



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**“DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA ALÉLICA DE LA VARIANTE
POLIMÓRFICA rs1800961 EN EL GEN *HNF4A* EN PACIENTES CON
DIABETES MELLITUS TIPO 2”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD CON
ESPECIALIDAD EN BIOLOGÍA MOLECULAR

PRESENTA:

BIOL. MARGARITA NORA GONZÁLEZ RUIZ

DIRECTORES DE TESIS:

DR. SALVADOR M. POLO SOTO

DRA. NORMA E. HERRERA GONZÁLEZ

MEXICO, D.F.
DICIEMBRE 2010

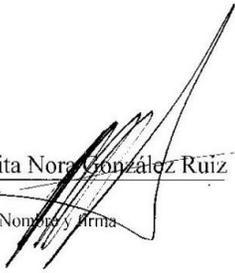


INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 13 del mes diciembre del año 2010, la que suscribe Margarita Nora González Ruiz alumna del Programa de Maestría en Ciencias de la Salud con número de registro B081105, adscrito a Escuela Superior de Medicina, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Norma Estela Herrera González y M. en C. Salvador Martín Polo Soto y cede los derechos del trabajo intitulado “Determinación de la Frecuencia Alélica de la Variable Polimórfica rs1800961 en el Gen HF4 α en Pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección norag18@hotmail.com . Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Margarita Nora González Ruiz

Nombre y firma

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO: EN EL LABORATORIO MULTIDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN, DE LA ESCUELA MILITAR DE GRADUADOS DE SANIDAD DE LA UNIVERSIDAD DEL EJÉRCITO Y FUERZA AÉREA EN COLABORACIÓN CON LA ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA DEL IPN, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. M. EN C. SALVADOR M. POLO SOTO Y LA DRA. EN C. NORMA E. HERRERA GONZÁLEZ.

AGRADECIMIENTOS

A la Sección de posgrado de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

A la Escuela Militar de Graduados de Sanidad de la Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo de investigación y por el amplio apoyo recibido por sus directivos para llevar a buen término la conclusión de mis estudios.

A Mis directores de Tesis

Dr. Salvador M. Polo Soto, por las llamadas de atención, por el gran entusiasmo que muestra por la ciencia, por su asesoría en la dirección y realización de este trabajo y por colaborar en el desarrollo personal de cada uno de sus discípulos.

A la Dra. Norma E. Herrera González, por su confianza, por la disponibilidad al diálogo, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por sus sabios consejos y atinados comentarios, por brindarme su amistad y por su gran apoyo en tiempos difíciles, Gracias.

A los miembros de mi comité tutorial, por el voto de confianza.

Dr Angel Miliar, García, por sus comentarios y consejos

Dra. Gisela Gutiérrez Lopez, por su comprensión, y apoyo

Dra. Nora E Martínez Aguilar, por sus aportaciones, paciencia y el tiempo que me otorgo para culminar este trabajo

A mi familia mi incondicional soporte y mi razón de ser, por la alegría de tenerlos.

A Todos aquellos que me ayudaron en la realización de este proyecto y contribuyeron a mi formación profesional. Gracias.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
I.-INTRODUCCIÓN.....	1
I.1.Definición de Diabetes Mellitus.....	1
I.2.Clasificación de la DM.....	1
I.3 Diabetes mellitus tipo 2(DM2).....	3
I.4. Epidemiología y mapa de distribución de Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) en México	4
I.5.Diagnóstico y principales complicaciones de la DM2.....	6
I.6 Patogenia molecular de la Diabetes mellitus 2.....	7
I.7.Gen del Factor Hepatocítico Nuclear 4A (<i>HNF4A</i>)	18
I.8.Estructura del gen humano (<i>HNF4A</i>).....	19
I.9.Estructura y función de la proteína del Factor Hepatocítico Nuclear 4 α (<i>HNF4α</i>).....	20
1.10.-Vías de Señalización de HNF4- α y su implicación en DM2.....	26
II.-ANTECEDENTES.....	28
II.1.- Polimorfismos (SNP´s) del gen <i>HNF4A</i> asociados a riesgo de desarrollar Diabetes mellitus tipo 2 en diferentes poblaciones.....	28
II.2.-Frecuencia de aparición del SNP rs1800961 C>T de <i>HNF4A</i> en poblaciones no diabéticas a nivel mundial (HapMap).....	35
II.3.-Frecuencia del SNP rs1800961 C>T de <i>HNFA</i> asociado a DM2 en diferentes Poblaciones.....	37

III.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	44
IV.-JUSTIFICACIÓN.....	45
V.- HIPÓTESIS.....	46
VI.-OBJETIVO GENERAL.....	46
VI.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	46
VII.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	47
VIII.-RESULTADOS.....	57
IX.-DISCUSIÓN.....	73
X.-CONCLUSIONES.....	83
XI.-BIBLIOGRAFÍA.....	85
XII.-ANEXOS.....	98
Anexo 1:Carta de consentimiento informado.....	98
Anexo 2: Cuestionario.....	101
Anexo 3: Secuencia completa del gen <i>HNF4A</i>	102

RELACIÓN DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Incidencia de la Diabetes Mellitus en la Republica Mexicana (2009).....	5
Figura 2. Vías de señalización que conducen al desarrollo de diabetes tipo 2 (DM2)...	10
Figura 3. Vías de estimulación de la secreción de insulina en una célula β normal.....	13
Figura 4. Relación entre los genes blanco de HNF4 α y las enfermedades humanas...	19
Figura 5. Mapa esquemático del gen <i>HNF4A</i> sobre el cromosoma 20.....	20
Figura 6. Proteína HNF4 α , mostrando los aminoácidos que conforman cada uno de sus motivos.....	22
Figura 7. HNF4 α con los 6 Dominios que la constituyen.....	23
Figura 8. Vías de acción de HNF4 α y su implicación en Diabetes Mellitus tipo 2.....	27
Figura 9. Condiciones de temperatura del programa de amplificación.....	52
Figura 10. Condiciones de temperatura del protocolo descrito por Invitrogen, para activar la enzima Exosap I.....	53
Figura 11. Condiciones de temperatura del protocolo para la reacción de secuencia.....	54
Figura 12. Mapa de distribución de los pacientes con DM2, captados en el estudio....	57
Figura 13. Procedencia por estado de la república de los individuos con DM2 (casos).....	57
Figura 14. Mapa de distribución de los individuos no diabéticos, captados en el estudio.....	58

RELACIÓN DE FIGURAS

	Pág.
Figura 15. Procedencia por estado de la república de los individuos no diabéticos (controles).....	58
Figura 16. Distribución de los individuos por género en ambos grupos.....	59
Figura .17 Diferencias de Edad, (a), IMC (b) y Niveles de glucosa (c) entre casos y controles.....	61
Figura 18. Promedios de Edad (a), Índices de masa corporal (b) y Niveles de glucosa (c), totales y por género para casos y controles.....	62
Figura 19. DNA genómico de muestras provenientes de individuos control.....	63
Figura 20. DNA genómico de muestras provenientes del de pacientes diabéticos.....	63
Figura 21. PCR de amplificación del exón 4 de <i>HNF4A</i> proveniente de algunas de las muestras de pacientes diabéticos.....	64
Figura22. Electroferograma del exón 4 del gen <i>HNF4A</i>	65
Figura.23 Distribución de las frecuencias Genotípicas del polimorfismo rs1800961 (Treo139Iso).....	67

RELACIÓN DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Otros tipos de diabetes mellitus.....	3
Tabla 2.- Factores de riesgo para desarrollar diabetes mellitus.....	7
Tabla 3. Principales genes en los que se ha encontrado asociación con DM2.....	16
Tabla 4. Isoformas de HNF4 α	21
Tabla 5. Distribución de la frecuencia genotípica de la variante rs18000961 reportada en el Hapmap.....	36
Tabla 6. Tamaño del amplicón generado y región de DNA donde alinean los oligos que amplifican el exón 4 del gen <i>HNF4A</i>	50
Tabla 7. Mezcla de reacción para la PCR de amplificación (Exón 4 del gen <i>HNF4α</i>).51	
Tabla 8. Protocolo de purificación de fragmentos empleando la enzima Exosap I.....	53
Tabla 9 Protocolo de PCR de secuencia.....	53
Tabla 10.- Características clínicas y antropométricas entre los pacientes con Diabetes mellitus 2 (casos) y los individuos no diabéticos (control).....	59
Tabla 11.- Características clínicas y antropométricas de los pacientes con DM2 (casos) y los individuos no diabéticos (controles) por género.....	60
Tabla 12. Distribución del genotipo por género entre los pacientes diabéticos (casos) y sujetos no diabéticos (controles).....	66
Tabla 13. Comparación de la Frecuencia genotípica y alélica de la variante rs1800961 entre la población de diabéticos (casos) y la población sana (controles).....	66
Tabla 14. Determinación del equilibrio de Hardy-Weinberg por grupo. No diabéticos (grupo control) y diabéticos (casos).....	68

RELACIÓN DE TABLAS

	Pág.
Tabla 15. Estimación del grado de asociación entre las frecuencias genotípicas y alélicas de la variante rs1800961 del gen <i>HNF4A</i>	69
Tabla 16. Comparación de los valores de cada una de las variables, en los portadores (C/T) y no portadores (C/C) de la variante rs1800961.....	70
Tabla 17. Estimación del grado de asociación entre los portadores (C/T) y no portadores (C/C) de la variante rs1800961, en los grupos estudiados.....	71

ABREVIATURAS

DBD.- Dominio de unión a DNA

CBP.-Proteína de unión a CREB

CREBP.- Proteína de unión a elementos de respuesta cAMP

GK.- Glucocinasa

IR.- Receptor de la Insulina

PDK.- Cinasa dependiente de PIP3

FOXO 1.- Otra proteína 1 de caja "Fork head"

PDX1.-Homeocaja 1 del Duodeno pancreático

ER.-Receptor de estrógenos

IRS1.- Sustrato receptor de Insulina 1

PPAR γ .- Receptor activador de la proliferación de peroxisomas gamma

NEUROD1.- Diferenciación Neurogénica1

TBE.-Tris-Borate-EDTA

5'UTR.-Región 5' no traducida

3'UTR.- Región 3' no traducida

ApoA.- Apolipoproteína A

DM2.- **Diabetes mellitus tipo 2**

ApoB: Apolipoproteína B

PDX-1: *Pancreas duodenum homeobox-1*

PK.- Piruvato Kinasa

SREBP.- Proteína de unión al elemento regulador de esteroides

HNF-1a.-Factor Hepatocítico Nuclear 1-alfa

XnLFB1/HNF-1 hepatocyte nuclear factor 1 alpha

MAF=Frecuencia del alelo menor

RESUMEN

La Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una enfermedad de origen multifactorial caracterizada por aumento en los niveles de glucosa en sangre y disminución y/o resistencia a la acción de la insulina. Uno de los factores que determinan la aparición de diabetes es la presencia de polimorfismos de una sola base en genes como, el Factor Hepatocítico nuclear 4 alfa (*HNF4A*) cuya variante rs18000961 (417 C >T del exón 4), produce una mutación sin sentido del aa Tre 139 Iso ubicado en la región de la bisagra del Dominio de unión a DNA, que ha sido reportada previamente en población mexicana con alta asociación al riesgo de desarrollar DM2. En este estudio se determinó la frecuencia de aparición del polimorfismo en un grupo de individuos mexicanos con DM2 (casos) provenientes de la Unidad de especialidades médicas y del Hospital Central Militar, y un grupo de individuos no diabéticos población abierta (controles); con el fin de evaluar la asociación entre la presencia del polimorfismo y el desarrollo de la enfermedad en estas poblaciones. Se realizó un análisis por medio de pruebas estadísticas en relación a las variables Edad, Sexo, Glucosa, e Índice de masa corporal (IMC) y la presencia o ausencia de los alelos de riesgo del polimorfismo en ambos grupos. Nuestros resultados estadísticos registraron diferencias significativas en los parámetros estudiados (Edad, IMC, y Glucosa) entre ambos grupos, observándose edades mayores en individuos diabéticos en relación a los individuos no diabéticos, así como niveles de glucosa elevados por arriba de 130 mg/dl en los pacientes con DM2 aún estando los pacientes bajo farmacoterapia, lo que habla de un mal control de la glucosa en los individuos de este grupo. Según la OR estimada (OR= 2.05 con un CI del 95% [0.50-8.41] y una $p=0.3090$), no se observó asociación entre la frecuencia de aparición del alelo de riesgo de la variante rs1800961 y el desarrollo de diabetes, ni se presentó asociación alguna entre la frecuencia del alelo de riesgo de la variante rs1800961 C>T y los niveles de glucosa, IMC, edad o sexo en ninguno de los grupos estudiados. Nuestros resultados estadísticos no apoyan la posibilidad de que la variante rs1800961 de *HNF4A* contribuya a la susceptibilidad a desarrollar DM2 en las poblaciones estudiadas, sin embargo se sugiere realizar un estudio donde se incremente el número de casos y controles para aumentar el poder estadístico de estas resoluciones.

ABSTRACT

Diabetes mellitus type 2 (DM2) is a multifactorial disease characterized by increased levels of glucose in blood and decrease or resistance to insulin action. One of the factors that determine the onset of diabetes is the presence of a single nucleotide polymorphisms in genes, such as the Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha (*HNF4A*), whose variant rs18000961 (417 C> T in exon 4), produces a missense mutation Thr139Iso, located in the hinge region of DNA-binding domain; which has been previously reported in Mexican population high association with the risk of developing DM2. In this study we determined the frequency of polymorphism in a group of Mexican subjects with type 2 diabetes patients (cases) from the Unit of Medical Specialties and the Hospital Central Militar (from La Secretaria de la Defensa Nacional) and a group of non-diabetic population (control) in order to evaluate the association between the polymorphism and development of the disease in these populations. An analysis using statistical evidence regarding the variables age, sex, glucose, body mass index (BMI) and the presence or absence of risk alleles of the polymorphism in both groups. Our statistical results give significant differences in clinical variables (age, BMI, and glucose) between both groups, older age was observed in diabetic relative to non-diabetic subjects, and elevated glucose levels above 130 mg / dl in patients with DM2 even when patients on drug therapy, which speaks of poor glucose control in individuals of this group. According to the Odds Ratio estimate (OR = 2.05 with 95% CI (0.50-8.41) and $p = 0.3090$), no association was founded between the frequency of risk allele of the rs1800961 variant and the development of diabetes, nor had any association between the risk allele of the variant rs1800961 and levels of glucose, BMI, age or sex in either studied groups. Our statistical results do not support the possibility that the *HNF4A* rs1800961 variant contributes to susceptibility to develop type 2 diabetes in the populations studied; but we suggest more studies increasing the number of cases and controls in order to increase the statistical power of these resolutions.

I.-INTRODUCCIÓN

I.1 –Definición de Diabetes Mellitus

La Diabetes mellitus (DM) (del griego “*diabainein*”= *atravesar*, “*mellitus*”=*miel* etimológicamente significa: “dulzura o miel que pasa a través”) es un síndrome, o conjunto de síndromes, crónico degenerativos que se manifiestan por una alteración en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas; se caracteriza por niveles elevados de glucosa, un grado variable de resistencia a la Insulina y/o una deficiencia absoluta o relativa en la secreción de la misma. (Guzmán *et al.*, 2003; Alpizar-Salazar 2007; Rodríguez *et al.*, 2006).

I.2.-Clasificación de DM

Según la Asociación Americana de Diabetes (ADA) la diabetes mellitus se clasifica en 4 principales grupos: (Alpizar- Salazar 2007).

Diabetes tipo 1, Diabetes tipo2, Diabetes gestacional y otros tipos de diabetes.

La Diabetes tipo 1, (DM1D en el pasado conocida como diabetes insulino dependiente o de inicio juvenil), se caracteriza por un déficit absoluto de secreción de insulina debida a la destrucción de las células beta del páncreas (autoinmune) o por otros factores no inmunológicos (Idiopática).Es de inicio temprano antes de los 30 años con dependencia de insulina exógena para mantener la vida y tendencia al desarrollo de cetoacidosis.

Diabetes tipo 2, (DM2D, Conocida en el pasado como diabetes no insulino dependiente). Comprende un grupo heterogéneo de transtrornos que varían en cuanto a etiología, manifestaciones clínicas y modo de herencia. La Diabetes mellitus tipo 2(DM2) pertenece a este grupo; es una enfermedad progresiva, cuya historia natural permite identificar tres componentes principales: 1) resistencia a la acción de la

insulina en el músculo, tejido adiposo e hígado; 2) déficit no autoinmune de secreción insulínica por fallo de la célula beta, y 3) aumento de la producción hepática de glucosa en ayunas postingesta. El 60% de las diabetes a nivel mundial corresponden a este tipo.

La Diabetes gestacional (DMG). Se presenta como intolerancia a la glucosa detectada por primera vez durante el embarazo y se cree que es producto de alteraciones metabólicas y hormonales. (Bennington 1991).

Otros tipos de diabetes, entre los que se incluyen la Diabetes tipo MODY, la diabetes mitocondrial y las descritas en la tabla 1.

La diabetes tipo MODY, (MODY= del inglés “Maturity onset diabetes of the young”). Diabetes del adulto de inicio juvenil, es un subtipo heterogéneo clínica y genéticamente de diabetes mellitus no insulino dependiente (tipo 2) no asociado con obesidad, hipertensión o alteraciones lipídicas. Es una forma monogénica de enfermedad transmitida por herencia autosómica dominante de establecimiento o aparición temprana (generalmente antes de los 25 años, a menudo en la infancia o adolescencia), causada por mutación heterocigótica de al menos 5 genes que codifican a los factores de transcripción: *HNF4A* (MODY1), *HNF1A* (MODY3), *PDX1* (MODY4), *HNF1beta* (MODY5) y *NEUROD1* (MODY6) y por una mutación en el gen *GK* (MODY2). Se caracteriza por un déficit en la secreción de insulina estimulada por glucosa en las células beta-pancreáticas (Domínguez-López *et al.*, 2005).

La Diabetes mitocondrial. Se debe a mutaciones en el DNA mitocondrial, la mejor conocida es la (A3243G) que impide la entrada de leucina en la mitocondria, afectando la cadena respiratoria. Aunque la mutación está presente en todas las células, la

expresión clínica afecta solamente a las células beta y a las del oído interno. Clínicamente se caracteriza por herencia materna, diabetes de aparición en adultos jóvenes (sobre los 40 años), generalmente leve, con sordera neurosensorial, no se presenta insulinoresistencia y la evolución natural es hacia la insulinopenia.

Tabla 1. Otros tipos de diabetes mellitus (Tomado de Alpizar- Salazar 2007 modificado).

Otros tipos de diabetes	Causantes de
Defectos genéticos de la acción de la insulina:	Insulino-resistencia tipo A, Diabetes lipoatrófica, S. de Rabson- Mendehall.
Pancreopatía:	Pancreatitis crónica, Pancreotomía, Hemocromatosis, Neoplasias, Fibrosis quística.
Endocrinopatía:	Acromegalia, S. de Cushing, Feocromocitoma.
Diabetes Inducidas por fármacos y drogas:	Corticoides, Ácido nicotínico, Inhibidores de proteasa, diazóxido.
Diabetes causada por Síndromes genéticos	Down, Klinefelter, Turner, Prader-Willi.

I.3 Diabetes mellitus tipo 2(DM2).

La Diabetes melitus tipo 2 (DM2) diabetes del adulto o de comienzo en la madurez no insulino dependiente, aparece generalmente después de los 35 años, aunque en los últimos años se ha visto con más frecuencia en adolescentes y personas muy jóvenes con obesidad. Sus características clínicas más representativas son: obesidad (85%), alta penetrancia (concordancia en gemelos monocigóticos superior al 90%), herencia de carácter poligénico, asociación con hipertensión arterial, dislipidemia y elevado riesgo cardiovascular. El 70%, por lo menos, de diabéticos tipo 2 fallece como consecuencia de accidentes cardiovasculares. Más de la mitad de diabéticos tipo 2 cumple los criterios diagnósticos del llamado por Reaven "Síndrome X" ó "Síndrome Metabólico",

agrupamiento de alteraciones metabólicas, hemodinámicas y vasculares que tienen a la resistencia a la insulina como base fisiopatológica y que conllevan un elevado riesgo cardiovascular (Carmena, en Segovia *et al.*, 2004). No se conoce un marcador específico diagnóstico para identificarla, pues su desarrollo se asocia a múltiples factores (genéticos, ambientales, alimentación, falta de ejercicio). El 90% de todas las formas clínicas de diabetes pertenecen a este tipo. (Alpizar-Salazar 2007). Se considera la segunda complicación médica después del cáncer (Barrilleaux *et al.*, 2002) y las complicaciones multisistémicas que genera en diferentes órganos continúan siendo una de las principales causas de muerte en los individuos de todo el mundo (Gutierrez *et al.*, 2002).

