* y *SIRT1* es tejido específico.

Aunque existe la posibilidad de que las células BxPC-3 no proporcionaron las proteínas nucleares necesarias para regular la expresión de los genes estudiados, también es importante tomar en consideración que la expresión génica se regula en diferentes niveles (pre-transcripcional, transcripcional, splicing, traduccional, post-traduccional) y en alguno de ellos podría llevarse a cabo la regulación de la transcripción dependiendo del genotipo que se observó en trabajos previos en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica.

Durante el nivel pre-transcripcional, en el núcleo de las células la asociación del DNA a proteínas (histonas y proteínas no histónicas) da origen a la cromatina cuya unidad fundamental es el nucleosoma. Éste está constituido por un octámero de histonas alrededor de las cuales se enrollan alrededor de 147pb de DNA. La mayor parte del DNA genómico está ocupado por nucleosomas. Sin embargo, los promotores están parcial o totalmente desprovistos de ellos. Cabe señalar que la secuencia del DNA es un factor determinante para la ubicación de nucleosomas⁷³. Radman-Livaja M. *et al.* (2010) y otros investigadores indican que la periodicidad de dinucleótidos A/T cada 10 pb, facilita la curvatura de la doble hélice y disminuyendo la energía necesaria para acomodarse alrededor del nucleosoma en levaduras y gusanos. Mientras que secuencias con alto contenido de A o T, denominadas poli (dA/dT) forman una doble hélice más rígida y con un surco menor más pequeño, que reduce su capacidad para formar o posicionar nucleosomas⁷⁴⁻⁷⁶. De acuerdo con Kogan SB *et al.* (2006) el posicionamiento de los nucleosomas en humanos depende en gran medida de los dinucleótidos GG y

CC distribuidos periódicamente a 10.4 pb⁷⁷. Por tanto, aquellas regiones libres de nucleosomas se encuentran mayormente disponibles para la unión de proteínas como los factores de transcripción y por consecuencia favorecen la transcripción de ciertos genes. De esta forma, la ubicación del nucleosoma a lo largo de la secuencia del DNA puede considerarse un mecanismo regulador que influye en la expresión génica y otros procesos dependientes de DNA.

Los cambios heredados que influyen en la expresión de ciertos genes sin ser resultado de modificaciones en la secuencia del DNA, también conocido como modificaciones epigenéticas⁷⁸, han sido muy estudiados debido a su importancia en la expresión génica. Dentro de éstos destaca la metilación del DNA. El proceso de metilación implica la incorporación de un grupo metilo al carbono 5 de una citosina que se encuentra presente en un dinucleótido CpG en sentido 5'-3', abundante en regiones promotoras de los genes y denominadas comúnmente como islas CpG⁷⁹. Cada tejido presenta un patrón característico de metilación del DNA en sus células. Los genes que se transcriben activamente en ciertos tejidos poseen islas CpG sin metilar, mientras que en los tejidos donde el gen no se expresa sí están metilados⁸⁰. Esto quiere decir que la metilación desempeña un papel clave en la regulación de la expresión génica. La interrupción de la transcripción de un gen debido a la presencia de los grupos metilo en la molécula de DNA puede explicarse por dos mecanismos. El primero indica que la metilación en las secuencias promotoras impide la unión de ciertos factores de transcripción, y el segundo sugiere que la metilación es reconocida por proteínas de unión a metil-citosinas (MePCs) y proteínas de unión a metilo (MBDs) que junto con corepresores favorecen el reclutamiento de desacetilasas de histonas y por

consecuencia la compactación de la cromatina. De esta manera limitan el acceso de factores de transcripción al promotor^{79,80}.

Estos antecedentes sobre la metilación de DNA podrían explicar el aumento de expresión de *TGF-β1* y *SIRT1* en las investigaciones previas de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, por la presencia del alelo T del rs1800470 y del rs3758391. El alelo ancestral del rs1800470 es una citosina, en secuencia 5'-3' le precede una guanina, es decir forma parte de un dinucleótido CpG. Esto hace que haya una probabilidad de metilación de dicha citosina y que por lo tanto genere una represión o disminución de la expresión de *TGF-β1*, la cual aumentaría en presencia del alelo variante T tal como ocurrió en los análisis de expresión de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica. Esto mismo ocurre para el rs3758391, ya que con el alelo T se observó un aumento de expresión de *SIRT1* y con el alelo C hubo disminución. Algunos estudios indican que la epigenética desempeña un papel clave en la DT2. Ronn T *et al.* (2015) indicaron que estudios genómicos han identificado patrones alterados de metilación del DNA en islotes pancreáticos, músculo esquelético y tejido adiposo de sujetos con DT2 al compararlos con sujetos no diabéticos⁸¹.

Con los resultados obtenidos, el rs1800470 de *TGF-β1* y rs3758391 de *SIRT1* únicamente son considerados como marcadores de susceptibilidad a DT2. Esta investigación no permitió asociarles un efecto funcional a nivel transcripcional (unión de proteínas al DNA) que permita justificar el aumento de expresión del gen y la presencia de la enfermedad. Por otra parte, el rs932658 de *SIRT1* en desequilibrio de ligamiento con el rs375839, no resultó ser un SNP funcional para DT2.

10. CONCLUSIÓN

No se encontró unión de proteínas nucleares de las células BxPC-3 a regiones del DNA que contienen a los rs1800470 del gen *TGF- β 1* y, rs3758391 y rs932658 del gen *SIRT1* en presencia del alelo ancestral ni en presencia del alelo variante, a pesar de que éstos SNPs se han asociado a cambios en la expresión de los genes mencionados.

11. PERSPECTIVAS

- Extraer proteínas nucleares de leucocitos de pacientes con obesidad o DT2 y repetir los EMSAs.
- Evaluar expresión de factores de transcripción involucrados en la regulación transcripcional de *TGF-β1* y *SIRT1*, en leucocitos.
- Cuantificar proteína de TGF-β1 y SIRT1 en plasma de pacientes con obesidad o DT2 para observar la expresión de las proteínas.

12. ANEXOS

ANEXO 1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS NUCLEARES CON EL KIT “NE-PER NUCLEAR AND CITOPASMIC EXTRACTION REAGENTS” (THERMO FISHER SCIENTIFIC).

- PREPARACIÓN DE CULTIVO CELULAR
 1. Para células adherentes, cosechar las células con Tripsina-EDTA.
 2. Centrifugar a 500 xg durante 5 minutos.
 3. Lavar las células resuspendiendo con PBS.
 4. Transferir $1-10 \times 10^6$ células a un tubo eppendorf de 1.5 mL.
 5. Centrifugar a 500 xg por 2-3 minutos.
 6. Aspirar el sobrenadante, dejando el pellet de células lo más seco posible.
 7. Añadir CER I frío al pellet de células usando el volumen de reactivos indicado en la Tabla 1.

Volumen de paquete celular (μL)	CER I (μL)	CER II (μL)	NER (μL)
10	100	5.5	50
20	200	11	100
50	500	27.5	250
100	1000	55	500

Tabla 1. Volumen de reactivos para diferentes volúmenes de paquete celular.

Nota: Para células HeLa, 2×10^6 células es equivalente a 20 μL de volumen de paquete celular.

- EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS CITOPLASMÁTICAS Y NUCLEARES

Escala este protocolo dependiendo del volumen de sedimento de células (Tabla 1). Mantener la relación de volumen de reactivos CER I:CER II:NER a 200: 11: 100 μ L, respectivamente.

1. Vortexear vigorosamente el tubo eppendorf durante 15 segundos para suspender completamente el sedimento celular.
2. Incubar el tubo en hielo durante 10 minutos.
3. Añadir CER II frío.
4. Vortexear el tubo durante 5 segundos.
5. Incubar el tubo en hielo durante 1 minuto.
6. Vortexear el tubo durante 5 segundos.
7. Centrifugar el tubo durante 5 minutos a velocidad máxima en una microcentrífuga ($\sim 16.000 \times g$).
8. Inmediatamente transferir el sobrenadante (extracto citoplásmico) a un tubo pre-enfriado limpio. Colocar este tubo en hielo hasta su uso o almacenamiento (véase el paso 14).
9. Resuspender la fracción insoluble (pellet) producida en el paso 8, que contiene los núcleos, en NER frío.
10. Vortexear durante 15 segundos.
11. Colocar la muestra en hielo y continuar vortexeando durante 15 segundos cada 10 minutos, por un total de 40 minutos.
12. Centrifugar el tubo a la velocidad máxima ($\sim 16.000 \times g$) en una microcentrífuga durante 10 minutos.

13. Transferir inmediatamente el sobrenadante (extracto nuclear) a un tubo pre-enfriado limpio y colocarlo sobre hielo.

14. Almacenar extractos a -80°C hasta su uso.

Nota: Para mantener la integridad y función del extracto de proteínas se recomienda añadir un inhibidor de proteasas a CER I y NER inmediatamente antes de su uso. Se adicionan $10\ \mu\text{L}$ de "Halt Protease Inhibitor Cocktail" (Thermo Scientific) por mL de reactivo para obtener una concentración final de 1X.