I.4. Epidemiología y mapa de distribución de Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) en México

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una enfermedad que emergió en el siglo XX y se amplió en el XXI, constituye un importante problema tanto de salud como socio-económico a nivel internacional como nacional e institucional (Alpizar-Salazar 2007). Se calcula que en el mundo, en el año de 2003, había 143 millones de personas con la enfermedad (Guzmán *et al.*, 2003) y que esta cifra se ha duplicado en 10 años; actualmente afecta a 180 millones de personas a nivel mundial y según las estimaciones se prevé que aumentará a más del doble en 2030. (Guzmán *et al.*, 2003, NOM 2007) Recayendo la mayoría de la carga en países en desarrollo (Alpizar-Salazar 2007). En México la prevalencia de esta enfermedad es alta reportándose con un 7.5 % en el año 2000 en adultos mayores de 20 años (NOM. 2007), cifra que recientemente, se ha incrementado hasta 13.5% en edades por arriba de los 50 años (Aguilar-Salinas 2008). Según la Federación Internacional de Diabetes (IDF “siglas en inglés”) existían en el año 2003, alrededor de 4.4 millones de personas con diabetes en México, y para

I.5.-Diagnóstico y principales complicaciones de la DM2.

Según la NOM para el manejo y control de la diabetes, el diagnóstico se basa sobre el patrón clásico acompañado de hiperglucemia o intolerancia a la glucosa, estableciéndose el diagnóstico de diabetes, cuando se presentan y cumplen los siguientes criterios: glucemia plasmática en ayuno ≥ 126 mg/dl (7 mmol/l); o bien glucemia plasmática casual ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/l). En ausencia de hiperglucemia inequívoca, con descompensación metabólica aguda, el diagnóstico debe confirmarse repitiendo la prueba otro día. Se establece el diagnóstico de glucosa anormal en ayuno, cuando la glucosa plasmática o en suero es ≥ 110 mg/dl (6,1 mmol/l) y < 126 mg/dl (6,9 mmol/l) y se establece el diagnóstico de intolerancia a la glucosa, cuando la glucosa plasmática, a las dos horas postcarga (después de carga oral de 75 g de glucosa disuelta en agua), es ≥ 140 mg/dl (7,8 mmol/l) y < 200 mg/dl (11.1 mmol/l). (Alpizar Salazar 2007). Además de la presencia de síntomas clásicos, que incluyen presión arterial elevada, triglicéridos elevados, disminución de lipoproteínas de alta densidad y obesidad central ver tabla 2.

Los síntomas clásicos de la DM2 son poliuria, polidipsia, polifagia, cetonuria y disminución ponderal rápida. Los trastornos metabólicos agudos de la DM2 pueden ser controlados con terapéutica adecuada, sin embargo los diabéticos son susceptibles de padecer un grupo de complicaciones graves que aparecen a edades avanzadas, las cuales incluyen aterosclerosis, microangiopatía, retinopatía, nefropatía y neuropatía que producen una morbilidad considerable y mortalidad prematura. (NOM modificada para manejo y control de DM2). La diabetes es la causa más importante para la amputación de miembros inferiores, de origen no traumático, así como de otras

complicaciones en los que padecen esta enfermedad. Es también uno de los factores de riesgo más importantes por lo que se refiere a las enfermedades cardiovasculares.

Una serie de factores en conjunto aumentan la probabilidad de desarrollar diabetes y básicamente se clasifican en modificables y no modificables.

Tabla 2. Factores de riesgo para desarrollar diabetes mellitus (tomado de Alpizar Salazar, 2007).

No modificables
* Edad igual o mayor a 45 años
* Antecedente de diabetes mellitus en un familiar de primer grado (padres, hermanos o hijos)
* Antecedente de haber tenido un hijo con un peso al nacer ≥ 4 Kg.
Modificables
* Obesidad
* Sobrepeso
* Sedentarismo
* Tabaquismo
* Manejo inadecuado del estrés
* Hábitos inadecuados de alimentación
* Estilo de vida contrario a su salud
* Índice de masa corporal ≥ 27 kg/m ² en hombres y ≥ 25 Kg/m ² en mujeres
* Índice de cintura-cadera ≥ 0.9 en hombres y ≥ 0.8 en mujeres
* Presión arterial con cifras $\geq 140/90$ mmHg
* Triglicéridos ≥ 150 mg/dl
* HDL de colesterol ≤ 35 mg/dl

I.6-Patogenia molecular de la Diabetes mellitus 2

La diabetes mellitus tipo 2 es es una condición heterogénea de hiperglucemia e insulino-resistencia, los primeros eventos inician, como ya se mencionó, con un déficit en la secreción de insulina y en muchos pacientes se da una deficiencia relativa de la misma en asociación con resistencia periférica (Mahler *et al.*, 1999; Tussié 2000). Por

mucho tiempo se ha discutido la contribución de los dos defectos principales (falla de la célula beta y resistencia a la insulina) a la génesis de la diabetes. Con la información actual no es posible identificar el defecto inicial, sin embargo se ha visto que uno de los aspectos iniciales en los estudios de pacientes con diabetes son los cambios en la pulsatilidad de la insulina (liberación de insulina asincrónica,) que se caracterizan inicialmente por una alteración en la primera fase de secreción de insulina durante la estimulación de glucosa y pueden preceder la aparición de intolerancia a la glucosa en la diabetes tipo 2. Los defectos en la pulsatilidad con la que se secreta la insulina, son causa de menor actividad de la hormona en los tejidos periféricos, se sabe que la pulsatilidad anormal de la insulina juega un papel importante en las alteraciones ocasionadas por el incremento de la gluconeógenesis hepática, y que esta desregulación en la pulsatilidad es precedida por:

- Disminución de la masa de células β (la masa de células beta es menor a 40% al momento del diagnóstico de la diabetes, el depósito de ácidos grasos, colesterol y otros lípidos tóxicos contribuyen a la disminución de la masa de células beta) disminuyendo la cantidad secretada de insulina; la cual es insuficiente para inhibir la lipólisis y la gluconeogénesis (fenómenos que son reprimidos a concentraciones de insulina menores a las requeridas para inducir la utilización de glucosa en el músculo estriado).

- Baja repuesta de las células β al estímulo con glucosa, hiperinsulinismo dependiente de proinsulina, disminución del contenido de insulina en la célula β , aumento de gránulos inmaduros en la célula β , aumento del volumen de células α y aumento en la secreción de glucagon.

Las vías de resistencia a la insulina así como la disminución de la secreción de insulina reducirán la señalización de ésta en sus tejidos blanco, lo que lleva a un aumento de los ácidos grasos circulantes y a hiperglucemia de la diabetes (la hiperglucemia ocurre al inicio, después del consumo de los alimentos, momento en que su depuración depende de la utilización por el tejido muscular; la hiperglucemia de ayuno ocurre cuando la producción hepática de glucosa no puede ser reprimida por las concentraciones de insulina) a su vez, las concentraciones elevadas de glucosa y ácidos grasos en la sangre se reincorporarán empeorando tanto la secreción como la resistencia de insulina (Aguilar-Salinas 2008), conduciendo finalmente a la insuficiencia en la función de las células- β ; todos estos eventos anteceden y acompañan a la DM2. (Mahler *et al.*, 1999; Guzmán *et al.*, 2003; Salehi *et al.*, 2006; Chapman 2007; Alpizar-Salazar 2007).

Como ya se mencionó la resistencia a la insulina está fuertemente asociada a la diabetes tipo 2. Factores "diabetogénicos" que incluyen: ácidos grasos libres (FFA), TNFalfa y estrés celular inducen resistencia a la insulina a través de la inhibición de las funciones del sustrato receptor de la insulina 1 (IRS1). La fosforilación de las Serinas/Treoninas, las interacciones con el supresor de las señales de citocinas (SOCS), la regulación de la expresión, la modificación de la localización celular, y la degradación representan los mecanismos moleculares estimulados por estos factores, involucrando en este proceso varias quinasas (ERK, JNK, IKKbeta, PKCzeta, PXCtheta y mTOR) Figura 2.

Durante el desarrollo de la diabetes tipo 2 se ha demostrado que la hiperglucemia crónica induce múltiples defectos, que conllevan a la alteración en la función de las

células beta. Se ha propuesto que la hiperglicemia genera una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células-β, con el subsecuente daño a los componentes celulares (incluyendo PDX-1). La pérdida de PDX-1, un regulador crítico de la actividad del promotor de la insulina, se ha propuesto también como un importante mecanismo que conduce a la disfunción de la célula-β (Servitja-Ferrer 2004; Stumvoll *et al.*, 2005; Lazo de la Vega *et al.*, 2009).

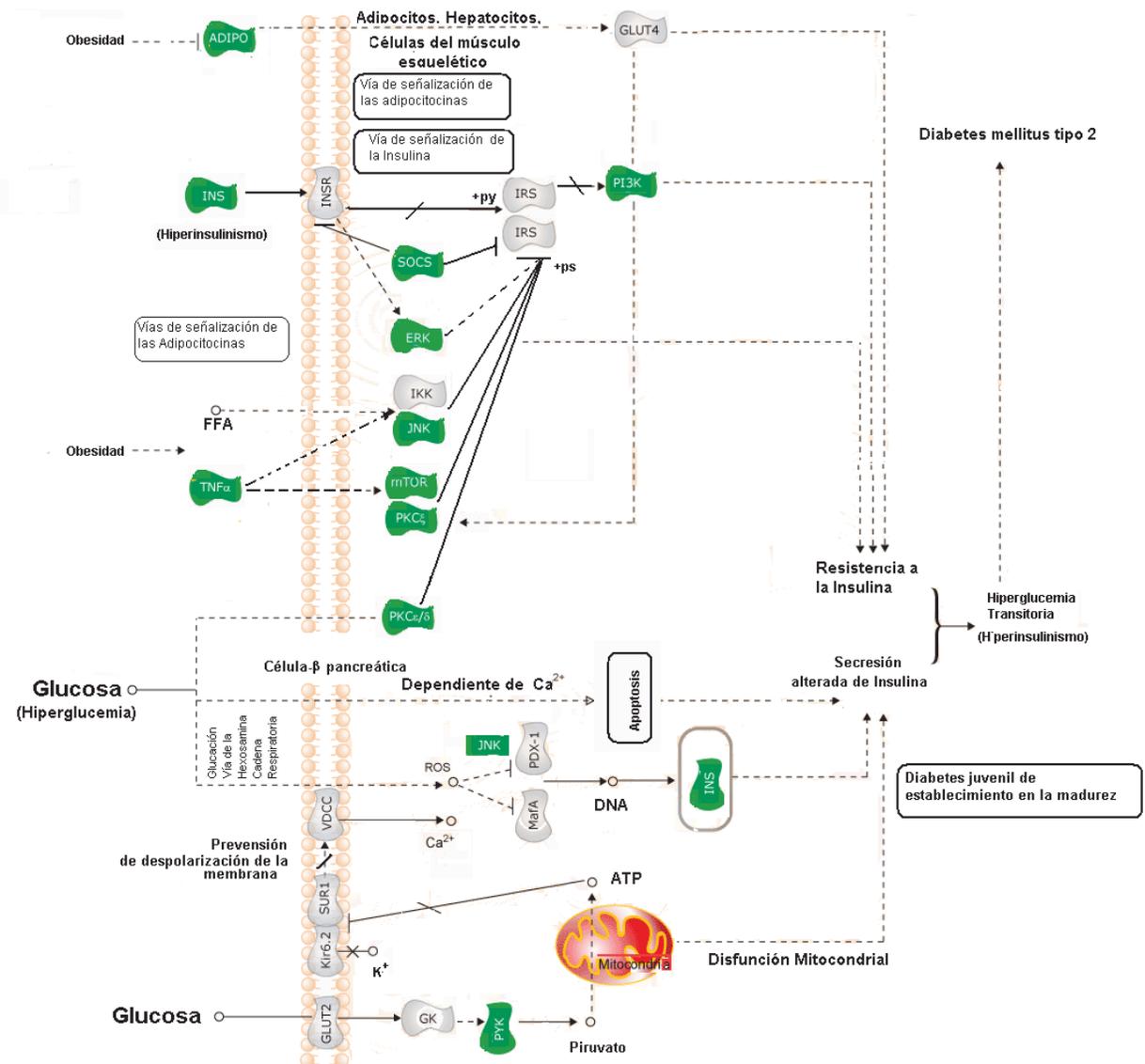


Figura 2 . Vías de señalización que conducen al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (DM2). \top Disociación, \circ Molécula de un componente químico \dashv Inhibición $+ps$ Fosforilación en serina, $+py$ Fosforilación en tirosina, $\dots \rightarrow$ Efecto indirecto (modificada de http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04930 10 de octubre de 2010).

Función y señalización normal de la célula β

La célula β adulta es un tipo celular altamente especializado que se encarga de controlar la producción, procesamiento, almacenamiento y modulación de la secreción de insulina en respuesta a cambios en metabolitos, hormonas, circulantes y neurotransmisores (acetilcolina, noradrenalina, entre otros). Esta especialización está dada por un grupo de factores transcripcionales, que en su conjunto, modulan la expresión tanto de la insulina, como de otros componentes claves en el proceso de acoplar la síntesis y secreción de esta hormona en cantidades adecuadas-para cubrir las demandas metabólicas del organismo- (Lazo de la Vega *et al.*, 2009).

La liberación de insulina de las células β -pancreáticas en las personas que no padecen diabetes, tiene 2 fases de secreción observadas después de una carga de glucosa:

- En la primera fase la liberación de insulina ocurre de manera inmediata, en respuesta al aumento de los niveles de glucosa en la sangre.y representa a la insulina almacenada en las células β del páncreas.
- En la segunda fase se produce una liberación sostenida y lenta de la insulina que es sintetizada nuevamente.

El mecanismo molecular de secreción de la insulina durante la primera fase, en respuesta a las concentraciones plasmáticas de glucosa, inicia con la detección de estos niveles glucémicos: la glucosa entra rápidamente en la células- β a través del transportador GLUT-2 y principalmente a través de GLUT 1 en el humano, tras lo cual la glucosa, es fosforilada a glucosa-6-fosfato por la glucocinasa vía glucólisis en el citoplasma celular y posteriormente degradada a piruvato, entrando así al ciclo de los

ácidos tricarboxílicos en la mitocondria, donde se producen por oxidación varias moléculas de ATP, liberadas al citoplasma, lo que conlleva a un aumento en la tasa de ATP/ADP. Este aumento en ATP, activa la subunidad proteica SUR1 (receptor de sulfonilurea tipo 1) de los canales de potasio dependientes de ATP y conduce al cierre de la subunidad adyacente Kir 6.2 del canal rectificador de la entrada de potasio bloqueando la entrada de potasio (K⁺), lo que permite la despolarización de la membrana plasmática y la consiguiente apertura de los canales de Calcio (Ca²⁺) dependientes de voltaje, de tal forma que se produce un flujo del calcio extracelular al interior de la célula aumentando el nivel de calcio intracelular y produciendo la activación de la fosfolipasa C (la cual desdobla los fosfolípidos de membrana: el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) en inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol). El inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) se une a los receptores proteicos sobre la membrana del retículo endoplásmico (RE), lo que permite la liberación de Ca²⁺ del RE a través de los canales IP₃ aumentando más aún la concentración intracelular de calcio; estas cantidades significativamente mayores de calcio dentro de las células provocan la fusión de las vesículas que contienen los gránulos de insulina a la membrana plasmática y se libera por exocitosis la insulina previamente sintetizada y almacenada en las vesículas secretoras. Figura 3 (Stumvoll *et al.*, 2005; Lazo de la vega *et al.*, 2009).

Este es el principal mecanismo para la liberación de insulina.

El control de las concentraciones de glucosa en sangre es determinada entonces por un balance entre la entrada de glucosa al organismo y sus niveles en la circulación; éstas conducen a una respuesta en la secreción de insulina. La liberación de insulina suprime la producción hepática y estimula la concentración periférica de glucosa, lo cual limita el

incremento de glucosa posprandial. La insulina es entonces la hormona clave que regula la respuesta metabólica de la glucosa en sangre y generalmente la normoglucemia es mantenida por el balance entre la secreción y la liberación de la misma (Lazo de la Vega *et al.*, 2009).

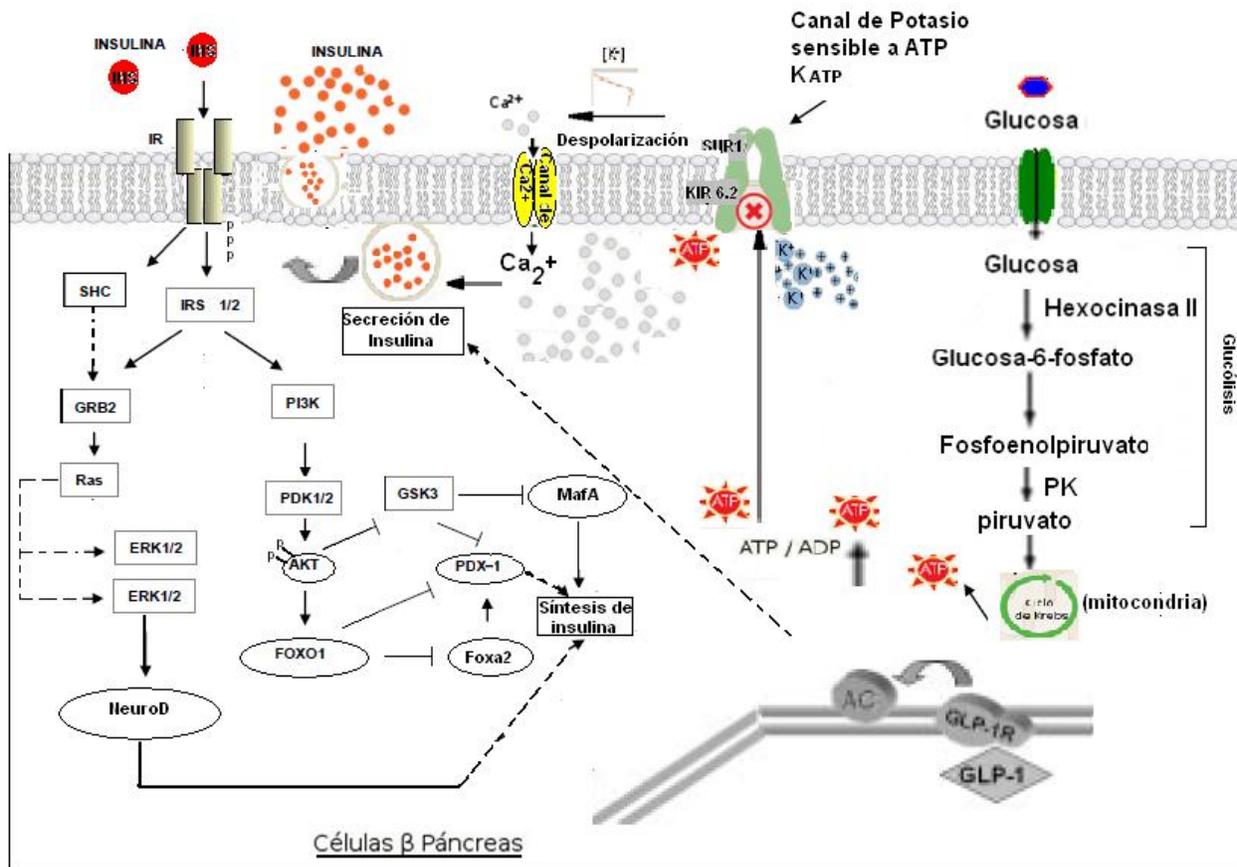


Figura 3. Vías de estimulación de la secreción de insulina en una célula- β normal. En respuesta a glucosa y vía de transducción de señales de la insulina (papel autócrino de la insulina en la célula β). En presencia de altas concentraciones de glucosa plasmática, el metabolismo de la glucosa dentro de la célula β causa un incremento en la relación ATP/ADP, despolarizando la membrana, abriendo los canales de calcio y provocando la entrada de calcio extracelular al interior de la célula. Proceso que provoca la fusión de los gránulos de insulina con la membrana plasmática y la secreción de insulina. Mecanismo potenciado por GLP-1 sobre su receptor en la membrana plasmática de la célula β . El receptor de la insulina tiene además actividad intrínseca de cinasa de tirosina y entra en interacción con proteínas sustratos del receptor de insulina ([*insulin receptor*IRS] y Shc). Esto resulta en la activación de vías de señalización: *PIK3-Akt* y *Ras-ERK*. Estas vías entre otras cosas activan factores transcripcionales que participan de forma directa (NeuroD, MafA, PDX1) o indirecta (FoxO1, Foxa2) en la transcripción del gen de la insulina (modificada de Lazo de la Vega *et al.*, 2009).

Esta hormona, secretada por las células- β del páncreas, es regulada por diferentes secretagogos, incluyendo glucosa y las incretinas, como el péptido semejante al glucagón GLP-1 (una hormona protéica producida por las células endócrinas del intestino y un factor importante para la síntesis de insulina. (Lazo de la Vega *et al.*, 2009).