ANEXO 2. ENSAYOS DE CAMBIO DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA CON EL KIT “LIGHTSHIFT CHEMILUMINESCENT EMSA” (PIERCE/ THERMO FISHER SCIENTIFIC)

Este kit ha sido optimizado para su uso con geles mini-poliacrilamida (8 × 8 × 0,1 cm). Para geles más grandes, ajustar las condiciones de electroforesis y los volúmenes de reactivo.

A. PLAN DE REACCIONES DE UNIÓN

- Sistema Control de EBNA.

Incluye un set completo de tres reacciones para cada vez que se realiza un EMSA. Estas reacciones y los resultados esperados para el Sistema Control del Antígeno Nuclear de Epstein-Barr (EBNA), que se incluye con el kit, se describen en la Tabla 1.

Reacción	Contenido de reacción	Descripción	Resultado
#1	Control DNA EBNA Biotilinado	No hay extracto proteico para que el DNA se una; por lo tanto, ningún cambio es observado. Establece la posición de una banda de la sonda sin cambio.	
#2	Control DNA EBNA Biotilinado + extracto EBNA	Contiene suficiente proteína diana para efectuar la unión y desplazamiento del DNA EBNA Biotilinado. Cambio detectado por comparación a la posición de la banda en #1.	
#3	Control DNA EBNA Biotilinado + extracto EBNA + 200 veces el exceso molar de DNA EBNA no biotilinado	Demuestra que el desplazamiento de señal observado en #2 puede evitarse por competencia del exceso de DNA no marcado, es decir, los resultados de desplazamiento de la interacción proteína-DNA específica.	

Tabla 1. Descripción de reacciones control y resultados esperados.

Los resultados del Sistema Control EBNA presentados en la Tabla 1 se generaron utilizando reacciones de unión preparadas de acuerdo con la Tabla 2. Cada 20 μ L de reacción de unión contiene 20 fmol de DNA control de biotina-EBNA. Las reacciones se sometieron a electroforesis, se transfirieron y detectaron de acuerdo con los pasos descritos en las secciones B-G de este protocolo. Si el kit se utiliza por primera vez, lleve a cabo las reacciones del Sistema Control EBNA para comprobar que los componentes del kit y el procedimiento general están funcionando correctamente.

Componentes	Concentración Final	Reacciones control		
		#1	#2	#3
Agua DEPC	---	12 μ L	11 μ L	9 μ L
Buffer de unión 10X	1X	2 μ L	2 μ L	2 μ L
Glicerol 50%	2.5%	1 μ L	1 μ L	1 μ L
MgCl ₂ 100 mM	5 mM	1 μ L	1 μ L	1 μ L
Poly (dl-dC) 1 μ g/ μ L	50 ng/ μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L
NP-40 1%	0.05%	1 μ L	1 μ L	1 μ L
DNA EBNA No Biotilnado	4 pmol	---	---	2 μ L
Extracto EBNA	1 Unit	---	1 μ L	1 μ L
DNA EBNA Control Biotilnado	20 fmol	2 μ L	2 μ L	2 μ L
Volumen Total	---	20 μ L	20 μ L	20 μ L

Tabla 2. Reacciones de unión para el Sistema Control EBNA.

- Sistema de Prueba

Utilice la Tabla 3 como una guía para la planificación de las reacciones de unión del sistema de prueba.

Componentes	Concentración Final	Reacciones de Prueba		
		#1	#2	#3
Agua DEPC	---			
Buffer de unión 10X	1X	2µL	2µL	2µL
Poly (dI-dC) 1 µg/µL	50 ng/µL	1µL	1µL	1µL
Glicerol 50%				
NP-40 1%				
DNA No Biotilnado	4 pmol	---	---	
Proteína nuclear de BxPC-3	Sistema dependiente	---		
DNA Biotilnado	20 fmol			
Volumen Total	---	20µL	20µL	20µL

Tabla 3. Reacciones de unión para el Sistema de Prueba

B. PREPARACIÓN Y PRE-CORRIDA DEL GEL

1. Preparar un gel de poliacrilamida nativo en TBE 0.5X o utilizar un gel de retardo de DNA pre-fabricado.
2. Colocar el gel en la unidad de electroforesis, y sujetarla para obtener un sellado.
3. Llenar la cámara interior con TBE 0.5X a una altura de varios milímetros por encima de la parte superior de los pocillos.
4. Llenar el exterior del tanque con TBE 0.5X justo por encima del fondo de los pozos, lo que reduce el calor durante la electroforesis.
5. Enjuagar los pozos.
6. Realizar pre-electroforesis del gel durante 30-60 minutos.
7. Proceder a la Sección C, mientras gel está en pre-electroforesis.