Además de este mecanismo, diversos estudios han mostrado un papel autócrino de la insulina sobre la función de la célula- β (Navarro *et al.*, 2004). En este proceso, la unión de la insulina promueve la autofosforilación del receptor, catalizando a su vez la fosforilación en tirosina de proteínas IRS (IRS1 ó IRS2), estas proteínas fosforiladas interactúan con moléculas de señalización, generando una cascada de fosforilaciones y desfosforilaciones activando la vía PI3K, PDK y Akt, una cinasa serina/treonina que regula procesos como: sobrevivencia celular, la proliferación, el crecimiento y el metabolismo de nutrientes a través de fosforilaciones de distintas proteínas como GSK3, FOXO y CREB. Tanto el receptor de insulina activado a través de Shc, como el IRS actúan también sobre la vía Ras que activa a su vez, las vías de las MAP cinasas ERK1/2, que regulan el crecimiento y diferenciación celular y la síntesis de proteínas. Entre ellas la síntesis de insulina de forma directa o indirecta. Figura 3 (Lazo de la Vega *et al.*, 2009).

Disfunción de la célula β

Toda la serie de eventos iniciados décadas atrás, antes de la aparición de la diabetes tipo 2, y que alteraron el funcionamiento normal de la célula- β se atribuyen a varios mecanismos patológicos resultado de la interacción de factores genéticos y ambientales. (Alpízar-Salazar 2007).

Estudios de agregación familiar, concordancia en gemelos monocigotos vs. Dicigóticos, así como de prevalencia en distintas poblaciones han demostrado que existe una clara predisposición genética en la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad (Tussié, 2000). Numerosos estudios han tratado de definir la participación de distintos genes relacionados con el metabolismo y la homeostasis de la glucosa en la patogénesis de la diabetes tipo 2 ya sea a través de estudios de asociación, de ligamiento genético o bien a través de estrategias para la búsqueda de mutaciones (Tussié 2000), entre los más de 300 genes que se han investigado, se ha logrado identificar en las regiones cromosómicas o loci 1q21-24, 1q31-q42, 2q, 3p25, 5q, 6q 8p, 9q21 10q12.3, 10q23, 11p15, 11q13-14, 12q12, 19q13 y 20q11-q13 genes implicados en la susceptibilidad a la DM2 o rasgos metabólicos cuantitativos asociados a esta. (Tussié 2000; Stumvoll *et al.*, 2005). La mayoría de ellos regulan la síntesis o secreción de la insulina. Estos genes son: PPARG, KCNJ11, TCF7L2, CDKAL1, CDKN2A/B, IGF2BP2, HHEX/IDE, FTO y SLC30A8. De estos genes se ha reportado consistentemente a 3 de ellos (*TCF7L2*, *PPARg* y *KCNJ11*) como los más implicados a nivel mundial en el desarrollo de DM2 en diversas poblaciones (Burton *et al.*, 2007), y 10 se reportan con cierta asociación en ciertas poblaciones (Tabla 3).

Los alelos de riesgo de los genes antes mencionados son frecuentes en poblaciones Francesas, Inglesas, Finlandesas, Sudafricanas y Japonesas, estos alelos Interactúan entre sí teniendo fenómenos aditivos en el riesgo de sufrir diabetes y los individuos que tienen todos los alelos no comunes de los nueve genes tienen 21 veces más riesgo de sufrir diabetes en comparación con sujetos que no tienen alguno de ellos. Sin embargo, la contribución del riesgo global es pequeña para todos los genes; y el de mayor contribución es el gen *TCF7L2*. En los últimos años se ha propuesto la participación

Tabla 3. Principales genes en los que se ha encontrado asociación con DM2.

Símbolo del gen	Variante	Cromosoma	Función del gen	Referencia
<i>TCF7L2</i> ,	<u>rs4506565</u> T>A <u>rs7903146</u> C>T	10q25.3	Factor nuclear que transactiva proglugagon y genes de insulina	Duggirala <i>et al.</i> , 1999 del Bosque-Plata <i>et al.</i> , 2004 Jin <i>et al.</i> , 2008 Van Hoek <i>et al.</i> , 2008 Grant <i>et al.</i> , 2009
<i>PPARG2</i>	<u>rs17036328</u> T>C <u>rs1801282</u> G>C Pro12Ala <u>rs17036314</u> G>C	3p25	Receptor nuclear que regula el almacenamiento de ácidos grasos y metabolismo de la glucosa.	Jones <i>et al.</i> , 2005 Grant <i>et al.</i> , 2009 Van Hoek <i>et al.</i> , 2008
<i>KCNJ11</i>	<u>rs5215</u> G>A Val337Ile. <u>rs5219</u> A>G Lys23Glu	11p15.1	Gen que codifica la Proteína integral de membrana Kir 6.2 subunidad que asociada con el receptor de sulfonilureas (SUR) forman el canal de potasio sensible-ATP	Koo <i>et al.</i> , 2007 Burton <i>et al.</i> , 2007 Omorí <i>et al.</i> , 2008 Van Hoek <i>et al.</i> , 2008
<i>HHEX</i>	<u>rs7923837</u> A>G <u>rs1111875</u> T>C	10q23.33	Factor de transcripción de la familia homeobox. involucrado en procesos de desarrollo y expresión en determinados linajes hematopoyéticos	van Vliet <i>et al.</i> , 2008 Horikawa <i>et al.</i> , 2008 Zhou <i>et al.</i> , 2010
<i>SLC30A8</i>	<u>rs3802177</u> G>A <u>rs13266634</u> T>C Arg325Trp	8q24.11	Transportador de Zinc en las células-β □□almacenaje y secreción de insulina	Omorí <i>et al.</i> , 2008 Horikawa <i>et al.</i> , 2008 Perry <i>et al.</i> , 2008 Grant <i>et al.</i> , 2009
<i>CDKAL1</i>	<u>rs7756992</u> A>G <u>rs7754840</u> G>C	6p22.3	Homólogo a CDCDK5RAP1, inhibidor de CDK5,	Andersson <i>et al.</i> , 2010 Wu <i>et al.</i> , 2008 Omorí <i>et al.</i> , 2008 Perry <i>et al.</i> , 2008
<i>FTO</i>	<u>rs8050136</u> C>A <u>rs9939609</u> T>A	16q12.2	Gen asociado a la obesidad y al índice de masa corporal	Hoek <i>et al.</i> , 2008 Omorí <i>et al.</i> , 2008 Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>IRS1</i>	<u>rs1801278</u> G>A Gly972 Arg <u>rs2943641</u> T>C	2q36	Gen del Sustrato receptor de la insulina tipo 1, participa en la cascada de señalización inducida por la insulina,	Sesti <i>et al.</i> , 2001 Run <i>et al.</i> , 2009

Tabla 3. Continuación.

Símbolo del gen	Variante	Cromosoma	Función del gen	Referencia
<i>IGF2BP2</i>	<u>rs4402960</u> G>T <u>rs1470579</u> A>C <u>rs4402960</u> G>T	3q27.2	Gen de la Proteína de unión al factor de crecimiento; participa en el desarrollo pancreático1	Duesing <i>et al.</i> , 2008 Grant <i>et al.</i> , 2009
<i>CDKN2B</i>	<u>rs10811661</u> C>T	9P21.3	Inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina y supresor de tumores p15, participa en el desarrollo de los islotes pancreáticos	Horikawa <i>et al.</i> , 2008 Grant <i>et al.</i> , 2009
<i>ADAMTS9</i>	<u>rs7578597</u> T>C Thr1187Ala <u>rs4607103</u> T>C	3p14.1	Gen que codifica una proteína miembro de la familia ADAMTS, implicada en el clivaje de proteoglicanos, en el control de la forma de los órganos durante el desarrollo y la inhibición de la angiogénesis	Boesgaard <i>et al.</i> , 2009 Omori <i>et al.</i> , 2009
<i>CAPN10</i>	Intrón 3 UCSNP-43 G>A <u>rs3842570</u> IVS6, INS/DEL, 39- BP	2q37.3	Cistein-proteasa que participa en la regulación de la apoptosis, en especial en las células beta	Horikawa <i>et al.</i> , 2000. del Bosque-Plata <i>et al.</i> , 2004 Ezzidi <i>et al.</i> , 2010
<i>TCF1</i>	Gln4863>paro	12q24.2	Gen de la proteína del Factor hepatocítico nuclear 1 alfa, que regula la expresión de varios genes en el hígado, defectos en este gen causan MODY tipo 3	Aguilar _salinas <i>et al.</i> , 2001
<i>HNF4A</i>	<u>rs1884613</u> C>G <u>rs2144908</u> G>A <u>rs1800961</u> C>T	20q13.12	Factor nuclear que regula el metabolismo de lípidos y carbohidratos. En Célula-β es un activador transcripcional de varios genes. Necesario para la correcta secreción de insulina en respuesta a glucosa	Lehman <i>et al.</i> , 2007 Ek <i>et al.</i> , 2008 Lazo de la Vega <i>et al.</i> , 2009

de genes involucrados en vías metabólicas aún no conocidas o bien reguladores de genes asociados al metabolismo y la homeostásis de la glucosa o de genes que codifican para factores transcripcionales, como los asociados al riesgo de desarrollar DM2 (Tussié 2000; Lazo de la Vega *et al.*, 2007).

En varios estudios se ha mostrado que el desarrollo y correcto funcionamiento de las células- β del páncreas está regulado por la acción de diversos factores transcripcionales, estos factores son proteínas que regulan la transcripción de mRNA al unirse a secuencias específicas (elementos de respuesta) en los promotores y otros elementos cis de un gen determinado (Lazo de la Vega *et al.*, 2009). Estos factores en su mayoría se encuentran regulando genes involucrados en el metabolismo de la glucosa. Evidencia de ello ha sido el estudio de la subvariedad monogénica de diabetes tipo MODY, donde se ha reconocido que una mutación en 5 de los genes que codifican estos factores transcripcionales (HNF4- α , HNF-1 α , IPF-1, HNF-1 β , y HNF-3 β , los cuales participan como reguladores positivos directos o indirectos del gen de la insulina y de otros genes pancreáticos) modifican la capacidad secretoria del páncreas conduciendo a una alteración en la secreción de insulina y al desarrollo de un fenotipo específico de diabetes tipo MODY (Maturity-onset-diabetes of the Young). Actualmente estos factores han sido implicados como un determinante de la falla de la célula- β en la diabetes tipo 2 (Yamagata *et al.*, 1996; Tussié 2000Aguilar *et al.*, 2008).

Estudios recientes en los seres humanos, muestran que mutaciones en algunos de estos factores como: *HNF1A*, *HNF1B* y *HNF4A*, no solo predisponen al desarrollo de diabetes tipo MODY, sino se asocian a un riesgo mayor de desarrollar diabetes mellitus tipo 2, en algunas poblaciones (Abderrahmani *et al.*, 2000).

I.7.- Gen del Factor Hepatocítico Nuclear 4 Alfa (*HNF4A*)

El gen *HNF4A* (Factor hepatocítico nuclear 4 Alfa), es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares de hormonas esteroideas/tiroideas, que genera una proteína clave en la regulación de muchas vías metabólicas; se ha vinculado con la aparición y desarrollo de varias enfermedades, como la diabetes autosómica dominante de establecimiento temprano tipo I (MODY I), la hemofilia, la aterosclerosis y la diabetes mellitus tipo 2 Figura 4 (Yuang *et al.*, 2009).

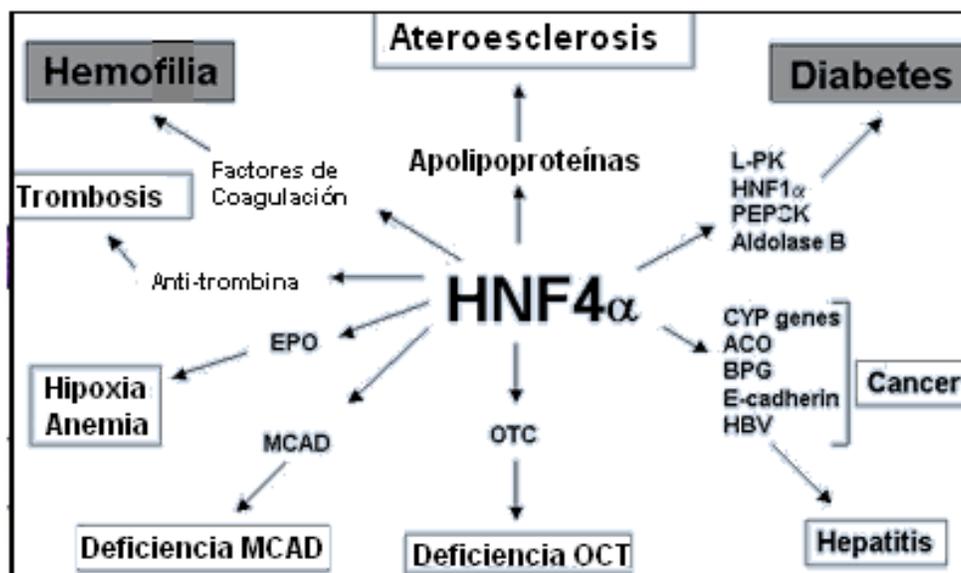


Figura 4. Relación entre los genes blanco de *HNF4 α* , y las enfermedades humanas. En los cuadros sombreados se muestra la conexión directa a las enfermedades indicadas y los cuadros en blanco, las probables conexiones.

I.8. Estructura del gen humano (*HNF4A*)

HNF4A (conocido también como: *TCF14*, *TCF*, *NR2A21*, *NR2A1*, *MODY*, *MODY1*, *HNF4alpha*, *HNF4a9*, *HNF4a8*, *HNF4a7*, *HNF4*;) pertenece a la superfamilia de receptores nucleares de hormonas tiroideas/esteroideas (*NR2A1*) y es un miembro altamente conservado de los receptores nucleares (*NR*); está involucrado en la

regulación transcripcional de las células hepáticas e islotes pancreáticos en el humano. El gen *HNF4A* se localiza en el brazo corto del cromosoma 20 en el locus 13.12 (cromosoma 20q13.12) y comprende aproximadamente 74 Kb; está constituido por al menos 10 exones, y tiene 2 promotores (P1 y P2) que conducen la expresión de 9 variantes (isoformas) que se generan por splicing alternativo, las cuales difieren en los dominios A/B y F. Los 2 promotores son usados en diferentes tejidos y durante diferentes etapas del desarrollo Figura 5 (Bolotin *et al.*, 2010).

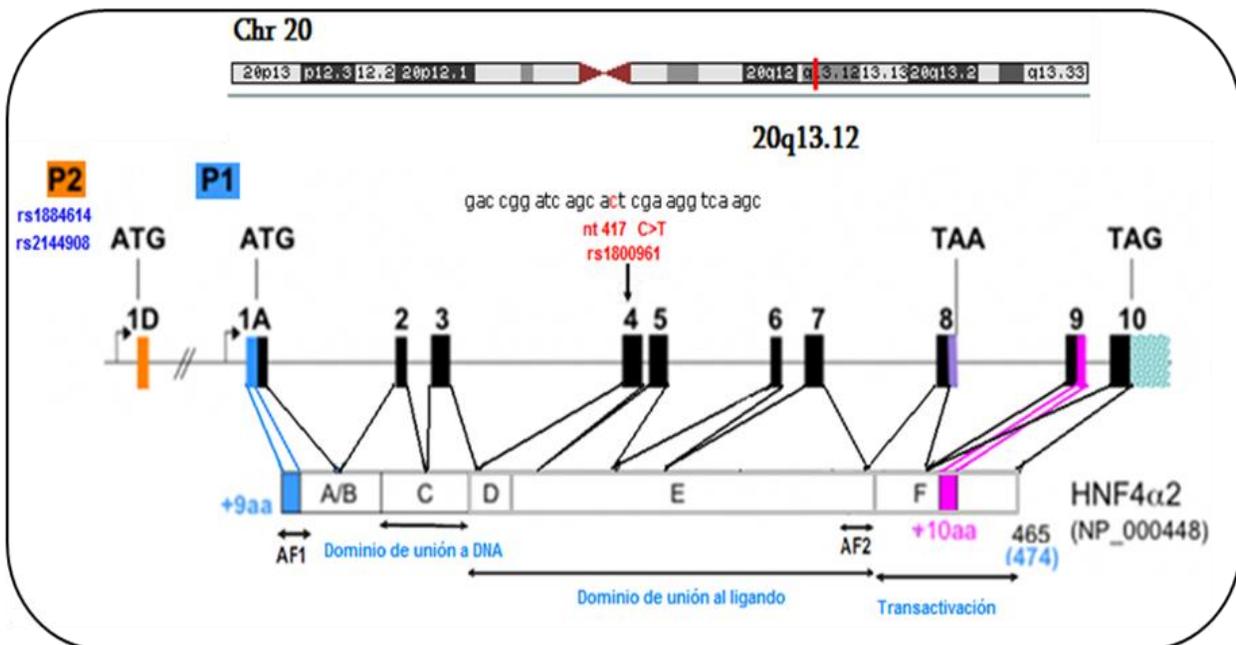


Figura 5. Mapa esquemático del gen *HNF4A* sobre el cromosoma 20 locus q13.12, ilustrando la posición del SNP rs1800961 y los 2 SNP's más comunes que se localizan en el promotor 2. (Tomado de Bolotin *et al.*, 2010 modificado).

I.9.-Estructura y función de la proteína del Factor Hepatocítico Nuclear 4α (HNF4α).

La proteína codificada por *HNF4A* genera un factor de transcripción nuclear, de expresión constitutiva que fue descubierto en extractos proteicos de hígado de rata (Drewes *et al.*, 1996), y a la fecha se le ha identificado desde esponjas y corales (Yuan *et al.*, 2009), insectos (Sladek and Seidel 2001 en Ryffel 2001) ranas (Holewa *et al.*,

1996), ratones, ratas, hamsters, conejos, bovinos, salmones, chimpancés y seres humanos (Sladek 2010 tomado de: <http://www.cisreg.ca/cgi-bin/tfe/articles.pl?tfid=140>).chechado 10 de octubre de 2010.

La transcripción del mensajero por los 2 diferentes promotores (P1y P2) a partir del “Splicing alternativo” da como resultado 9 transcritos que codifican 9 isoformas de la proteína con expresión tejido específica:

Tabla 4. Isoformas de HNF4 α

<i>isoforma a</i>	Hígadoy Riñon adulto	P1	HNF4A1 455aa (464)
<i>Isoforma b</i>	Hígadoy Riñon adulto	P1	HNF4A2 465aa (474)
<i>Isoforma c</i>	Hígado y Riñon adulto	P1	HNF4A3 408aa (417)
<i>Isoforma d</i>	Páncreas adulto	P1	HNF4A4 442aa
<i>Isoforma e</i>	Hígado fetal	P1	HNF4A5 452aa
<i>Isoforma f</i>	Intestino fetal	P1	HNF4A6
<i>Isoforma g</i>	Páncreas adulto	P2	HNF4A7 442aa
<i>Isoforma h</i>	Páncreas adulto	P2	HNF4A8 452aa
<i>Isoforma l</i>	Páncreas adulto	P2	HNF4A9 395aa

Tomado de Harries; *et al.*, 2008

De las 9 isoformas codificadas sólo 6 de ellas producen transcritos de longitud total, siendo la isoforma. b, la más larga de las proteínas y es generada por el transcrito HNF4A2; el control de expresión de las isoformas generadas en los islotes pancreáticos, es llevado a cabo básicamente por el promotor 2 (Huang *et al.*, 2008)

La proteína muestra una estructura terciaria integrada por 12 hélices alfa y 4 cadenas β -plegadas (Bolotin *et al.*, 2010), que conforman 6 dominios típicos (Figura 6). Los

dominios funcionales del extremo N-terminal de HNF4 α consisten de: un dominio con la función de activación (AF-1, también conocido como dominio A/B que va del “aminoácido” 1 al 50), un dominio con dos dedos de zinc C-4 responsables de la unión al ADN (Dominio C que comprende los aa 51 al 116), un dominio de unión al ligando (Dominio E que abarca los aa 117-135) que contiene la región (AF2) que participa en la activación de la homodimerización y una región C-terminal (Dominio F que va del aa

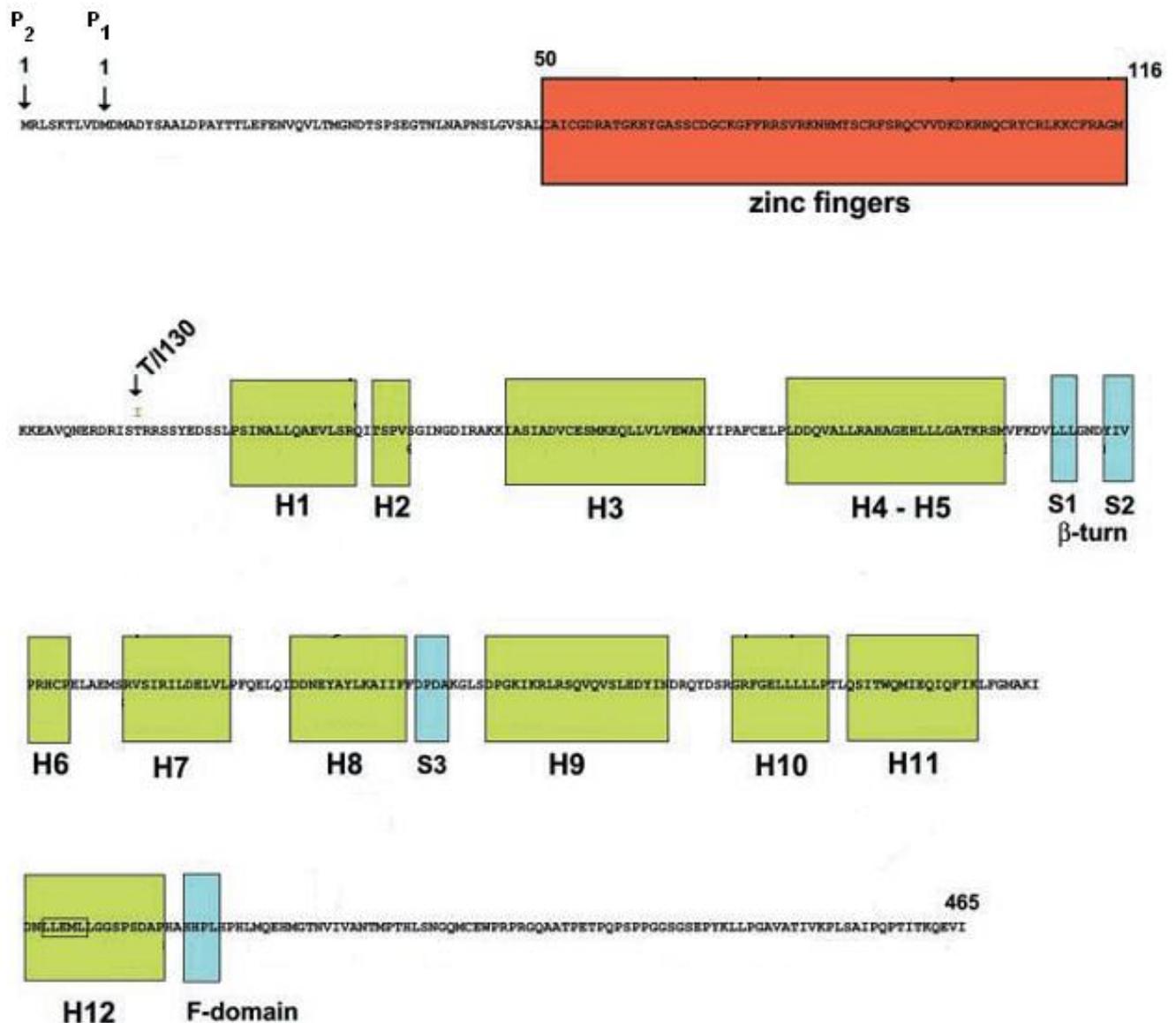


Figura 6. Proteína HNF4 α , mostrando los aminoácidos que conforman cada uno de sus motivos, 12 alfa-hélices en verde y 4 cadenas β -plegadas en azul. Al inicio de la secuencia se muestran los aminoácidos que se transcriben cuando el promotor 1 ó 2 activan el proceso transcripcional (Tomado de Ryffel 2001 modificado).

136 al 465) (Ryffel 2001), Figuras. 6 y 7. La proteína posee un par de residuos con carga, en las hélices 9 y 10 en el dominio de unión al ligando (DBL), una lisina (K) y un ácido glutámico (E) esenciales para la homodimerización (Bogan *et al.*, 2000).

HNF4 α se une exclusivamente como homodímero al DNA, los dedos de zinc (Zn ++), además de la bisagra (H) son las regiones o sitios de reconocimiento para su unión al DNA, al unirse a este, reconoce una secuencia consenso de 6 nucleótidos de repetidos directos 1 (DR1) 5'-AGGTCA-3' o sus variaciones como DR2 con un espacio de uno ó

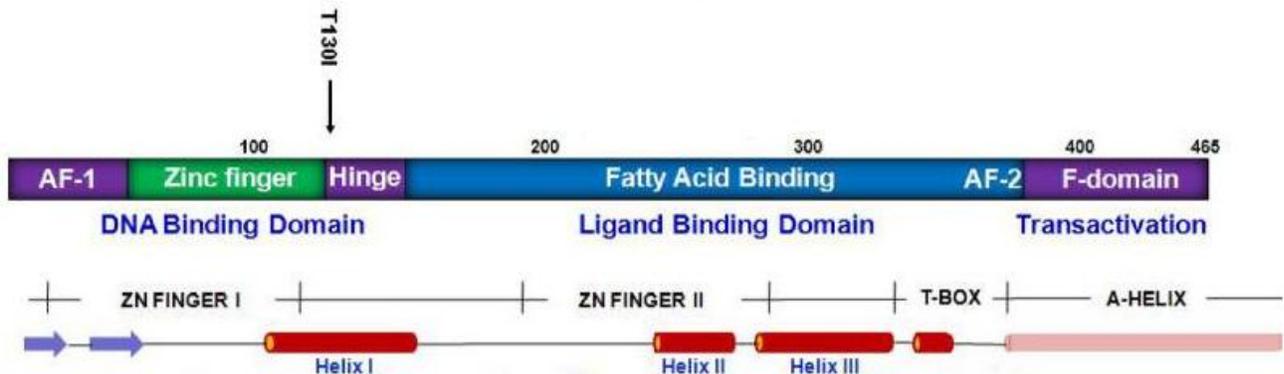


Figura 7. HNF4 α con los 6 Dominios que la constituyen, mostrando la ubicación del polimorfismo T130I en la región de la Bisagra, que se ha asociado a desarrollo de diabetes tipo 2. Abajo estructura de uno de los monómeros que forman el homodímero (Tomada y modificada de Lu *et al.*, 2008).

dos nucleótidos (AGGTCAaAGGTCA) de los genes que están bajo su control, para activar su transcripción (Lu *et al.*, 2008). Su papel en la regulación de los genes de la insulina y del transportador de la glucosa, lo hacen fundamental para el metabolismo de los carbohidratos (Tusié 2000; Lu *et al.*, 2008). Recientemente se ha reportado su ligando endógeno, un ácido graso polinsaturado de cadena larga: el Ácido Linoléico (LA, C18:2 Δ 9,12), el cual se une al dominio LBD y coregula su actividad transcripcional, bajo ciertas condiciones fisiológicas aún no determinadas (Yuan *et al.*, 2009). La región

AF-2 (hélice 12) es absolutamente necesaria para la transactivación y la interacción con varios co-activadores y co-reguladores (PGC1, p300, CBP, GRIP1, SRC1, ACTR), se han encontrado también activadores transcripcionales como (Smad3 / 4) interactuando con la región AF-1, así como la SMRT como co-represor, que también interactúan con el LBD (del inglés Ligand Binding Domain “Dominio de unión al ligando”). El dominio F reprime la transcripción, pero por sí sola no interactúa con el co-represor SMRT. El gen a su vez es regulado por genes como HNF1 α , y PDX1, y otros activadores transcripcionales (*GATA-6*, *STAT5*, *p53*, *PPAR-gamma1*, *PPAR-gamma2*, *SHP*, *ARP-1*, *SREBPs*, *COUP-TF*, *SP1*); tiene sitios de reconocimiento a receptores esteroideos, hormonas tiroideas, y retinoides (Hall *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 2008).

HNF-4 α , es el factor de transcripción encargado de la regulación de la expresión de distintos genes en el hígado, riñón, intestino e islotes pancreáticos. En estos últimos HNF-4 α participa en la regulación de la secreción de insulina en respuesta a la glucosa (Bartoov *et al.*, 2002; Rodríguez Trejo *et al.*, 2006). En el hígado constituye el factor de transcripción más abundante (Zhou *et al.*, 2007), regulando la expresión constitutiva de un gran número de genes blanco (González 2008), se ha descrito como un activador transcripcional de más de 100 genes que codifican para el transporte de lípidos y retinol (*ApoA1*, *ApoAII*, *ApoAIV*, *ApoB*, *ApoCII*, *ApoCII(I)*, *ApoE*, *CRBP II*, *Fabpi*, *MTP*) (Metzger *et al.*, 1993 en Hall *et al.*, 1995), para enzimas metabolizantes de xenobióticos (*CYP2A4*, *CYP2AC1*, *CYP2D6*, *CYP2C2*, *CYP2C3*, *CYP2C9*, *CYP2A23*, *CYP3A1*, *CYP7A1*, *DD/AKR*), para el metabolismo de aminoácidos (*OTC*, *A-LDH2*), para el metabolismo de la glucosa (*PEPCK*, *L-PK*, *AldoB*, *GK*) (Díaz-Guerra *et al.*, 1993; Cuif *et al.*, 1992 en Hall *et al.*, 1995), para Factores de crecimiento (*HGFL*, *PRLP*, *GHR1a*),

en la diferenciación del hígado (*HNF1A*, *HNF6*), en el metabolismo de esteroides y lípidos (*MCAD*, *ACO*, *HMG-CoA*, *HD*, *TB*, *ALDH3*) para transportadores de glucosa (*Glut2* “gen *SLC2A2*”) (Stoffel *et al.*,1997) en proteínas del suero (*TTR*, *1-AT*, *SHBG*) en el mantenimiento de la homeostásis sanguínea (*Factor VII*, *Factor VIII*, *Factor IX* (Reijnem *et al.*, 1992 en Hall *et al.*, 1995), *Factor X*, *Transferrina*, *EPO*, *ATIII*, *ANG*) (Reijnem *et al.*, 1992, Li *et al.*, 2000), en la función y estructura celular (*BGP*, *GCC*), así como en el metabolismo de los aminoácidos(*TAT*, *OTC*, *ALDH2*, *ALDN2*, Prolina-oxidasa).

El mecanismo por el cual actúa sobre sus genes blanco aún no es bien conocido, pero se ha visto que puede reclutar acetiltransferasas de histonas hacia el promotor de su gen blanco, descompactar estructuras cromatínicas o unirse a elementos coactivadores como GRIP1, SCR-1 y p300/CBP, DRIP205, PGC1 (Wang *et al.*, 1998) en ausencia de un ligando exógeno, activando una serie de vías de señalización para el correcto funcionamiento de la célula Beta (Lazo de la Vega *et al.*, 2009).

Las principales funciones del gen *HNF4A* en el adulto están vinculadas a mantener la homeostasis del hígado, el intestino y las células beta-pancreáticas, en esas células regula como ya se mencionó, la expresión del gen de la insulina (*INS*) (Bartoov *et al.*, 2002), y de genes que codifican proteínas involucradas en el transporte de glucosa (como *SLC2A2* que codifica para *Glut2*) o que participan en el equilibrio energético mitocondrial y la regulación de la secreción de insulina como el gen *KCNJ11* -que codifica para la subunidad *Kir 6.2* del canal de potasio dependiente de-ATP-. En modelos animales, se ha visto que la deficiencia de *HNF4A* resulta en menor función de los canales de potasio dependientes de ATP, además de asociarse a una reducción del 25% en la concentración sérica de apolipoproteínas AII, CIII y lipoproteínas. (Rowley

et al., 2006). A nivel fetal es esencial para el desarrollo del páncreas, mantenimiento de la vida y desarrollo del embrión; en estudios realizados en ratones Knock-out homocigotos para este gen se ha observado impedimento de la gastrulación normal, deficiencias en el desarrollo del endodermo visceral y muerte prenatal (Lazo de la Vega; *et al.*, 2009).

1.10.-Vías de Señalización de HNF4- α y su implicación en DM2.

La DM2 se caracteriza -como ya se ha mencionado- por una resistencia a la insulina y una secreción anormal de la misma, existiendo entre otras causas defectos genéticos en la célula- β . Tanto en la diabetes tipo1 como en la diabetes tipo2, se presenta una falla en el funcionamiento y/o sobrevivencia de las células- β y por ende en la producción de insulina, implicándose en estas fallas la regulación de factores transcripcionales que intervienen de manera importante en la producción y secreción de la insulina. HNF4 α se ve regulada por HNF1a y el gen PDX1, bajo diversas condiciones (Figura 8). Los mecanismos de señalización que controlan estos vínculos no son del todo comprendidos, a *HNF4A* se le ha implicado en el desarrollo de DM2 cuando se da una alteración en el gen, que conduce a una proteína modificada generando una transducción de señales incorrecta que bloquea una de las vías en las que esta involucrado, impidiendo la correcta secreción de insulina (Gupta *et al.*, 2005; Jacobson *et al.*, 2007). Se sabe que HNF4 α forma parte de una red transcripcional que permite la liberación de insulina en respuesta a un aumento en los niveles de glucosa, así como la transcripción del gen mismo de la insulina, directa o indirectamente, a través de HNF1 α (Figura 8) (Bartoov *et al.*, 2002). Además, se ha visto que HNF4 α juega un papel crítico en el control de la regulación de la transcripción del gen de la subunidad

reguladora de la entrada de potasio *Kir6.2* (Gupta *et al*, 2005), y del gen de la Glucocinasa -después de haber ingerido alimento- (Hirota *et al.*, 2008). La glucocinasa es la enzima clave en la regulación de la vía glucolítica. Se ha postulado entonces que HNF4 α es necesaria para que se lleve a cabo una correcta secreción de insulina en respuesta a glucosa y que una alteración en el gen *HNF4A* genera una proteína alterada que no permite la correcta transcripción de estos genes blanco lo cual conlleva a un desequilibrio energético a nivel mitocondrial o bien a un bloqueo a nivel del canal de potasio sensible a ATP, no permitiéndose se lleve a cabo la despolarización de la

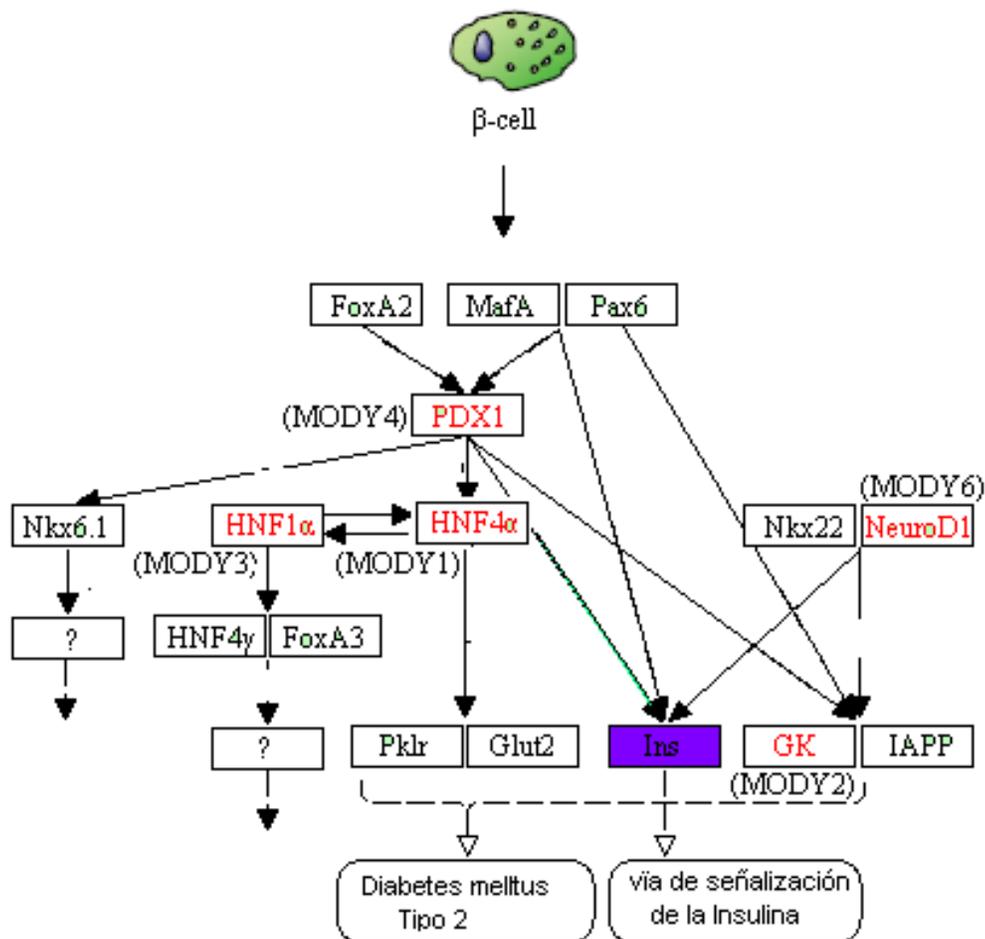


Figura 8. Vías de acción de HNF4 α y su implicación en Diabetes Mellitus tipo 2. (Modificado de http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04950 10 de octubre de 2010).

Membrana citoplasmática y con ello se presenta una falla en la secreción de insulina y en la homeostasis de la glucosa, conduciendo finalmente a la aparición de DM2 (Gupta *et al.*, 2005, Lazo de la Vega *et al.*, 2009). *HNF4A* presenta gran variabilidad entre las poblaciones, siendo altamente polimórfico. A la fecha se han identificado 952 SNP's localizados tanto en las regiones codificantes como no codificantes del mismo. (tomado de la página de SNP's del Centro Nacional sobre información de Biotecnología: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp&cmd=search&term=hnf4+a+homo+sapiens>).

II.-ANTECEDENTES

II.1.- Polimorfismos (SNP's) del gen *HNF4A* asociados a riesgo de desarrollar Diabetes mellitus tipo 2 en diferentes poblaciones

Un polimorfismo genético, es una variación en la secuencia del ADN, que se observa en más del 1% de la población , denominándose entre ellos los que producen un cambio en una única base como polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). A partir del descubrimiento del genoma humano, se comenzó a evaluar la presencia de determinados SNP's asociados al riesgo de desarrollar DM2 en diferentes poblaciones existiendo numerosos estudios referentes a la diabetes mellitus tipo 2 que muestran evidencia de ligamiento a la región cromosómica 20q13.12, donde se localiza el gen *HNF4A* (Xilotl *et al.*, 2009). Mutaciones en este gen producen el fenotipo MODY I y están asociadas a un riesgo mayor de predisponer al desarrollo de DM2 en diferentes poblaciones. Varios SNP's tanto en la región del promotor 2 (rs2144908, rs6031558, rs745975, rs2071197, rs3212183, rs1884614) como en las diversas regiones codificantes del gen (rs137853337 "V393I" , rs1800961 "T139I") (Hani *et al.*, 1998,

Menjívar *et al.*, 2008), se han asociado a la susceptibilidad para desarrollar DM2, en poblaciones como los indios Pima, Mexicanos, Judíos Ashkenazi, Finlandeses y Daneses (Muller *et al.*, 2005; Andrulionyté *et al.*, 2006,). Lo cual ha suscitado el interés en el estudio de las variantes polimórficas de este gen por el potencial que tienen para determinar si se presenta alguna asociación para predisponer al desarrollo de DM tipo 2 en diferentes poblaciones (Smelt *et al.*, 2000).

En 1998 un grupo de investigadores encabezado por el Dr. Hani realizó un estudio para la búsqueda de genes de susceptibilidad al riesgo de desarrollar diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID) en población Francesa. Ellos analizaron un grupo de familias francesas diagnosticadas con DMNID antes de los 45 años de edad, encontrando evidencia que vinculaba marcadores en la región de *HNF-4A* con DMNID, en este estudio se reportó que una de las familias con diabetes y con marcada alteración en la secreción de la insulina, presentaba el polimorfismo (rs137853337) en el gen; que producía un cambio de una guanina por una citocina, que se traducía en el cambio del aminoácido valina-a-isoileucina en la posición 393 (V393I) de la proteína *HNF4 α* y que este cambio no se había presentado en ninguno de los individuos no diabéticos; determinando entonces por estudios de expresión que esta sustitución se asociaba con una reducción de la actividad de transactivación de la proteína, lo cual contribuía a los defectos en la secreción de insulina observados en la familia que había presentado el polimorfismo.

Sakurai *et al.*, 2000. Con el objetivo de investigar la posibilidad de que el gen del Factor Hepatocítico Nuclear 4 alfa (*HNF-4A*) contribuyera a la susceptibilidad para desarrollar diabetes mellitus no insulino-dependiente (DMNID) en pacientes Japoneses,

examinaron las mutaciones que se presentaban en los exones e intrones alrededor del gen *HNF4A*. Analizándose en este estudio 100 muestras de pacientes japoneses diagnosticados con DMNID mayores a los 25 años de edad. Este grupo de investigadores, identificó dos mutaciones sin sentido: una en el exón 4 que cambia al aminoácido treonina por Isoleucina en la posición 130 (rs1800961 C>T) y la otra en el exón 1c que cambia una metionina por valina en la posición 49 (M49V) y dos sustituciones de nucleótidos en 2 intrones: una citosina por timidina a -5 nt del intrón 1b y una adenina por timidina a -21 nt del intrón 5. Concluyendo entonces que la presencia de la mutación T130I en el exón 4 en dos de los pacientes diabéticos, podía influir en la conformación del péptido traduciéndose en cambios en la función del dominio de unión al ligando que afectaban el metabolismo de la glucosa.