NOTAS:

- El porcentaje de poliacrilamida apropiado depende del tamaño del DNA diana y la proteína de unión. La mayoría de los sistemas utilizan un gel de poliacrilamida al 4% -6 en TBE 0.5X.
- Aplicar 100 V para un gel de $8 \times 8 \times 0,1$ cm.

C. PREPARAR Y REALIZAR REACCIÓN DE UNIÓN

1. Descongelar todos los componentes de la reacción de unión, componentes del Sistema Control EBNA y muestras del Sistema de Prueba, y colocarlos en hielo.
2. Preparar reacciones de unión para el sistema Control de EBNA y/o el Sistema de Prueba de acuerdo con el procedimiento sección A, tablas 2 y 3; añadir los reactivos en el orden que se indica en las tablas. NO agitar los tubos en ningún momento durante este procedimiento.
3. Incubar reacciones de unión a temperatura ambiente durante 20 minutos.
4. Añadir 5 μ L de buffer de carga 5X a cada 20 μ L de reacción de unión, pipeteando arriba y abajo varias veces para mezclar. NO agite ni mezcle vigorosamente.

D. ELECTROFORESIS

1. Desconectar la corriente del gel de electroforesis.
2. Enjuagar los pozos y después cargar 20 μ L de cada muestra en el gel de poliacrilamida.
3. Encender la corriente (ajustado a 100 V para un gel de $8 \times 8 \times 0,1$ cm).

4. Dejar correr hasta que el colorante azul de bromofenol migre aproximadamente 2/3 a 3/4 abajo de la longitud del gel. El dúplex de DNA Control de biotina-EBNA libre migra justo detrás del azul de bromofenol en un gel de poliacrilamida al 6%.

E. TRANSFERENCIA ELECTROFORÉTICA DE REACCIONES DE UNIÓN A LA MEMBRANA DE NYLON

1. Remojar membrana de nylon en TBE 0.5X frío durante al menos 10 minutos.
2. Hacer un sándwich del gel, la membrana de nylon y papel filtro en una unidad de transferencia electroforética limpia según las instrucciones del fabricante.
3. Transferencia a 380mA (~ 100 V) durante 30 minutos.
4. Cuando se complete la transferencia, colocar la membrana con azul de bromofenol hacia arriba sobre una toalla de papel seca (no debe haber residuos de colorante en el gel).
5. No deje que la membrana seca. Inmediatamente proceder a la sección F.

F. CROSSLINK TRANSFERIDO ADN A LA MEMBRANA

Hay tres opciones disponibles para la crosslinking:

- Opción 1: Crosslink a $120\text{mJ}/\text{cm}^2$ usando un instrumento comercial de luz UV crosslink equipado con bombillas de 254 nm (45-60 segundos de exposición utilizando la función de autocrosslink).
- Opción 2: Crosslink a una distancia de aproximadamente 0.5 cm de la membrana durante 5-10 minutos con una lámpara UV portátil equipada con bombillas de 254 nm.

- Opción 3: Crosslink durante 10-15 minutos con la membrana boca abajo en un transiluminador equipado con bombillas de 312 nm.

Después de que la membrana está crosslinked, pase directamente a la Sección G. Alternativamente, la membrana puede ser almacenada en seco a temperatura ambiente durante varios días. No permita que la membrana se moje de nuevo hasta que esté listo para proceder con la sección G.

G. DETECCIÓN DE DNA MARCADO CON BIOTINA POR QUIMIOLUMINISCENCIA

1. Calentar suavemente el buffer de bloqueo y el buffer de lavado 4X a 37-50°C en un baño de agua hasta que se disuelva todo. Estos buffers pueden ser usados entre temperatura ambiente y 50°C, siempre y cuando todas las partículas permanece en solución. El Buffer Equilibrador se puede utilizar entre 4°C y temperatura ambiente.
2. Para bloquear la membrana añadir 20 mL de buffer de bloqueo e incubar durante 15 minutos con agitación suave.
3. Preparar la solución conjugado/buffer de bloqueo mediante la adición de 66.7µL de conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante estabilizada a 20 mL de buffer de bloqueo (dilución 1: 300).

Nota: Esta solución conjugado/buffer de bloqueo ha sido optimizada para el módulo de detección de ácido nucleico y no debe ser modificado.
4. Decantar el buffer de bloqueo de la membrana y sustituirlo por la solución de conjugado/buffer de bloqueo. Incubar la membrana en ésta durante 15 minutos con agitación suave.