Aguilar-Salinas *et al.*, 2001. Con el objetivo de investigar posibles defectos en la sensibilidad de la insulina y/o una respuesta aguda a la misma, y además para evaluar la contribución de algunas mutaciones en tres de los genes (*HNF4A*, *HNF1A* y *GCK*) vinculados a la aparición de diabetes de la madurez del joven, estudiaron un grupo de 40 pacientes mexicanos con Diabetes tipo 2 de inicio temprano, con edades entre los 20 y 40 años, a los que se les hicieron mediciones de glucosa, creatinina, ácido úrico, hemoglobina A, pruebas de función hepática y de la tiroides, para caracterizar metabólicamente a la población, y se les determinó además la sensibilidad a la insulina, así como la respuesta en la secreción de insulina, utilizando el modelo de abordaje mínimo. En sus resultados reportaron 2 nuevas mutaciones sin sentido encontradas en el exón 4 del gen *HNF4A* (Asp126His/Tyr y Arg154Gln) y una en el gen *HNF1A* (Gln486 codón de paro) que generaba una proteína trunca. Sin embargo ninguna de las variantes reportadas las asociaron con el desarrollo de la enfermedad, ya que estos

polimorfismos se encontraron presentes en un porcentaje bajo en la población estudiada.

Damcott *et al.*, en 2004. Estudió la asociación de 6 polimorfismos del gen *HNF4A* (rs1884614 G>A, rs2425637G>T, rs2425640 G>A, rs3212183 T>C, rs1028583 G>T, rs3818247 G>T) en la región de los promotores 1 y 2; en una población de familias menonitas de Pensilvania; con el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 ó intolerancia a la glucosa. Ellos Reportaron haber encontrado asociación significativa entre el polimorfismo rs2425640 G>A ubicado río arriba del promotor P1 y la diabetes tipo 2 (odds ratio [OR] = 1,60, p= 0,03), y mencionaron también que el polimorfismo rs1884614 G>A presente en el promotor 2 presentaba asociación limitada (OR=1.40, p=0.09) con el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 , concluyendo entonces con ello que estos 2 polimorfismos en los promotores P1 y P2 de *HNF4A* incrementaban el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2.

Love-Gregory *et al.*, 2004. En población Judía Ashkenazi estudió los polimorfismos de *HNF4A* en una zona que comprendía alrededor de 78 Kb, la cual incluía las regiones regulatorias y codificantes del gen; evaluando la asociación de estos polimorfismos con el riesgo a desarrollar diabetes tipo 2. De los polimorfismos estudiados se reportaron 2 de ellos asociados al riesgo a desarrollar diabetes en esta población: el polimorfismo rs3818427 G>T ubicado en un intrón en el extremo 3´ del gen (OR=1.49, p=0.0028) y el polimorfismo rs1884614 G>A localizado ~3.9 Kb río arriba del promotor P2 (OR= 1.45, p=0.078).

Silander *et al.*, 2004. Estudió, en individuos provenientes de familias afectadas con diabetes tipo 2, en población Finlandesa, las variantes genéticas de *HNF4A* que predispusieran al desarrollo de la enfermedad. De los 291 polimorfismos estudiados, reportaron con asociación significativa y fuertemente vinculado al desarrollo de diabetes tipo 2 al polimorfismo rs2144908 G>A ubicado 1.3 kb río abajo del promotor P2 de *HNF4A* en las células- β (OR=1.33, p=0.011) y a 8 polimorfismos más ubicados en las regiones de los promotores P2, P1 y en los exones 1-3: rs1884613 C>G (OR=1.34, p=0.014), rs1884614 C>T (OR=1.31, p=0.017), rs6031551 T>C (OR=0.79, p=0.030), rs6031552 C>A (OR=0.77, p=0.15) rs2425637 G>T (OR=1.23, p=0.014), rs2425640 G>A (OR=0.82, p=0.021), rs3212183 (T>C) (OR=1.20, p=0.040) y rs1885088 G>A (OR=1.37, p=0.017). como asociados al riesgo de desarrollar la enfermedad en esta población.

Andrulionyté *et al.*, 2005. Llevó a cabo un estudio longitudinal en población Europea (Daneses, Austriacos, Españoles, Suecos, Noruegos, Finlandeses, Alemanes y Judíos Ashkenazi). Con el objetivo de evaluar si 8 polimorfismos del gen *HNF4A*: 3 cercanos a la zona del promotor P2 y 5 en las regiones intragénicas del gen estaban asociados a la conversión a Diabetes mellitus tipo 2 y con la finalidad de prevenir la Diabetes mellitus No Insulinodependiente (STOP-NIDDM) en las poblaciones mencionadas, en el estudio fueron incluidos sujetos con intolerancia a la glucosa (IGT). De los Ocho SNPs estudiados y analizados por equilibrio de ligamiento se reportó al haplotipo conformado con tres de ellos en la región del promotor P2 altamente asociados al riesgo de desarrollar la enfermedad (rs4810424 G>C, rs1884614 C>T y rs2144908 G>A) ($D' > 0.97$, $r^2 > 0.95$ y de estos solo el polimorfismo rs4810424 G>C en las mujeres portadoras del alelo C el alelo menor o menos frecuente (MAF) presentaron un riesgo elevado

(OR=1.7, 95% [IC]=1,09-2,66, p = 0,020) para la conversión a la diabetes tipo 2 en comparación con las mujeres que no lo presentaban y que tenían el alelo común G; esta asociación sin embargo no fue detectada en los hombres. De sus resultados ellos concluyeron que la conversión a Diabetes mellitus tipo 2 depende del número de alelos de riesgo en los diferentes haplotipos y que los polimorfismos y haplotipos de *HNF4A* predisponían a la diabetes mellitus tipo 2 solo en sujetos de sexo femenino de las poblaciones analizadas en el estudio STOP-NIDDM.

Bagwell *et al.*, 2005. En un estudio de casos (n=300) y controles (n=300) en población Caucásica Americana con diabetes tipo 2 y con enfermedad renal en estado terminal, determinaron la asociación de 23 polimorfismos del gen *HNF4A* a la susceptibilidad de desarrollar la enfermedad. Ellos estudiaron los polimorfismos (rs2868093 T>C, rs4810424 C>G, rs1884613 G>C, rs1884614 T>C, rs2144908 A>G, rs6073418 T>C, rs2425637 G>T, rs717248 G>A, rs717247 G>A, rs2425640 A>G, rs736820 A>G, rs736822 T>A, rs736824 G>A, rs745975 A>G, rs736823 A>G, rs1885088 A>G, rs1885089 T>C, rs3212198 C>T, rs1028583 G >T, rs1028584 A<C, rs2273618 T>C, rs3818247 T>G, rs911358 T>A). En sus resultados reportaron que ninguno de los 23 polimorfismos individualmente presentó asociación con la enfermedad, sin embargo en el análisis de desequilibrio de ligamiento de dos bloques de seis polimorfismos, uno que abarcaba la región del P2 (rs2868093, rs4810424, rs1884613, rs1884614, rs2144908 y rs6073418) y el otro que comprendía las regiones intrónicas de los exones 2 al 8 (rs1885088, rs1885089, rs3212198, rs1028583, rs1028584, rs2273618), se presentaron diferencias significativas entre los haplotipos poco comunes de individuos diabéticos y sujetos no diabéticos: haplotipos TCCTAC (2.4% de los casos y 0% de los sujetos de control) y CGGCGT (2.2% de los casos y 0% de los sujetos de control). Por lo que ellos

sugirieron que la diabetes tipo 2 ligada a *HNF4A* era una enfermedad heterogénea donde diferentes poblaciones pueden tener diferente susceptibilidad a la diabetes tipo 2.

Muller *et al.*, 2005. En un estudio de casos y controles realizado en Indios Pima de Estados Unidos, con la finalidad de investigar si *HNF4A* era un gen de susceptibilidad a diabetes tipo 2 en esta población, genotipificaron 19 polimorfismos (entre ellos la variante rs1800961 C>T) tanto en las regiones cercanas a los promotores P2, P1, como en la región codificante del gen, determinándose por un análisis de asociación si estos influían o no en la aparición de la enfermedad. El grupo de investigadores reportó tres polimorfismos en *HNF4A* (rs3212183 T>C [OR=1.34, p=0.009] y rs2071197 A>G [OR=1.34, p=0.008] localizados en el exón 3 y 1 respectivamente, y uno: rs6031558 G>C [OR=3.18, p=0.04], 1.5 kb río abajo del promoter P2 como polimorfismos modestamente asociados al desarrollo de diabetes tipo 2 entre los Indios Pima. Concluyendo que los polimorfismos de *HNF4A* no parecían ser los principales determinantes para el desarrollo de diabetes tipo 2 en esta población, pero que podrían desempeñar un papel secundario en la susceptibilidad a diabetes tipo 2 en estos Nativos Americanos.

Lehman *et al.*, 2007. En población Mexicoamericana, con el objeto de determinar si algunas variantes de *HNF4A* afectaban el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 en Mexico-Americanos; examinaron 8 polimorfismos (4 rodeando al promotor 2 P2 y 4 en la región codificante del gen) en un bloque de haplotipos del gen *HNF4A*, en una cohorte de México-Americanos con diabetes tipo 2 (n=188) e individuos no diabéticos (n=509); evaluando su asociación con la diabetes tipo 2. En sus resultados reportaron evidencia de asociación de los Polimorfismos (rs1884613 G>C y rs2144908 A>G)

localizados en la región del promotor P2 con el desarrollo de diabetes tipo 2 (RR=1.31, p= 0.003) Estos resultados sustentaron la posibilidad de que un polimorfismo o polimorfismos en la región del promotor P2 de *HNF4A*, contribuían a la susceptibilidad a la diabetes tipo 2 en muchos grupos étnicos incluyendo los México-Americanos

II.2.-Frecuencia de aparición del SNP rs1800961 C>T de *HNF4A* en poblaciones no diabéticas a nivel mundial (HapMap).

De las variantes polimórficas que se han asociado al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 entre las diversas poblaciones, el polimorfismo rs1800961 C>T del gen *HNF4A* se ha vinculado al riesgo de desarrollar esta enfermedad; presentándose en alta frecuencia en pacientes diabéticos en algunas poblaciones (Zhu *et al.*, 2003, Ek *et al.*, 2008, Menjívar *et al.*, 2008), sin embargo esta variante se ha reportado también en población general (poblaciones no diabéticas) aunque con menor frecuencia, variando la distribución de las frecuencias de aparición del alelo menor (MAF) o alelo no común T de la variante, así como las frecuencias genotípicas de este polimorfismo en las diversas poblaciones. Los reportes de estas frecuencias han sido registradas en el Mapa de Haplotipos Internacional (Hapmap). En este mapa se reportó en población con ascendencia de Mexicanos que radica en los Angeles California MEX (M): la frecuencia del alelo menor (MAF) de 0.010 y la frecuencia genotípica del heterocigoto (C/T)=0.020. En población residente en Utah pero con ancestros del norte y oeste de Europa CEU (C), la frecuencia del alelo menor (MAF) fue de 0.036 y la frecuencia genotípica del heterocigoto (C/T)=0.071. En los Chinos Han de Beijing CHB (H), la frecuencia del alelo menor (MAF)= 0.012, y la frecuencia genotípica del heterocigoto

(C/T)=0.024. En Chinos que viven en Denver, Colorado CHD (D): la frecuencia del alelo menor (MAF)=0.029 y la frecuencia genotípica del heterocigoto (C/T)=0.059. En

Tabla 5. Distribución de la frecuencia genotípica de la variante rs18000961 reportada en el Hapmap (Tomado de http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04930 11 de octubre 2010).

INFORMACIÓN DEL SNP		refSNP rs1800961 con alelos C/T																		
LOCALIZACIÓN GENÓMICA		Chr 20:42475778..42475778, cadena (+) en relación a la secuencia humana de referencia																		
REPORTE DE FRECUENCIA		Frecuencia de genotipos									Frecuencia de alelos									
Población		Alelo de Ref			Otros alelos			Alelo de Ref			Otros alelos			Total			Total			
		genotipo	frec	conteo	genotipo	frec	conteo	genotipo	frec	conteo	Total	alelo	frec	conteo	alelo	frec	conteo	Total	genotipos recuperados	
ASW (A)	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	genotipos recuperados
CEU (C)	C/C	0.929	104	C/T	0.071	8	T/T	0	0	112	C	0.964	216	T	0.036	8	224	genotipos recuperados		
CHB (H)	C/C	0.976	82	C/T	0.024	2	T/T	0	0	84	C	0.988	166	T	0.012	2	168	genotipos recuperados		
CHD (D)	C/C	0.941	80	C/T	0.059	5	T/T	0	0	85	C	0.971	165	T	0.029	5	170	genotipos recuperados		
GIH (G)	C/C	0.955	84	C/T	0.045	4	T/T	0	0	88	C	0.977	172	T	0.023	4	176	genotipos recuperados		
JPT (J)	C/C	0.988	85	C/T	0.012	1	T/T	0	0	86	C	0.994	171	T	0.006	1	172	genotipos recuperados		
LWK (L)	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	genotipos recuperados
MEX (M)	C/C	0.980	49	C/T	0.020	1	T/T	0	0	50	C	0.990	99	T	0.010	1	100	genotipos recuperados		
MKK (K)	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	sin	genotipos recuperados
TSI (T)	C/C	0.977	86	C/T	0.023	2	T/T	0	0	88	C	0.989	174	T	0.011	2	176	genotipos recuperados		
YRI (Y)	C/C	1.000	60	C/T	sin	0	T/T	0	0	60	C	1.000	120	T	0	0	120	genotipos recuperados		

Nota: Alelo de referencia observado como base en la secuencia genómica de estas poblaciones

Nota: ASW(A): ascendencia africana en el suroeste de estados unidos, CEU (C): Residentes de Utah con ancestros del norte y oeste de Europa de la colección de CEPH, CHB(H):Chinos Han de Beijing CHD(D): Chinos en Denver, Colorado, GIH(G): Indios gujarati en Houston Texas, JPT(J): japoneses en Tokio japon, LWK(L): Luhya en Webuye Kenia, MEX(M): Ascendencia de mexicanos en los angeles California, MKK(K): Massai en Kinyawa Kenia, TSI(T): Toscanos en Italia, YRI(Y): Yorubas en Ibadan Nigeria

los Indios Gujarati en Houston Texas GIH (G): la frecuencia del alelo menor (MAF)=0.023 y la frecuencia genotípica del heterocigoto (C/T)=0.045. En Japoneses de Tokio JPT (J): la frecuencia del alelo menor (MAF)=0.006 y la Frecuencia genotípica del heterocigoto (C/T)=0.012. En Toscanos de Italia TSI (T): la frecuencia del alelo

menor (MAF)=0.011 y la frecuencia genotípica del heterocigoto (C/T)=0.023. En población Yoruba de Ibadán Nigeria YR I (Y): la frecuencia del alelo menor (MAF) fue de cero y no se reportó la frecuencia genotípica del heterocigoto (C/T). En todas las poblaciones reportadas en el Mapa de Haplotipos Internacional, el alelo poco común, raro o menor (T) de esta variante se presentó con las menores frecuencias entre los Yorubas (MAF=0) y Japoneses (MAF=0.0069), y en ninguna de las poblaciones reportadas por el HapMap se registró el homocigoto del alelo raro (T/T), pues su frecuencia genotípica fue de cero en todas las poblaciones (Tabla 5).

II.3.-Frecuencia del SNP rs1800961 C>T de *HNF4A* asociado a DM2 en diferentes poblaciones.

El polimorfismo rs1800961 C>T del gen *HNF4A* asociado al riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 en diferentes poblaciones ha sido descrito en varios estudios, entre los que podemos citar a:

Zhu *et al.*, 2003. Realizó un estudio de casos y controles en población Japonesa con la finalidad de determinar si el polimorfismo T130I ó T139I (rs1800961 C>T) en los estudios actuales, se asociaba al desarrollo de diabetes tipo 2 en esta población, evaluando además, mediante el análisis de un gen reportero, la capacidad de transactivación de T130I en *HNF4 α* . Trabajaron con 423 pacientes Japoneses con diabetes tipo 2 y 354 sujetos no diabéticos, reportando que la variante rs1800961 C>T, presentaba al genotipo C/T (T130I) en mayor frecuencia en los pacientes diabéticos tipo2 (0.035=3.5%) (OR 4.3, p = 0,015, IC 95%: 1.24-14.98) que en los sujetos no diabéticos (0.008=0.8%), y que la actividad transcripcional de la proteína *HNF4 α* con el

polimorfismo T130I, no se había visto afectada, pero que se había reducido un 46.2% en comparación con la proteína HNF4 α que no presentaba la variante. Por lo que ellos concluyeron que el polimorfismo rs1800961 C>T generaba una proteína HNF4 α (I130) con pérdida de función en los hepatocitos y que este polimorfismo podría estar involucrado en el desarrollo de diabetes tipo 2 en la población Japonesa.

Ek *et al.*, 2008. En un estudio de casos (n=1409) y controles (n=4726) en población Danesa blanca, examinaron si dos variantes sin sentido (rs1800961 C>T) T130I y V255M de la región codificante del gen *HNF4A* estaban asociadas al riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 o a rasgos prediabéticos en individuos tolerantes a la glucosa, evaluaron además mediante estudios *in vitro* en células COS7 el potencial de transactivación de estos polimorfismos. En sus resultados reportaron que el alelo raro T de la variante rs1800961 C>T (T130I) estuvo asociada significativamente a un mayor riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2, pues se presentó con mayor frecuencia entre los pacientes con DM2 (C/T=4.2%) que en los sujetos tolerantes a la glucosa (C/T=3.4%) [OR= 1,26, p = 0,04] y en los ensayos de transactivación se observó una disminución significativa de la proteína HNF4 α con la variante Thr130Ile así como de la proteína con la variante Val255Met en comparación con la proteína no alterada (wildtype). Por lo que concluyeron que el polimorfismo rs1800961 C>T (T130I) se asociaba al desarrollo de DM2 en esta población, y que ambos polimorfismos rs1800961 C>T (T130I) y Val255Met disminuían la actividad transcripcional de *HNF4 α* .

Sookoian *et al.*, 2010. En un estudio observacional de un metanálisis de 1457 reportes, en donde se incluyeron 49,577 individuos, (22,920 casos y 26,657 controles) divididos

en tres bloques, evaluaron la influencia de los polimorfismos de *HNF4A* y el riesgo a desarrollar Diabetes mellitus tipo 2. Reportando 3 SNPs de la región del promotor P2, así como dos SNP's intrónicos (rs4810424: OR=1,080, p<0,03 y rs3212183: OR=0.843, p <0,00009) y un polimorfismo de la región codificante el rs1800961C>T (OR= 0.770, 95%CI=0.595-0.995, p <0.05). con asociación significativa al riesgo de desarrollar DM2, por lo que concluyeron que estas variantes en *HNF4A* están implicadas en la aparición de DM2.en este estudio.

Recientemente se ha comenzado a estudiar la presencia del polimorfismo de la variante rs 1800961 en población Mexicana.

Domínguez-López *et al.*, 2005. En un grupo de investigadores encabezado por la Dra Tusié-Luna, evaluaron en pacientes mexicanos con diagnóstico de diabetes de inicio precoz, provenientes de 23 familias, incluyendo cinco con herencia autosómica dominante, la contribución de los polimorfismos de 4 genes responsables de MODY (*HNF1*, *IPF-1* y *NEUROD1 HNF4A*) a la etiología de la diabetes. En sus resultados ellos no detectaron ningún polimorfismo en la región codificante de *HNF4A*, que se asociara a la enfermedad y solo reportaron un polimorfismo en el intrón 2 del gen *HNF4A* (IVSnt -4 C>T) que no presentaba asociación significativa con el riesgo a desarrollar diabetes. Tampoco detectaron ningún otro polimorfismo en los genes *IPF-1*, o *NEUROD1* en ninguna de las familias estudiadas y solo reportaron una variante en el gen *HNF1A* que cambia el aminoácido Prolina por Histidina en la posición 379 (P-379H) de la proteína HNF1 α , la cual demostraron reduce el potencial de transactivación de la proteína mutante en el promotor del gen humano de la insulina. Por lo que concluyeron que salvo el polimorfismo que cambia P379H y reduce el

potencial de transactivación de HNF1a sobre el gen de la insulina, no había en la población estudiada ningún polimorfismo asociado al riesgo de desarrollar diabetes y que las anomalías en los genes MODY generalmente no son una causa común de la diabetes de establecimiento temprano en las familias mexicanas.

Rodríguez-Trejo *et al.*, 2006. Reportó en un estudio realizado a 100 jóvenes Mexicanos no diabéticos, de la Facultad de Química de la UNAM, con edades de 18 a 22 años, que presentaron sobrepeso e hiperlipidemia una alta frecuencia del genotipo C/T (0.13=13%) de la variante rs1800961 (Thr130Ile), porcentaje significativamente superior al que se había reportado en un estudio anterior realizado por el mismo grupo de investigadores, en sujetos sanos sin antecedentes de diabetes mayores de 50 años, aunado al hallazgo molecular ellos encontraron una alta frecuencia de hiperlipidemia y sobrepeso en esa población de jóvenes (factores considerados como de riesgo para desarrollar diabetes), así como una relación directamente proporcional entre las concentraciones de glucosa y la edad o el IMC, los cuales tendían a incrementarse en los alumnos de mayor edad; por lo que concluyeron que esta variante se encontraba en alta frecuencia en la población de jóvenes mexicanos y que asociada a las condiciones de sobrepeso y dislipidemia predisponía a la población a padecer Diabetes mellitus tipo 2 de aparición temprana.

Granados-Silvestre *et al.*, 2006 del grupo de la Dra. Menjívar. Investigó la presencia de la mutación T130I del gen *HNF-4A* en dos poblaciones indígenas Mexicanas no diabéticas, ya que ésta mutación se había reportado en un estudio previo realizado por el mismo grupo de investigación, con una alta frecuencia en mestizos mexicanos

diabéticos, argumentando que en poblaciones multiétnicas existen grupos dentro de la misma población, con una alta prevalencia al desarrollo diabetes que el mismo grupo étnico que vive en su país de origen, y eso sugería que algunas poblaciones tenían un fondo genético que las hacía más susceptibles a desarrollar diabetes. En ese estudio se evaluaron a: 93 Mazahuas del Estado de México y 73 Teenek de San Luis Potosí, así como un grupo de 75 individuos mestizos Mexicanos como control, hicieron el análisis molecular mediante PCR-RFLP y una enzima, para determinar la frecuencia de la variante Thr130Ile. Midieron varios parámetros bioquímicos como: glucosa, colesterol, colesterol-HDL, triglicéridos, insulina y péptido C y registraron algunas medidas antropométricas. En sus resultados reportaron una frecuencia de aparición de la mutación T130I del gen *HNF4A* en población Mazahua de 6.45% y en Teenek de 11.4% mencionando que estas frecuencias habían sido muy altas, comparadas con las que se presentaron en poblaciones de individuos no diabéticos provenientes de Japón 0.8%, Dinamarca 6% e incluso de los mismos Mestizos mexicanos 5.3% que habían formado parte de este estudio, concluyendo entonces que estas altas frecuencias en las dos poblaciones indígenas estudiadas planteaban la existencia de un fondo genético propio de los grupos autóctonos Mexicanos, que contribuía a la aparición de diabetes en población mestiza Mexicana.

Velueta-Vázquez *et al.*, 2006. Realizó un estudio en población indígena Mexicana, en 2 comunidades de la etnia Chontal en el estado de Tabasco con el objetivo de identificar polimorfismos en los exones 4 y 7 de los genes *HNF1A* y *HNF4A* que estuvieran asociados al desarrollo de MODY, así como evaluar si los cambios en la alimentación entre ambas etnias influían en la expresión de la diabetes tipo MODY en ambos grupos. Muestrearon un total de 35 pacientes adultos jóvenes de 20 a 40 años, y

se les hicieron mediciones de algunos parámetros bioquímicos como glucosa posprandial y hemoglobina glicada, realizaron amplificaciones de los exones 4 y 7 y secuenciaron los amplicones de ambos genes, en sus resultados reportaron haber encontrado solo variantes polimórficas en el gen *HNF1A* que estaban asociadas con desarrollo de MODY3 en esas poblaciones, y ningún polimorfismo en el gen *HNF4A* que pudiera asociarse con el riesgo de MODY1 .

Menjívar *et al.*, 2008. Con el objetivo de evaluar la contribución de las variantes genéticas de *HNF4A* a la patogénesis de la diabetes tipo 2 de inicio temprano en población Mexicana, llevó a cabo un estudio de toda la región codificante del gen, mediante PCR-SSCP y análisis de secuencia, en muestras de sangre periférica obtenidas de 100 pacientes con diabetes tipo 2, no obesos menores, de 35 años (casos), reclutados en el Hospital Juárez de la Ciudad de México y en 75 sujetos no diabéticos (controles). Reportando en sus resultados, una alta frecuencia genotípica del polimorfismo rs1800961 C>T (T130I) de *HNF4A* en pacientes con diabetes tipo 2 (C/T=16%) y una frecuencia menor en los individuos no diabéticos (C/T=5.6%), además que los portadores del genotipo heterocigoto C/T de esta variante estaban asociados a un riesgo mayor y estadísticamente significativo de desarrollar diabetes tipo 2, en comparación a los individuos no portadores (OR=3.38, 95% CI=1.14-10.03, p=0.028.), aunado a esto reportaron haber encontrado la mayor frecuencia alélica del alelo de riesgo T (8%) de esta variante (I130), en población Mexicana en comparación a otras poblaciones a nivel mundial. Concluyendo entonces que la alta frecuencia del alelo de riesgo T de la variante rs1800961 C>T (T130I) se asociaba significativamente al riesgo

de desarrollar Diabetes tipo 2, y que esta variante juega un importante papel en la patogénesis de DM2 en población Mexicana.

La contribución de *HNF4A* en la diabetes tipo 2 es motivo de controversia. Por lo reportado en los estudios anteriores sabemos que existen variantes localizadas en el promotor de *HNF4A* que se han sido asociadas consistentemente con un riesgo mayor de desarrollar diabetes tipo 2 en diferentes poblaciones y que hay un par de estudios donde se menciona que la variante rs1800961 (T139I ó T130I como se reportaba en los primeros estudios), se presenta con alta frecuencia en población mestiza Mexicana contribuyendo de manera importante con un mayor riesgo para desarrollar diabetes mellitus tipo 2. A la fecha existe cierta controversia en relación a este último punto pues los estudios realizados en nuestra población sobre esta variante no han sido consistentes, sin embargo con base en los estudios realizados por la Dra Menjivar *et al.*, 2008 este estudio fue llevado a cabo con la finalidad de utilizar al polimorfismo rs1800961 C>T (T139I) como un factor pronóstico para determinar el riesgo a desarrollar diabetes mellitus tipo 2 en población Mexicana.

III.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Ya se ha planteado que la aparición y desarrollo de la DM tipo 2 está determinada por múltiples factores y según los antecedentes en otras poblaciones y en población Mexicana, uno de estos factores asociados al desarrollo de esta enfermedad es el polimorfismo (rs1800961 C>T) que se presenta con alta frecuencia en mexicanos afectados por la DM2. Este polimorfismo se ha ubicado en la región codificante del gen *HNF4A* y su producto proteico regula la expresión de muchos genes hepáticos involucrados en el metabolismo de la glucosa, sin embargo los estudios anteriores en nuestra población no han sido concluyentes, existiendo controversia en relación a la frecuencia con que se presenta este polimorfismo en población Mexicana no diabética y en población con diabetes, de tal forma que nos preguntamos si era posible utilizar a este polimorfismo como un marcador pronóstico de DM2, estableciendo ¿Cuál era la frecuencia de aparición de la variante rs1800961 C>T del exón 4 del gen *HNF4A* en pacientes con Diabetes mellitus tipo 2 y en individuos no diabéticos en una población captada en la Clínica de Especialidades Médicas y en el Hospital Central Militar y si existía diferencia significativa en la frecuencia de esta variante, en ambos grupos , que nos permitiera asociarla a un riesgo de desarrollar DM2?.

IV.-JUSTIFICACIÓN

De lo anteriormente expuesto sabemos que la DM 2, afecta a 200 millones de personas en el mundo y se calcula que alcanzará los 333 millones en 2025. Recayendo la mayoría en países en desarrollo. Se sabe que esta enfermedad se presenta con gran frecuencia en México y que nuestro país ocupa el noveno lugar de diabetes a nivel mundial, presentándose con una prevalencia nacional de 14% en rangos de edad de 20 a 69 años. Esta alta prevalencia en México genera a nuestros sistemas de salud altos costos de atención que de acuerdo a los estimados del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), el gasto anual por diabetes en nuestro país se calcula en un 4.7% del gasto público, destinado a la Secretaría de salud (38 millones de dólares). Por otra parte, la OMS afirma que una reducción de las enfermedades crónicas a nivel mundial proveería de un ahorro de 1000 millones de dólares en los próximos 10 años. De tal forma que el impacto negativo en la economía de México aunado a la alta morbimortalidad generada por los trastornos metabólicos en los individuos con este padecimiento, puede verse atenuado si logramos identificar a tiempo a los grupos de alto riesgo y/o afectados por la enfermedad. Por ello se buscó evaluar la frecuencia de esta variante en la población de diabéticos que eran atendidos en la Clínica de Especialidades Médicas y del Hospital Central Militar con el fin de estudiar, si existía asociación entre la presencia del polimorfismo y el inicio y progreso de la enfermedad y que esto a su vez nos sirviera posteriormente como un marcador pronóstico para tomar medidas terapéuticas y preventivas que nos permitieran no solo abatir la mortalidad y mejorar la calidad de vida de las personas en riesgo, sino disminuir los grandes costos de atención que este tipo de padecimientos han representado para nuestros sistemas de salud.

V.-HIPÓTESIS

Se presenta una frecuencia mayor del alelo de riesgo de la variante polimórfica rs1800961 del gen *HNF4A* en los pacientes diabéticos, que en los individuos no diabéticos.

VI.-OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia de la variante polimórfica rs1800961 del gen *HNF4A* en un grupo de población mexicana con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 y en un grupo de individuos no diabéticos.

VI.1.-OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener los datos clínicos y antropométricos de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (casos) e individuos no diabéticos (controles).
2. Generar un banco de DNA a partir de muestras de las poblaciones en estudio.
3. Amplificar por PCR la región del gen *HNF4A*, donde se localiza el polimorfismo rs1800961 C>T.
4. Determinar la presencia y frecuencia del polimorfismo T139I (rs1800961 C>T) del gen *HNF4A* en los casos y controles
5. Evaluar si la frecuencia genotípica de cada grupo, cumplía con el equilibrio de Hardy-Weinberg.
6. Establecer si existía asociación entre la frecuencia de aparición del polimorfismo rs1800961 C>T y el riesgo de desarrollar Diabetes Mellitus tipo 2 en la población estudiada. Mediante la Odds ratio.
7. Determinar si había asociación entre los parámetros clínico-antropométricos estudiados y la presencia o ausencia del polimorfismo.

VII.-MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo es un estudio: Observacional, transversal, retrospectivo y prospectivo, de casos y controles realizado en el Laboratorio Multidisciplinario de investigación de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad en Colaboración con la Escuela Superior de Medicina.

Grupo de estudio

El trabajo formó parte de un proyecto que se inició en la Escuela Militar de Graduados de Sanidad para el estudio de la Diabetes mellitus tipo 2 y su asociación con el Factor Hepatocítico Nuclear 4 alfa en el año 2008. En ese año se captaron en el período, de enero a agosto del 2008, 60 muestras de individuos diabéticos que integraron nuestro Grupo de Casos; en el que se incluyeron pacientes hombres y mujeres, (derechohabientes de personal militar que fueron atendidos en esas instituciones) con edades de 18 a 80 años, con diagnóstico de Diabetes mellitus tipo 2 (Casos), determinados según los criterios de la Asociación Americana de diabetes (ADA) por el personal de médicos de la Unidad de Especialidades Médicas y del Hospital Central Militar de la SEDENA ubicados en la ciudad de México. El Grupo de individuos no diabéticos (Grupo Control) fue pareado por sexo con el grupo de casos quedando integrado por 60 sujetos no diabéticos sin antecedentes familiares de diabetes seleccionados de población abierta (estudiantes, y empleados que laboran en la Escuela Militar de graduados de sanidad, así como derechohabientes del personal militar que acudieron a chequeos de rutina en la Clínica de Especialidades Médicas y en el Hospital Central Militar), que decidieron participar en el estudio de forma voluntaria. La toma de muestras de los individuos de este grupo se realizó en el periodo comprendido de enero a octubre del 2010. A ambos grupos en su momento se les explicaron las características y objetivos del estudio, así como los procedimientos

implicados en el mismo. Los pacientes participantes firmaron hoja de consentimiento informado aprobado por el comité de ética de la Clínica de Especialidades Médicas y del Hospital Central Militar, los que permitieron tomar los datos de las variables clínicas y antropométricas consignadas en los expediente clínicos que se guardan en la Clínica de Especialidades Médicas y del Hospital Central Militar de la SEDENA para el caso del grupo de pacientes diabéticos; y de forma verbal para el llenado de los cuestionarios (en el caso del grupo control).

Los datos clínicos y antropométricos que se incluyeron en nuestro estudio fueron mediciones de Glucosa (mg/dl), Índice de masa Corporal IMC (Kg/m^2), Edad (años) , Sexo, Antecedentes familiares de diabetes, y lugar de origen de los pacientes. En el caso del grupo control, las variables de Glucosa, Estatura y peso para el cálculo del IMC, fueron determinados por medio de un Glucómetro ONE TOUCH ultra2 de Jhonson and Jhonson y el peso y talla con una balanza y un metro respectivamente. La información obtenida de los pacientes durante el estudio se almacenó en una base de datos de tipo Excel 2007 y se utilizó para los análisis estadísticos posteriores y se mantiene como confidencial por los investigadores participantes.

Los pacientes que se negaron a participar, o aquellos donde el material genético no pudo ser analizado por dificultades técnicas, así como aquellos en los que no se tenían los datos clínicos y antropométricos completos no fueron incluidos en el estudio.

Obtención de las muestras.

De los pacientes diabéticos (Casos) se obtuvo una muestra de 3 ml de sangre periférica por punción venosa colectada en tubos vacutainer con anticoagulante EDTA, transportada en hielo al laboratorio donde fue mantenida en refrigeración a -4°C antes de la extracción de DNA, y a los pacientes no diabéticos (grupo control) se les tomó una

muestra de células epiteliales por raspado bucal con un cepillo, la muestra fue colocada dentro de Tubos Eppendorf de 1.5ml conteniendo PBS 1x los cuales fueron transportados a temperatura ambiente, al laboratorio y almacenados a -4°C hasta la extracción posterior de ADN.

Extracción de DNA).

La extracción de ADN tanto de las muestras provenientes de sangre periférica y de raspado bucal, fue realizada con el paquete comercial DNeasy Blood & Tissue Kit (de QIAGEN), siguiendo los protocolos que establece la casa comercial para cada uno de los tipos de muestra

Una vez hecho lo anterior se cuantificó el material genético, por espectrofotometría a $\lambda=260\text{nm}$ y se corroboró su pureza por medición de la relación $\lambda= 260\text{nm}/280\text{nm}$ empleando para ello el equipo Nanodrop 1000, Thermo Scientific.

La integridad del DNA se evaluó por corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1% teñidos con Bromuro de Etidio.

Amplificación del exón 4 del gen *HNF4A* con el polimorfismo rs1800961 (417 C>T, Tre139 Iso)

Para explorar la variante rs1800961 del gen *HNF4A*., se amplificó la totalidad del exón 4 mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR punto final), empleando los oligonucleótidos (iniciadores) descritos por Aguilar- Salinas *et al*, 2001. (Tabla 6). La región amplificada del gen tiene un tamaño de 272 pares de bases. La alineación de los oligonucleótidos se probó sobre las secuencias [EF591040](#) y NM_000457.3 del gen *HNF4A*, tomadas de la base de datos del GenBank,

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.) (Tablas 1 y 2 del anexo).

Tabla 6. Tamaño del amplicón generado y región de DNA donde alinean los oligos que amplifican el exón 4 del gen *HNF4A*.

Oligonucleótido	FRAGMENTO	SECUENCIA	TAMAÑO	Tm
FORWARD (5' -3')	Exón 4	5'-CCA CCC CCT ACT CCA TCC CTG T-3'	22pb	72°C
REVERSE (5' -3')	Exón 4	5'-CCC TCC CGT CAG CTG CTC CA-3'	20pb	68°C

Amplicón
(272 nt)

FW (5'-3')

**ccacccctactccatccctgttctccctcctcacctctctgtgcctcctcacagccgtccagaaagcgggaccg
gatcagca****c****cgagggtcaagctatgaggacagcagcctgcctccatcaatgcgctcctgcaggcgggtcc
tgtcccagacaggtaccggggtgatcctgccaccacccagggatccccacactacagaggagctcacctcct
ccacctccatttctcccagcc aggccctggagcagctgacggggaggcct**

←

R (3'-5')

Nota: En azul oligo Forward, en rosa oligo Reverse, en verde agua fragmento amplificado, con la ubicación del polimorfismo 417 en rojo.

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

La PCR es una técnica *in vitro* de amplificación directa de un gen o un fragmento de DNA, sencilla, sensible y relativamente rápida, que consiste en combinar en una reacción tanto los iniciadores del sistema que queremos amplificar, como el DNA problema, desoxinucleótidos, enzima Taq-polimerasa, Cloruro de magnesio (como cofactor), y que por medio de ciclos de temperatura repetidos con tres etapas por ciclo (la desnaturalización, la hibridación específica y la elongación), permite obtener varias copias del fragmento problema.

Para obtener las condiciones necesarias de PCR para amplificar el exón 4 del gen (*HNF4A*), se utilizaron como base los oligonucleótidos ya mencionados, descritos por Aguilar-Salinas *et al*, 2001. La Tm se definió por una serie de ensayos por gradiente de

temperatura con una PCR de gradiente. Las concentraciones del Cloruro de magnesio ($MgCl_2$ 50mM de Invitrogen), de la enzima Taq-polimerasa (Taq-polimerase recombinant 5U/ μ l Invitrogen) y de los Des-oxinucleótidos (DNTP's 2mM Invitrogen) fueron definidas por medio de una curva de calibración con diferentes concentraciones de los reactivos. (Tabla 7). Finalmente las condiciones de la mezcla de reacción de la PCR quedaron como se muestra en la tabla 2, ajustándose el volumen final a 25 μ l y a 32 ciclos de amplificación con una temperatura de alineación T_m de 65° C; la incubación de la mezcla se llevó a cabo en el termociclador Gene Amp PCR System 9700 de Applied Biosystems. (Figura 9).

Tabla 7. Mezcla de reacción para la PCR de amplificación (Exón 4 del gen HNF4 α).

CONCENTRACION DEL STOCK	REACTIVO	CONCENTRACION FINAL	HNF4A 1X
10x	BUFFER 10X (Invitrogen)	1x	2.5 μ l
2.0mM	DNTP's 2mM (Invitrogen)	0.2mM	2.5 μ l
5 μ M	PRIMER FORWARD 5 μ M	0.5 μ M	2.5 μ l
5 μ M	PRIMER REVERSE 5 μ M	0.5 μ M	2.5 μ l
50mM	MgCl ₂ 50mM (Invitrogen)	1.5mM	1.5 μ l
5U/ μ l	Taq-Recombinante (Invitrogen)	1.5mM	0.05 μ l
	H ₂ O		11.45 μ l
100ng	<u>DNA (Genómico) (100ng)</u>	<u>100ng</u>	<u>2.0 μl</u>
	Volumen Final		25 μl

96 grados C por 2 minutos 30 segundos, seguidos por:

32 ciclos de:

94 grados C por 30 segundos

65grados C por 30 segundos

72 grados C por 30 segundos

72 grados C por 5 minutos

4 grados C mantenidos

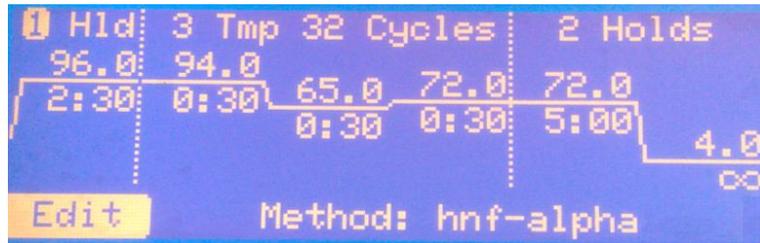


Figura 9. Condiciones de temperatura del programa de amplificación en el termociclador Gene Amp PCR System 9700 de Applied Biosystems.

Electroforesis

Para visualizar directamente la amplificación del fragmento de DNA, los productos de PCR fueron resueltos por electroforesis en una cámara de electroforesis (Horizon 58, Horizontal gel Electrophoresis System de Whatman, Inc.) con TBE 0.5X (Tris-Borato-EDTA) a 120 volts en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio, flanqueados por un marcador de peso molecular de 100 o 123 pb de Invitrogen para verificar su tamaño y observados bajo un transiluminador de luz U.V. (Bio-imaging Systems Transilluminator de Kodak) en una longitud de onda de 254 nm y fotografiados utilizando el fotodocumentador de geles, Gel Logic 100 Imaging System y analizados mediante el sistema procesador de imágenes Kodak molecular imaging Software, Standard Edition.

Limpieza del producto de PCR.