5. Preparar la solución de lavado 1X mediante la adición de 40 mL de buffer de lavado 4X a 120 mL de agua ultrapura.
6. Transferir la membrana a un nuevo contenedor y enjuagarlo brevemente con 20 mL de solución de lavado 1X.
7. Lavar la membrana cuatro veces durante 5 minutos cada uno en 20 mL de solución de lavado 1X con agitación suave.
8. Transferir la membrana a un nuevo recipiente y añadir 30 mL de buffer equilibrador. Incubar la membrana durante 5 minutos con agitación suave.
9. Preparar la solución de sustrato de trabajo mediante la adición de 6 mL de Solución Luminol/Potenciador a 6 mL de Solución de Peróxido Estable.
10. Quitar la membrana del buffer equilibrador, secando cuidadosamente un borde de la membrana sobre una toalla de papel para eliminar el exceso de buffer. Colocar la membrana en un recipiente limpio o sobre una hoja de plástico colocada sobre una superficie plana.
11. Verter la solución de trabajo sobre la membrana de modo que cubra completamente la superficie. Alternativamente, la membrana puede ser colocada DNA hacia abajo sobre un charco de la solución de trabajo. Incubar la membrana en la solución de trabajo durante 5 minutos sin agitación.
12. Quitar la membrana de la solución de trabajo y secar un borde de la membrana sobre una toalla de papel durante 2-5 segundos para eliminar el exceso de buffer. No permita que la membrana se seque.

13. Envolver la membrana húmeda en una envoltura de plástico, evitando burbujas y arrugas.
14. Exponer la membrana a una cámara CCD equipada de manera apropiada, o colocar la membrana en un casete de película y exponer a película de rayos X durante 2-5 minutos. Desarrollar la película de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El tiempo de exposición se puede ajustar para obtener la señal deseada.

13. REFERENCIAS

1. American Diabetes Association. Diagnosis and clasification of diabetes mellitus. Diabetes Care. 2010; 33: S62-S69
2. International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas-7th edition [Sede Web]. Fundación para la Diabetes; 2015 [actualizada el 30 Agosto de 2016; acceso 11 de Septiembre de 2016]. Disponible en: <http://www.fundaciondiabetes.org/general/material/95/avance-nuevo-atlas-de-la-diabetes-de-la-fid-7-edicion--actualizacion-de-2015>
3. Ramírez J, Vargas G, Tovilla C, Fragosa JM. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. Gaceta Médica de México. 2013; 149: 220-8.
4. McCormack SE, Grant SF. Allelic expression imbalance: tipping the scales to elucidate the funtion of type 2 diabetes-associated loci. Diabetes. 2015; 64: 1102-4.
5. Oliva R, Ballesta F, Oriola J, Clária J. Genética médica. Madrid: Díaz de Santos Ediciones, 2008: 234.
6. Gálvez FJ, Sandoval AS, Armendáriz J. El factor de crecimiento transformante β como blanco terapéutico. Salud Pública Mex. 2004; 46: 341-50.
7. Hathaway CK, Gasim AM, Grant R, Chang AS, Kim HS, Madden VJ, et al. Low TGF β 1 espression prevents and high expression exacerbates diabetic nephropathy in mice. Proc Natl Acad Sci.2015; 112 (18): 5815-20.

8. Mou X, Liu Y, Zhou D, Hu Y, Ma G, Shou C, et al. Different risk indicators of diabetic nephropathy in transforming growth factor-beta1 T869C CC/CT genotype and TT genotype. *Iran J Public Health*. 2016; 45 (6): 761-7.
9. Jia H, Yu L, Gao B, Ji Q. Association between the T869C polymorphism of transforming growth factor-beta 1 and diabetic nephropathy: a meta-analysis. *Endocrine*. 2011; 40: 372-8.
10. Raina P, Sikka R, Kaur R, Sokhi J, Matharoo K, Singh V, et al. Association of transforming growth factor beta-1 (TGF- β 1) genetic variation with type 2 diabetes and end stage renal disease in two large population samples from north india. *Journal of Integrative Biology*. 2015; 19 (5): 306-17.
11. Zhou TB, Jiang ZP, Qin YH, Drummen G. Association of transforming growth factor- β 1 T869C polymorphism with diabetic nephropathy risk. *Nephrology*. 2014; 19: 107-15.
12. Valladares A, Martínez JA, Rosas M, García J, Utrera D, Gómez R, et al. Association of polymorphisms within the transforming growth factor- β 1 gene with diabetic nephropathy and serum cholesterol and triglyceride concentrations. *Nephrology*. 2010; 15: 644-8.
13. Luu L, Dai FF, Prentice KL, Huang X, Hardy AB, Hansen JB, et al. The loss of sirt1 in mouse pancreatic beta cells impairs insulin secretion by disrupting glucose sensing. *Diabetologia*. 2013; 56: 2010-20.
14. Soon M. Efecto de los parámetros bioquímicos y genómicos sobre la expresión de *TGF- β 1*, *IGF2BP2* y *VEGFA*, en una población infantil