Los productos de PCR contienen restos de oligonucleótidos y desoxinucleótidos que no fueron incorporados durante la reacción y que interfieren en la secuenciación por lo que previo a la realización de la PCR de secuencia es necesario eliminarlos; para ello se llevó a cabo un proceso de limpieza del amplicón mediante una digestión enzimática con la Enzima ExoSap-I de invitrogen. Una enzima con la cual se purifican directamente los fragmentos, mediante un proceso de activación de la enzima a 37° C e inactivación

de la misma a 80° C siguiendo las condiciones descritas por la casa comercial y que se muestran en la tabla 8 y en la figura 10.

Tabla 8. Protocolo de purificación de fragmentos empleando la enzima Exosap I de Invitrogen.

CONCENTRACION DEL STOCK	REACTIVO	Volumen
2U/μl	Exosap I (Invitrogen)	1μl
5μM	Producto de PCR (amplión de DNA)	2.5 μl

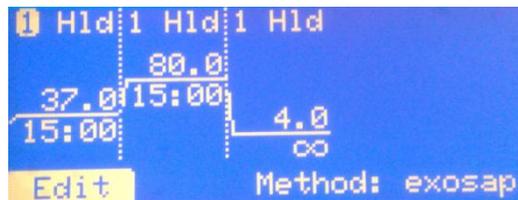


Figura 10. Condiciones de temperatura del protocolo descrito por Invitrogen, para activar la enzima Exosap I. Termociclador empleado, Gene Amp PCR System 9700 de Applied Biosystems.

PCR de Secuencia.

Para la reacción de secuenciación se utilizó el paquete Big Dye terminator V 3.1 de Applied Biosystems. El protocolo para la PCR de secuencia se muestra en la tabla 9 y las condiciones de amplificación en el termociclador en la figura 11.

Tabla 9 Protocolo de PCR de secuencia

CONCENTRACION DEL STOCK	REACTIVO	1X
10x	BUFFER 5X	2.0μl
5 μM	BIG DYE V3.1	1.0 μl
5μM	PRIMER FORWARD 5 μM	1.0 μl
50mM	DNA (PRODUCTO PCR)	2.5 μl

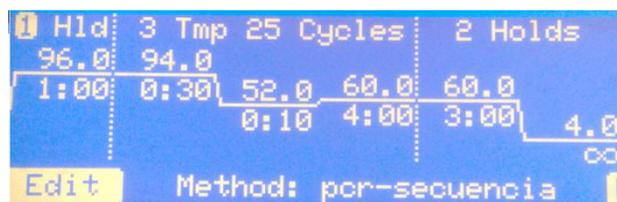


Figura 11. Condiciones de temperatura del protocolo para la reacción de secuencia. Termociclador empleado, Gene Amp PCR System 9700 de Applied Biosystems.

Limpieza del producto de PCR de Secuencia.

Posteriormente los productos de la reacción de secuenciación se purificaron por columnas Centri Sep de Princeton Separations, y se secaron en un concentrador de vacío. Se resuspendió el producto de la reacción con 20 μ l de formamida manteniéndose 3 horas en refrigeración a 4°C. Luego las muestras fueron trasvasadas a una placa de secuencia de 96 pozos colocándose en el termociclador, Gene Amp PCR System 9700 de Applied Biosystems, donde fueron desnaturalizadas a 96°C por 5 min y luego la placa se colocó en hielo por 2 minutos, para detener el proceso de desnaturalización y mantener las 2 hebras de DNA separadas. Las muestras así fueron cargadas en el Secuenciador automático ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer de Applied Biosystems para obtener los electroferogramas.

Obtención de los Electroferogramas y análisis de secuencias.

Una vez procesadas las muestras, se obtuvieron los electroferogramas del secuenciador, mediante el programa SeqAnalysis de Applied Biosystems.

Las primeras secuencias obtenidas se sometieron al Gen Bank para ser analizadas mediante el BLAST de la base de datos de NCBI y saber a qué gen se homologaban, posteriormente solo se compararon con la secuencia (NM_000457.3) del gen *HNF4A*

tomada de la base de datos del Gen Bank, mediante la alineación de todas las secuencias contra esa secuencia consenso, utilizando para ello el programa BioEdit Sequence Alignment Editor.ver. 7.0.4.1, para buscar la presencia o ausencia del SNP de interés en cada una de las muestras.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las bases de Datos se generaron en Microsoft Excel ver. 2007, exportándose los datos para el análisis estadístico a los programas PAST ver. 2.05 y SPSS ver. 10.0 para Windows (SPSS INC. Illinois).

Los datos obtenidos, se ordenaron en tablas y gráficos y fueron descritos con medidas de tendencia central, promedio, y desviación estándar y según el caso con sus correspondientes intervalos de confianza del 95 % (95% CI).

Se determinó si existían diferencias significativas en 3 de los parámetros estudiados (Edad, Índice de masa corporal y Glucosa), entre ambas poblaciones (casos y controles) mediante el estadístico de T de Student, para una prueba de 2 colas con un nivel de significancia del 95% y una $p \leq 0.05$.

Se determinaron las frecuencias genotípicas, por conteo directo que a su vez sirvieron para hacer el estimado de las frecuencias alélicas en cada una de las poblaciones, con la finalidad de establecer si estas se encontraban en equilibrio y si cumplían con la Ley de Hardy-Weinberg, el cálculo se hizo en el programa Popgen versión 1.32 de acceso libre en la red, este mismo programa nos dió los resultados de la prueba de Chi-cuadrada (X^2) para realizar el contraste de hipótesis de la Ley de Hardy-Weinberg.

Para establecer si existían diferencias significativas entre las frecuencias alélicas y genotípicas entre los casos y controles se realizó una prueba de Chi-cuadrada (X^2) de

Mantel-Haenszel, determinándose si se presentaba o no asociación entre la frecuencia del polimorfismo del alelo de riesgo y el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 entre las poblaciones estudiadas (casos y controles), mediante la estimación de la Razón de Momios o Razón de proporciones (RM ó OR) con un intervalo de confianza del 95% (95% CI), y probando la significancia de la asociación OR, mediante la X^2 de Mantel-Haenszel y nivel de significancia (p). Los cálculos para ambas estimaciones se hicieron con el programa STATCALC de EPIINFO Ver 6.0, considerándose significativos los valores de $p \leq 0.05$.

Se determinó si existían diferencias significativas entre los valores de los parámetros clínicos (nivel de glucosa) y antropométricos (edad e índice de masa corporal) de los individuos heterocigotos portadores del alelo de riesgo y los que no lo portaban, tanto intra grupos (Controles con SNP-Controles sin SNP) (Casos con SNP-Casos sin SNP) como combinados los grupos (Casos-controles con SNP-Casos-controles sin SNP) Mediante el estadístico U de Mann-Whitney. Tomándose como significativos los valores de $p \leq 0.05$.

Y finalmente se realizaron regresiones logísticas para estimar la asociación del SNP rs1800961 y los valores de los parámetros clínicos y antropométricos (Glucosa, Índice de masa corporal, y edad), de ambos grupos combinados (no diabéticos-diabéticos vs variables) así como para grupo por separado: (no diabéticos vs variables) y (enfermos vs variables), empleando el programa SPSS ver. 10.0 para Windows (SPSS INC. Illinois).

VIII.-RESULTADOS

Procedencia de las poblaciones estudiadas

Se colectaron un total de 120 muestras; 60 de pacientes con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 (casos) y 60 de individuos no diabéticos (controles). Los pacientes diabéticos en su mayoría eran originarios de los estados del centro y suroeste de la república: Distrito Federal (25%), Oaxaca (15%), Estado de México (13%), Guanajuato, Veracruz (cada uno con un 8%) y Michoacán (7%) (Figuras 12 y 13); en tanto que los individuos no diabéticos procedían tanto del norte, centro y sur de México; principalmente de los estados del: Distrito Federal (35%), Oaxaca (10%), Guerrero (7%) Estado de México y Chiapas (cada uno con un 3%) (Figuras 14 y 15).



Figura 12. Mapa de distribución de los pacientes con DM2, captados en el estudio.

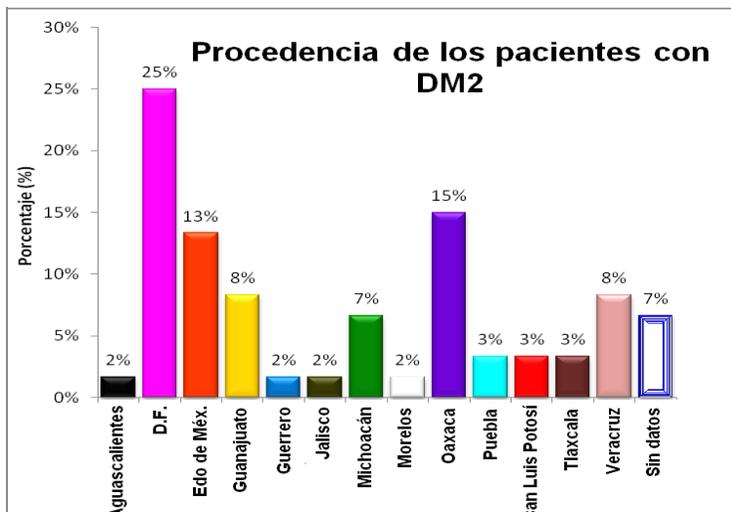


Figura 13. Procedencia por estado de la república de los individuos con DM2 (casos), captados en el estudio.

Figura 14. Mapa de distribución de los individuos no diabéticos, captados en el estudio.

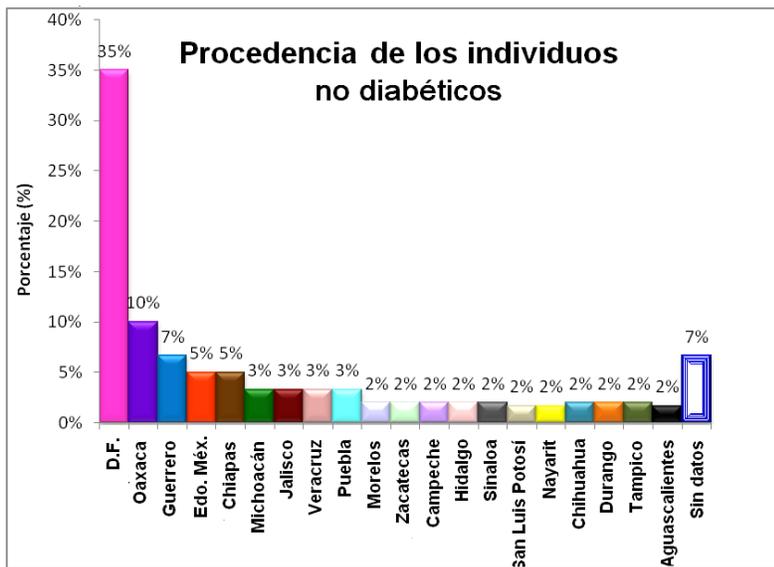


Figura 15. Procedencia por estado de la república de los individuos no diabéticos (controles), captados en el estudio.

Descripción de las poblaciones por género.

De los 120 individuos que conformaron el total de la población captada para el estudio, el mayor porcentaje lo constituyeron las mujeres. Del grupo de los individuos diabéticos (casos), el 73% (n=44) fueron mujeres y 27% (n=14) hombres. Dado que el presente trabajo fue un estudio de casos y controles, pareados por sexo; los individuos no diabéticos que integraron el grupo de controles quedaron constituídos de igual forma, 73% (n=44) fueron mujeres y 27% (n=14) hombres (Figura 16).

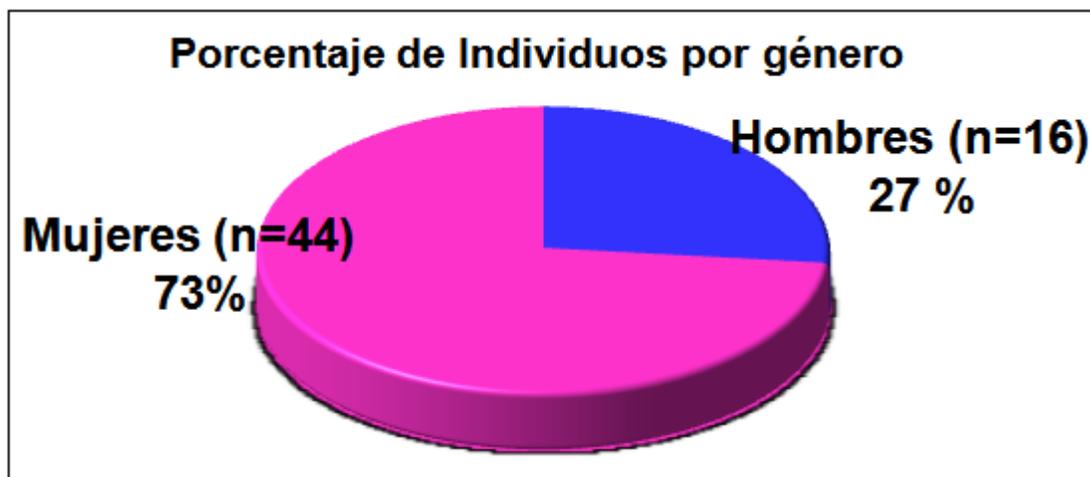


Figura 16. Distribución de los individuos por género en ambos grupos

Parámetros bioquímicos y antropométricos en ambos grupos.

En relación a la edad, los pacientes diabéticos presentaron en promedio 55.78 años \pm 10.44; una edad mayor en relación a los individuos no diabéticos 45.18 \pm 13.50; observándose una diferencia significativa entre ambos grupos; (t=-4.8109; p=0.00000448) (Tabla 10 y Figura 17a); también en términos generales la enfermedad se manifestó a edades más tempranas en las mujeres (53.66 años) que en los hombres (61.63años) (Tabla 11 y Figura 18a).

Tabla 10. Características clínicas y antropométricas entre los pacientes con Diabetes mellitus 2 (casos) y los individuos no diabéticos (control).

Características de la población de estudio				
Variables	Casos n=60 x \pm SD	Controles n=60 x \pm SD	T de student	p
Sexo M/F	16/44	16/44	-----	-----
Edad (años)	55.78 \pm 10.44	45.18 \pm 13.50	-4.8109	0.00000448
IMC (Kg/m ²)	27.96 \pm 3.61	26.74 \pm 5.11	-1.5063	0.1346
Glucosa (mg/dl)	173.33 \pm 109.90	93.37 \pm 8.23	-5.62	0.0000012

p significativa \leq 0.05.

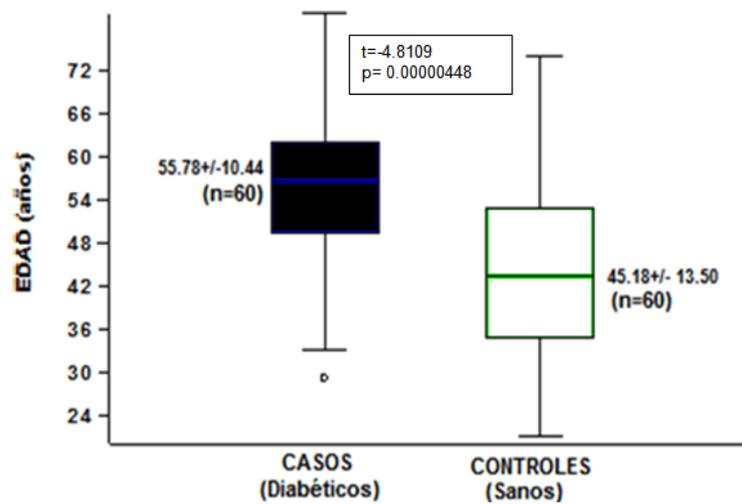
Tabla 11. Características clínicas y antropométricas de los pacientes con DM2 (casos) y los individuos no diabéticos (controles) por género.

	NÚM (n).	EDAD (años)		IMC (kg/m ²)		GLUCOSA (mg/dl)	
		DM2 DIABÉTICOS	NO DIABÉTICOS	DM2 DIABÉTICOS	NO DIABÉTICOS	DM2 DIABÉTICOS	NO DIABÉTICOS
TOTAL	60	55.78± 10.44	45.18± 13.50	27.96± 3.61	26.74± 5.11	173.33± 109.90	93.37±8.23
Hombres	16	61.63± 13.69	45.75± 14.55	26.04± 2.72	26.80± 5.18	188± 188.45	94.07± 8.72
Mujeres	44	53.66± 8.17	44.14± 13.75	28.66± 3.66	26.62± 5.55	168± 63.86	92.14± 7.89

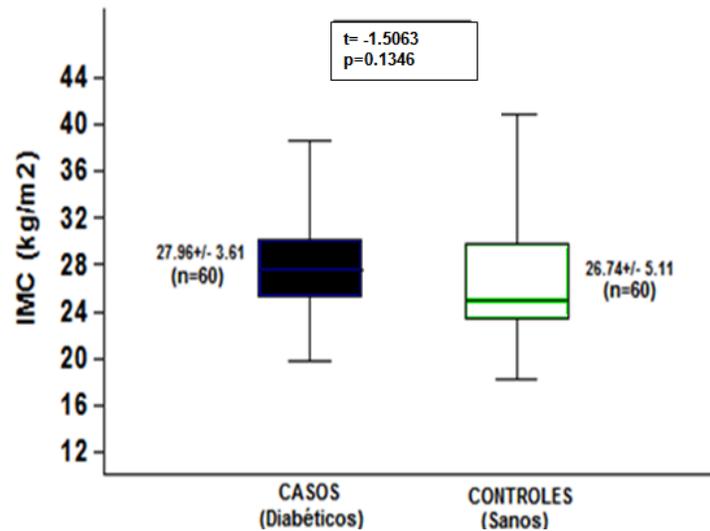
Referente a los índices de Masa corporal se presentaron valores más altos en promedio en el grupo de los individuos diabéticos (27.96kg/m²± 3.61) en comparación con los no diabéticos (26.74 kg/m²± 5.11) y de los primeros las mujeres diabéticas presentaron los mayores índices de masa corporal (28.66 kg/m²), (Tabla 10 y Figura 17b). Sin embargo no se presentaron diferencias significativas entre ambos grupos (t= -1.5063, con una p= 0.1446), y tanto en hombres como en mujeres de ambos grupos (diabéticos y no diabéticos) se presentó sobrepeso sin llegar a obesidad, es decir índices de masa corporal mayores a 25kg/m² pero menores a 29kg/m² según la escala de clasificación de la OMS (Tablas 11 y Figura 18b).

Los niveles de glucosa oscilaron entre (82mg/dl y 873mg/dl) entre los pacientes diabéticos, presentando en promedio un valor de (173.33±109.9), valores que estuvieron fuera de control, por encima de los límites permitidos por la ADA (>130mg/dl glucosa en ayuno), para los individuos bajo tratamiento farmacológico, lo cual indica descontrol metabólico en este grupo. Se apreciaron diferencias significativas en los niveles de glucosa entre ambos grupos (t= -5.62; con una p=0.0000012) (Tabla 10 y Figura 17c). Observándose altos niveles de glucosa en el grupo de los diabéticos en comparación con los no diabéticos (93.37± 8.23). Los niveles de glucosa presentaron una dispersión muy alta entre los mismos individuos, observando que los hombres diabéticos en relación a las mujeres diabéticas, presentaron mayores fluctuaciones en

(a)



(b)



(c)

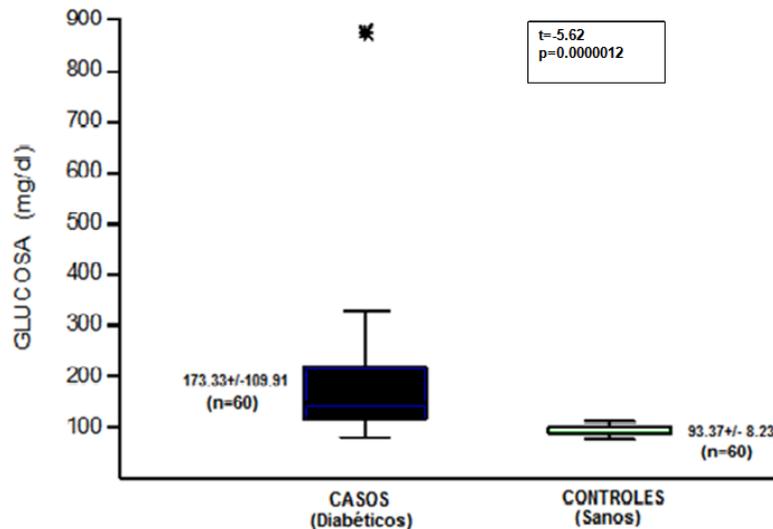


Figura 17. Diferencias de Edad, (a), IMC (b) y Niveles de glucosa (c) entre casos y controles. $p \leq 0.05$

los valores de glucosa y también en ellos se registraron los niveles más altos en promedio (188 ± 188.45) y (168 ± 63.86) en mujeres, respectivamente (Tabla 11 y Figura 18c).