- mexicana [Tesis]. México, D.F: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 2015.
15. Morales VJ. Expresión genética de *SIRT1*, *CAPN10* y *VEGFA* en una población infantil de la ciudad de México [Tesis]. México, D.F: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 2016.
 16. Ramírez A. Efecto de los rs3758391 y rs1800470 asociados a DT2 sobre la expresión de los genes *SIRT1* y *TGF-β1* en una población adulta [Tesis]. México, D.F: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 2017.
 17. Hu Y, Wang L, Chen S, Liu X, Li H, Lu X, et al. Association between the *SIRT1* mRNA expression and acute coronary síndrome. *J Atheroscler Thromb.* 2015; 22: 165-82.
 18. American Diabetes Association. Diagnosis and clasification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2016; 39: S13.
 19. American Diabetes Association. Lo básico sobre la diabetes tipo 2 [Sede Web]. ADA; 1995 [actualizada el 30 Agosto de 2016; acceso 3 de Septiembre de 2016]. Disponible en: <http://www.diabetes.org/es/informacion-basica-de-la-diabetes/diabetes-tipo-2/lo-basico-sobre-la-diabetes-tipo2.html>
 20. American Diabetes Association. Diabetes tipo 2 [Sede Web]. ADA; 1995 [actualizada el 30 Agosto de 2016; acceso 11 de Septiembre de 2016].

Disponible en: <http://www.diabetes.org/es/informacion-basica-de-la-diabetes/diabetes-tipo-2/?loc=db-es-slabnav>

21. Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016: Informe final de resultados. Ciudad de México: Secretaría de Salud, 2016; 46.
22. Kahn CR, Weir GC, King GL, Jacobson AM, Moses AC, Smith RJ. Jolin's diabetes mellitus. 14ª ed. Barcelona: Wolters Kluwer, 2006; 22, 23, 372
23. Albarrán AJ. Endocrinología. 2ª ed. Madrid: Médica Panamericana, 2010; 647,648, 638.
24. Gomis R, Rovira A, Felú JE, Oyarzábal M. Tratado SED de diabetes mellitus. Madrid: Médica Panamericana, 2007; 115-7.
25. Salazar AM, Sandoval AS, Armendáriz JS. Biología molecular: fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. México: McGraw Hill, 2013: 44-51, 54-63, 66-70.
26. American Diabetes Association. El diagnóstico de la diabetes e información sobre la prediabetes [Sede Web]. ADA; 1995 [actualizada el 20 Marzo de 2015; acceso 18 de Septiembre de 2016]. Disponible en: <http://www.diabetes.org/es/informacion-basica-de-la-diabetes/diagnostico.html?loc=db-es-slabnav>
27. Espinosa F. Guía ADA 2016: resumen clasificación y diagnóstico de la diabetes [monografía en internet]. Wordpress.com; 2016 [acceso 19 de Septiembre de 2016]. Disponible en: <https://sinapsismex.files.wordpress.com/2016/04/resumen-de-las-quicc81as-ada-2016.pdf>

28. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. Introducción a la biología celular. 3ª ed. México, D.F: Médica Panamericana, 2011: 233-43, 245, 253-6, 273, 274.
29. Pierce BA. Fundamentos de genética: conceptos y relaciones. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2011: 248-52, 374.
30. Bornacelli A, Caraballo L. Hallazgos recientes sobre la estructura y función del gen. Rev. Médica. Sanitas. 2010; 13 (2): 36-45.
31. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, et al. Biología celular y molecular. 7ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2016; 124-6, 131.
32. Si J, Zhao R, Wu R. An overview of the prediction of protein DNA-binding sites. Int J Mol Sci. 2015; 16: 5195-215.
33. D'haeseleer P. What are DNA sequence motifs?. Nature. 2006; 24 (4): 423-5.
34. Siverman ES, Palmer LJ, Subramaniam V, et al. Transforming growth factor- β 1 promoter polymorphism C-509T is associated with asthma. Am J Respir Crit Care Med. 2004; 196: 214-9.
35. McGraw Hill Education. Meiosis with crossing over [video]. McGraw Hill Education.
36. Scaglione R, Argano C, Duro G, Di Chiara T, Nuzzo D, Colomba D, et al. The relationship between the transforming growth factor β 1 T29C gene polymorphhism and left ventricular geometry and function in hypertensive subjects. Int J Hypertens. 2010: 1-7.

37. Rane SG, Lee JH, Lin HM. Transforming growth factor- β pathway: role in pancreas development and pancreatic disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006; 17: 107-19.
38. Lin HM, Lee JH, Yadav H, Kamaraju AK, Liu E, Zhigang D, et al. Transforming growth factor- β /Smad3 signaling regulates insulin gene transcription and pancreatic islet β -cell function. *J Biol Chem.* 2009; 284 (18): 12246-57.
39. Truty MJ, Urrutia R. Basics of TGF- β and pancreatic cancer. *Pancreatology.* 2007; 7: 423-35.
40. Jacobs EJ, Newton CC, Silverman DT, Nogueira LM, Albanes D, Mannisto, et al. Serum transforming growth factor- β 1 and risk of pancreatic cancer in three prospective cohort studies. *Cancer Causes Control.* 2014; 25: 1083-91.
41. Suzuki T, Dai P, Hatakeyama T, Harada Y, Tanaka H, Yoshimura N, et al. TGF- β signaling regulates pancreatic β -cell proliferation through control of cell cycle regulator p27 expression. *J Histochem Cytochem.* 2013; 46 (2): 51-8.
42. Parvizi S, Mohammadzadeh G, Karimi M, Noorbehbahani M, Jafary A. Effects of two common promoter polymorphisms of transforming growth factor- β 1 on breast cancer risks in ahvaz, west south of iran. *Iran J Cancer Prev.* 2016; 9 (1): 1-6.
43. Dragicevic S, Petrivic N, Nikolic A. TGFB1 gene promoter polymorphisms in serbian asthmatics. *Adv Clin Exp Med.* 2016; 25 (2): 273-8.

44. Wang HB, Song WG, Liu HQ, Fang F, Xiao Y. Role of TGFB1 polymorphism in the development of metastatic brain tumors in non small cell lung cancer patients. *Genet Mol Res.* 2015; 14 (2): 3545-50.
45. Cruz M, Fragoso JM, Alvarez E, Escobedo J, Valladares A, Juárez T. et al. The TGF- β 1 and IL-10 gene polymorphisms are associated with risk of developing silent myocardial ischemia in the diabetic patients. *Immunology Letters.* 2013; 156: 18-22.
46. El-Sherbini SM, Shahen SM, Mosaad YM, Abdelgawad MS, Talaat RM. Gene polymorphism of transforming growth factor- β 1 in Egyptian patients with type 2 diabetes and diabetic nephropathy. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2013; 45: 330-8.
47. National Library of Medicine, National Central for Biotechnology Information. SNP [Sede Web]. Bethesda MD: National Library of Medicine. [acceso 01 de Abril de 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
48. Yang J, Kan M, Wu GY. Berberin ameliorates diabetic nephropathy in rats via suppressing renal inflammation and TGF- β 1-Smad pathway. *Immunopharm Immunot.* 2016; 38 (2): 145-52.
49. Peralta O, Lagunas A, Madrid V. Factor de crecimiento transformante beta-1: estructura, función y mecanismos de regulación en cáncer. *Rev. Salud Pública.* 2011; 43 (4): 340-51.
50. Santos L. Sirtuinas, enzimas moduladoras del metabolismo energético [Tesina]. Montevideo: Universidad de la República, Facultad de Ciencias: 2011; 21, 22.

51. Kitada M, Koya D. SIRT1 in type 2 diabetes: mechanisms and therapeutic potential. *Diabetes Metab J*. 2013; 37: 315-25.
52. Pinho AV, Bensellam M, Wauters E, Rees M, Laterriere MG, Mawson A, et al. Pancreas-specific sirt1-deficiency in mice compromises beta-cell function without development of hyperglycemia. *PLoS ONE*. 2015; 10 (6): 1-13.
53. Bordone L, Motta MC, Picard F, Robinson A, Jhala US, Apfeld J, et al. Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic β cells. *PLoS Biol*. 2006; 4 (2): 210-20.
54. Wang RH, Kim HS, Xiao C, Xu X, Gavrilova O, Deng CH. Hepatic Sirt1 deficiency in mice impairs mTorc2/Akt signaling and results in hyperglycemia, oxidative damage, and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2011; 121 (11): 4477-90.
55. Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark A, Senawong T, Leid M et al. Sirt1 promotes fat mobilization in White adipocytes by repressing PPAR- γ . *Nature*. 2004; 426 (6993): 1-14.
56. Cruz M, Valladares A, García J, Ross K, Edwards M, Angeles J, et al. Candidate gene association study conditioning on individual ancestry in patients with type 2 diabetes and metabolic síndrome from Mexico city. *Diabetes Metab Res Rev*. 2010; 26: 261-70.
57. Li FH, Yu HT, Xiao L, Liu YY. Response of BAX, Bcl-2 proteins, and SIRT1/PGC-1 α mRNA expression to 8-week treadmill running in the aging rat skeletal muscle. 2016: 283-9.

58. Kumar R, Nigam L, Pratap AM, Singh K, Subbarao N, Dey S. Design, shynthesis of allosteric peptide activator for human SIRT1 and its biological evaluation in celular model of alzheimer's disease. *Eur J Med Chem.* 2017; 127: 909-16.
59. Mohtavinejad N, Nakhaee A, Harati H, Poodineh J, Afzali M. SIRT1 gene is associated with cardiovascular disease in the iranian population. *Egyptian Journal Medical Human Gnetics.* 2015; 16: 117-22.
60. Wang RH, Xu X, Kim HS, Xiao Z, Deng CX. SIRT1 deacetylates FOXA2 and is critical for Pdx1 transcription and β -cell formation. *Int J Biol Sci.* 2013; 9 (9): 934-46.
61. Han Q, Zhang Y, Li W, Fan H, Xing Q, Pang S, et al. Funtional sequence variants within the SIRT1 gene promoter in indirect inguinal hernia. *Gene.* 2014; 546 (1): 1-5.
62. Zhang A, Wang H, Qin X, Pang S, Yan B. Genetic analysis of SIRT1 gene promoter in sporadic parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 422 (4): 693-6
63. Broad Institute. HaploReg v4.1 [Sede Web]. [acceso 03 de Septiembre de 2016].Disponible en:
<http://archive.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>
64. Deer EL, González J, Coursen JD, Shea JE, Ngatia J, Scaife CL, et al. Phenotype and genotype of pancreatic cáncer cell lines. *Pancreas.* 2010; 39 (4): 425-35.

65. Johns Hopkins University. Tissue-specific Gene Expression and Regulation (TiGER) [Sede Web]. Wilmer Institute, Johns Hopkins University; [acceso 02 de Mayo de 2017]. Disponible en: <http://bioinfo.wilmer.jhu.edu/tiger/>
66. Li X. SIRT1 and energy metabolism. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2013; 45: 52-60.
67. Cao Y, Jiang X, Ma H, Wang Y, Xue P, Liu Y. SIRT1 and insulin resistance. *J Diabet Complications.* 2016; 30: 178-83.
68. Yamaguchi S, Yoshino J. Adipose tissue NAD⁺ biology in obesity and insulin resistance: from mechanism to therapy. *Bioessays.* 2017; 39 (5): 1-9.
69. Abdesselem H, Madani A, Hani A, Al-Noubi M, Goswami N, Billing AM, et al. SIRT1 limits adipocyte hyperplasia through c-myc inhibition. *J Biol Chem.* 2016; 291 (5): 2119-35.
70. Blobel GA, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor β in human disease. *N Engl J Med.* 2000; 342 (18): 1350-8.
71. Naqvi A, Hoffman TA, DeRicco J, Kumar A, Kim CS, Jung SB, et al. A single-nucleotide variation in a p53-binding site affects nutrient-sensitive human SIRT1 expression. *Hum Mol Genet.* 2010; 19 (21): 4123-33.
72. Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012; 13 (4): 225-38.
73. Díaz O. Topología del DNA nucleosomal en centrómeros y promotores génicos de *Saccharomyces cerevisiae* [Tesis Doctoral]. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona, Depto. De Bioquímica y Biología Molecular: 2014; 13-19.

74. Radman-Liviaja M, Rando OJ. Nucleosome positioning: how is it established, and why does it matter? *Dev Biol.* 2010; 339 (2): 258-66.
75. Soriano I. Organización de los nucleosomas y regulación del genoma en el género *Schizosaccharomyces* [Tesis Doctoral]. Salamanca: Universidad de Salamanca, Depto. De Microbiología y Genética. 2013; 9-13.
76. Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R. *Biología molecular del gen.* 5ª ed. Madrid: Médica Panamericana. 2008: 181-3.
77. Kogan SB, Kato M, Kiyama R, Trifonov EN. Sequence structure of human nucleosome DNA. *J Biomol Struct Dyn.* 2006; 24 (1): 43-8.
78. Passarge E. *Genética: texto y atlas.* 3ª ed. Madrid: Médica Panamericana, 2010: 228.
79. Rencillas F, Escamilla M. Participación de la estructura de la cromatina en la regulación de la expresión génica. *Mensaje Bioquímico*, Depto Bioquímica, Fac Medicina, UNAM. 2004; 28: 173-201.
80. Luque J, Herráez A. *Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética.* Madrid: Ediciones Harcourt, 2001: 272, 273.
81. Ronn T, Ling C. DNA methylation as a diagnostic and therapeutic target in the battle against type 2 diabetes. *Epigenomics.* 2015; 7 (3): 451-60.