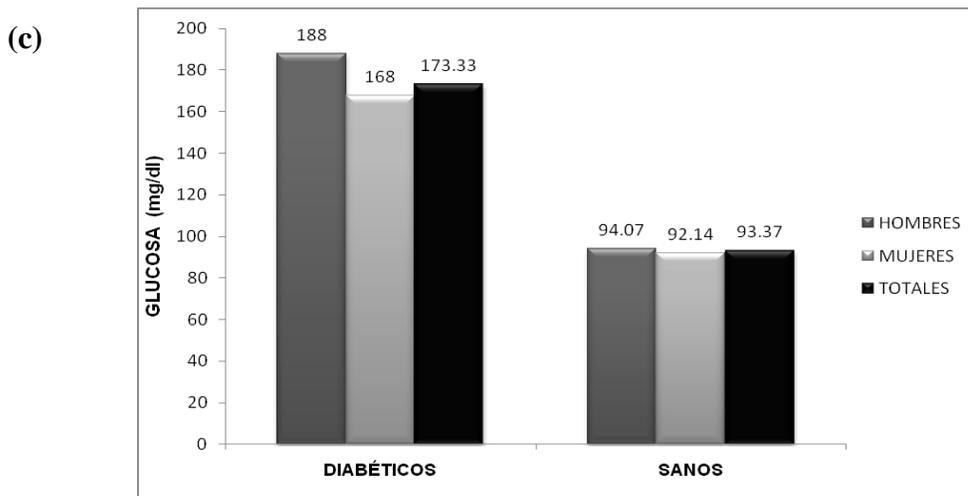
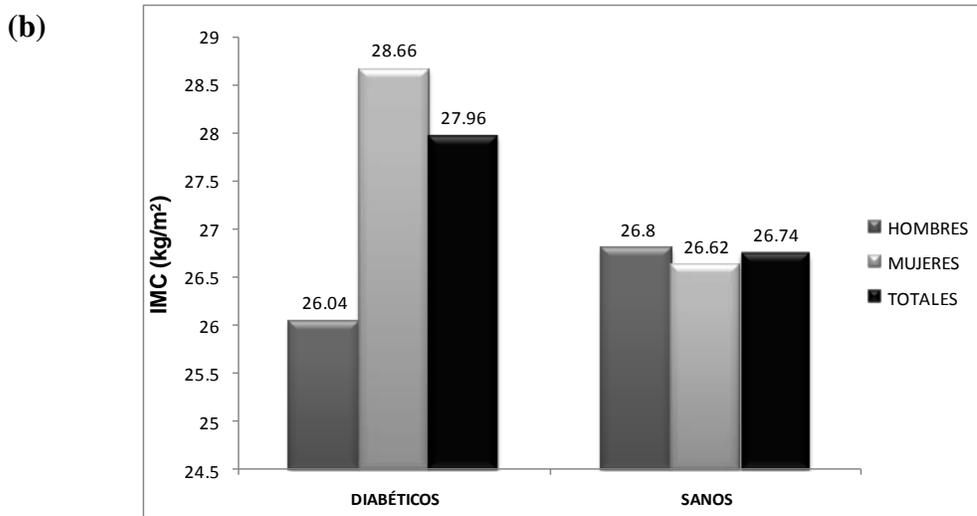
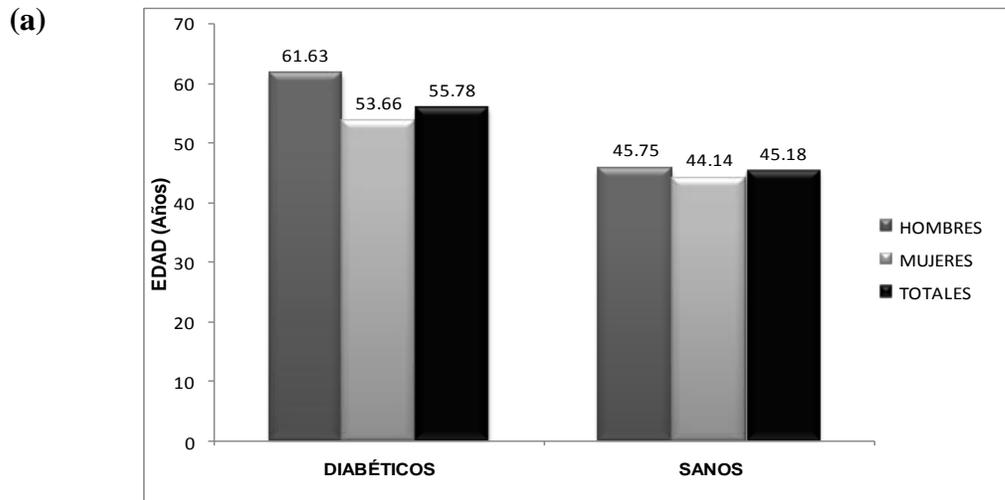


Figura 18. Promedios de Edad (a), Índices de masa corporal (b) y Niveles de glucosa (c) totales, y por género para casos y controles.

Extracción del ADN genómico.

Las muestras de DNA como ya se describió en metodología se extrajeron mediante el: DNeasy Blood and Tissue kit de Qiagen. Los DNA así obtenidos fueron resueltos en geles de agarosa al 1%. En las figuras 19, 20 y 21 se presentan 2 imágenes de los corrimientos electroforéticos del DNA genómico proveniente de las muestras de varios pacientes del grupo de casos y otros provenientes del grupo control. Como puede observarse en las figuras, el DNA se obtuvo sin contaminación con RNA, siendo mínima la presencia de degradación. La pureza obtenida por medición de la tasa (260/280), abarcó un rango de 1.7-2.0.

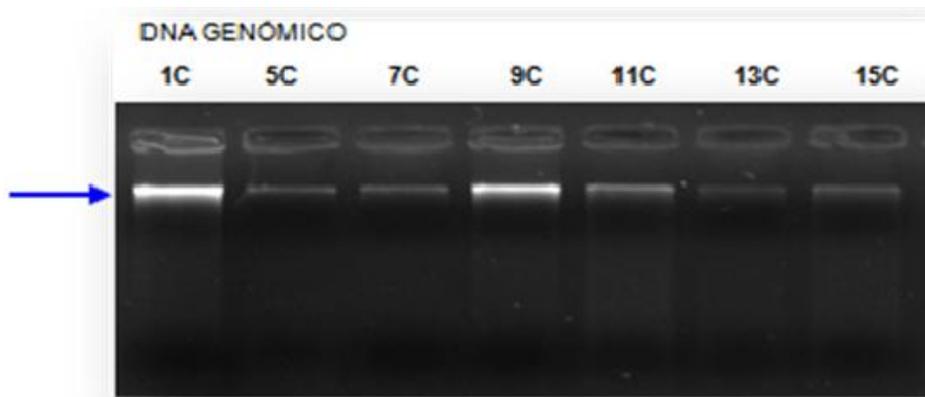


Figura 19. DNA genómico de muestras provenientes del grupo de individuos control. Gel de agarosa 1. Teñidas con bromuro de etidio.

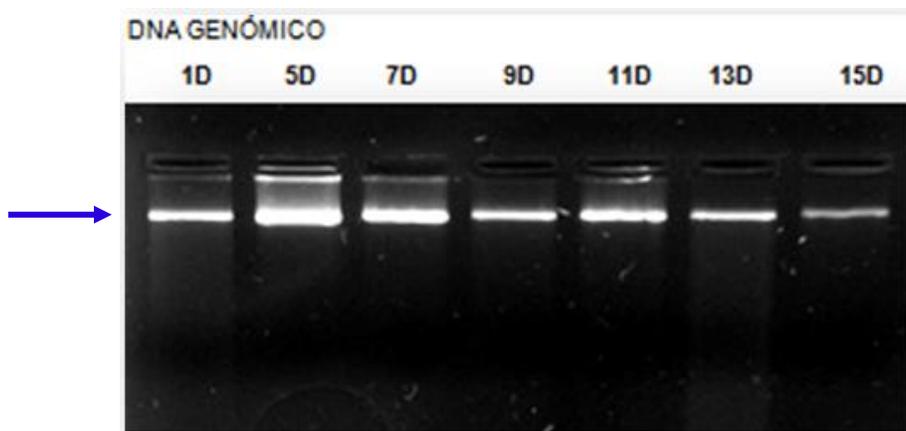


Figura 20. DNA genómico de muestras provenientes del grupo de pacientes diabéticos. Gel de agarosa 1%. Teñidas con bromuro de etidio.

Para la amplificación del exón4 del gen *HNF4A*, □□ donde se localiza la variante rs1800961 C>T. Se establecieron las condiciones de amplificación como ya se mencionó en la metodología y solo se muestra la resolución del producto de PCR de las muestras provenientes de algunos de los pacientes diabéticos, en donde se observa el amplicón de *HNF4A* con un tamaño de 272 pb, obtenido sin amplificación de productos secundarios (Figura 21).

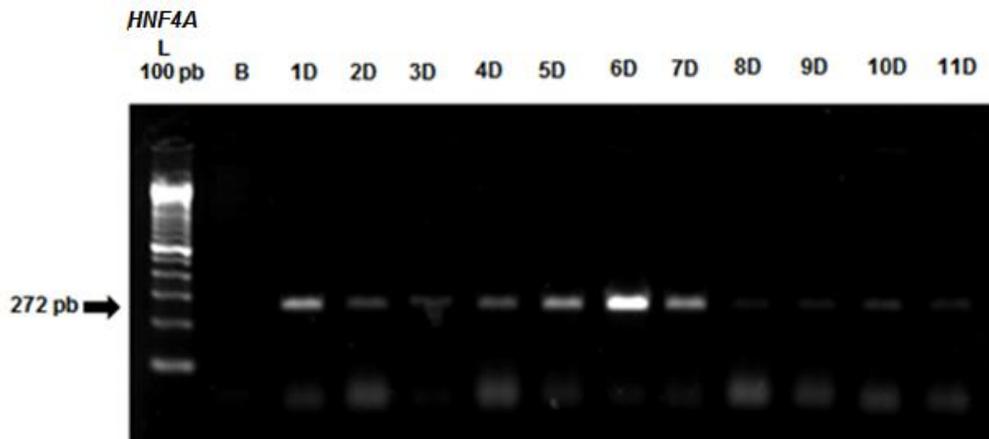


Figura 21. PCR de amplificación del exón 4 de *HNF4A* proveniente de algunas de las muestras de pacientes diabéticos (carriles 3-13), carril 1 marcador de 100 pb, carril 2 blanco (control negativo de la PCR). Gel al 2%, teñido con bromuro de etidio.

Distribución de la Frecuencia genotípica de la variante rs1800961 (T139I) del gen *HNF4A* en los casos y controles.

De la genotipificación de las muestras por secuenciación, en 6 de ellas provenientes de pacientes diabéticos y 3 de no diabéticos, se observó la presencia del alelo de riesgo (T) de la variante rs1800961 (C>T). La presencia de este polimorfismo de una sola base (SNP) en la posición 417 de la secuencia del RNA mensajero del gen *HNF4A* (NM-000457.3 secuencia consenso), es causante del cambio del aminoácido Treonina (codón ACT) que se presenta normalmente en la proteína HNF4 α , por el aminoácido

Isoleucina (codón A**TT**), alterando la función de la proteína. En la figura 22 podemos observar el electroferograma de una de las muestras provenientes de los pacientes diabéticos donde se presentó heterociguidad para la variante; es decir ambos alelos en la misma posición: el alelo C (alelo mayor ó alelo normal) y el alelo T (alelo menor ó alelo de riesgo).

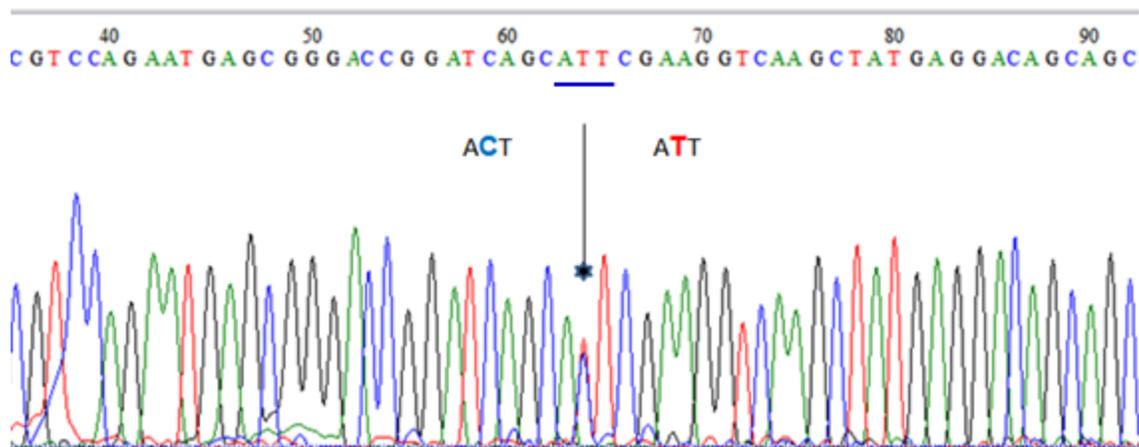


Figura 22. Electroferograma del exón 4 del gen *HNF4A* donde se observa en la posición que indica la flecha, la presencia de los dos alelos (C/T) en el triplete ATT, en una de las muestras de pacientes diabéticos que presentaron la variante.

De las 120 muestras analizadas (60 de pacientes diabéticos y 60 de individuos no diabéticos) las frecuencias de los genotipos (C/C, C/T y T/T) para la variante rs1800961 C> T se presentaron como se describe :

En Los individuos del grupo control (no diabéticos) el homocigoto C/C se presentó en 57 sujetos (42 mujeres y 15 hombres) con una frecuencia del genotipo de 0.95 (95%) y el heterocigoto C/T en 3 individuos (2 mujeres y 1 hombre) con una frecuencia genotípica de 0.5, lo que representa el 5% de los portadores de la variante en su forma

heterociga. Entre los individuos no diabéticos, el homocigoto del alelo menor, el genotipo T/T no se identificó en ninguno de los individuos (Tablas 12, 13 y Figura 23).

Tabla 12. Distribución del genotipo por género entre los pacientes diabéticos (casos) y sujetos no diabéticos (controles).

Genotipo	Casos		Controles	
	Mujeres n	Hombres n	Mujeres N	Hombres n
C/C	41	13	42	15
C/T	3	3	2	1
T/T	0	0	0	0
Total por género	44	16	44	16
Total por grupo	60		60	

Tabla 13. Comparación de la Frecuencia genotípica y alélica de la variante rs1800961 entre la población de diabéticos (casos) y la población no diabética (controles).

SNP	Número rs	Grupo	Frecuencia genotípica (fg)						X ² P	Frecuencia alélica (fa)					
			C/C		C/T		T/T			C			T		
			n	(fa) %	n	(fa) %	n	(fa) %		n	(fa) %	n	(fa) %	n	(fa) %
417 C>T Treo139Iso	rs1800961	Diabéticos (n=60)	54	(0.9) 90	6	(0.1) 10	0	(0.0) 0	1.03 0.3090	114	(0.95) 95	6	(0.05) 5		
		No diabéticos (n=60)	57	(0.95) 95	3	(0.05) 5	0	(0.0) 0		117	(0.975) 97.5	3	(0.025) 2.5		

X² de Mantel-Haenszel. p de significancia p≤0.05.

En los pacientes diabéticos el homocigoto C/C se presentó en 54 individuos (44 mujeres y 13 hombres) con una frecuencia genotípica de 0.9 (90%) y el heterocigoto C/T registró una frecuencia de 0.1 (10%) (3 mujeres y 3 hombres) (Tablas 13 y Figura 23).

Tampoco en la población de individuos diabéticos se registró el genotipo T/T (Tablas 12 y 13).

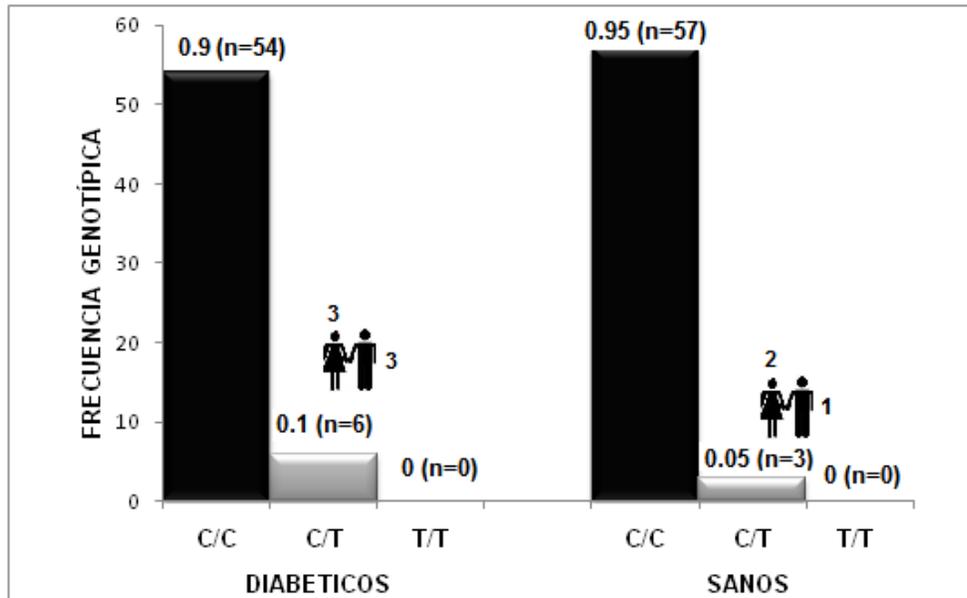


Figura 23. Distribución de las frecuencias Genotípicas del polimorfismo rs1800961 (Treo139Iso) en las dos poblaciones de estudio casos (diabéticos) y controles (no diabéticos).

En relación a la estimación de las frecuencias alélicas del alelo mayor (C) y del alelo de riesgo (T), del SNP rs1800961, podemos decir lo siguiente:

El alelo (C) en la población no diabética se registró con una frecuencia de 0.975 (97.5%), un poco arriba respecto al valor de frecuencia con el que se presentó en los pacientes diabéticos C= 0.95 (97.5%); en tanto que el alelo (T) considerado como de riesgo para el desarrollo de diabetes, registró el doble de la frecuencia en el grupo de los diabéticos 0.05 (5%) en comparación a los sujetos no diabéticos 0.025 (2.5%) (Tabla 13).

Sin embargo de acuerdo a los análisis estadísticos y al valor obtenido de la prueba de $\chi^2=1.03$, ($p=0.3090$), las frecuencias genotípicas y alélicas de la variante rs1800961 (Treonina139 Isoleucina) entre ambos grupos (diabéticos y no diabéticos) no fueron

estadísticamente significativas (Tabla 13), es decir la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas se presentan muy similares entre los individuos afectados por diabetes y los individuos no diabéticos, lo que nos habla de que este SNP en particular no presenta relación con la manifestación de la enfermedad en las poblaciones estudiadas.

Frecuencia genotípica y alélica de la variante rs1800961 (C/T) y el equilibrio de Hardy-Weinberg.

Con base en la frecuencia génica y la distribución de las frecuencias alélicas para la variante rs1800961, se determinó, mediante el estadístico χ^2 de Mantel-Haenszel si ambas poblaciones (controles y casos), cumplían con el equilibrio de Hardy-Weinberg. Nuestros resultados registraron que las frecuencias alélicas de la variante rs1800961 (C>T), no se desviaron del estado de equilibrio de Hardy-Weinberg, tanto en el grupo control ($\chi^2=0.04$, $p=0.8415$), como en el grupo de casos ($\chi^2=0.17$, $p=0.6801$) (Tabla 14).

Tabla 14. Determinación del equilibrio de Hardy-Weinberg por grupo. No diabéticos (grupo control) y diabéticos (casos).

	Genotipos Observados	Frecuencias alélicas	χ^2	p
Diabéticos (Casos) n=60	C/C=54 C/T=6 T/T=0	C=0.95 T=0.05	0.17	0.6801*
No diabéticos (Controles) n=60	C/C=57 C/T=3 T/T=0	C=0.975 T=0.025	0.04	0.8415*

χ^2 de Mantel-Haenszel. p significativa ≤ 0.05

* En equilibrio de Hardy-Weinberg.

Asociación del SNP 1800961 y la DM2 en la población estudiada.

La razón de momios (RM) fue calculada con el fin de conocer el grado de asociación de la frecuencia de aparición de la variante rs1800961 del gen *HNF4A* con la enfermedad DM2, en los grupos estudiados casos y controles. El cálculo se hizo con el programa STATCALC de EPIINFO Ver. 6.0 como ya se mencionó en la metodología.

Observamos que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p= 0.3090$), que corroboren la asociación (OR=2.05, IC 95% de 0.50-8.41) del SNP rs1800961 (T139I) del gen *HNF4A* y el riesgo de desarrollar Diabetes mellitus tipo 2 en las poblaciones estudiadas, es decir la presencia del alelo mutante (T) no es un factor de riesgo para el desarrollo de DM2 (Tabla 15).

Tabla 15. Estimación del grado de asociación entre las frecuencias genotípicas y alélicas de la variante rs1800961 del gen *HNF4A* y el desarrollo de diabetes, en las poblaciones estudiadas.

Genotipos	Frecuencia Genotípica						OR	IC 95%	X ²	p
	No diabéticos (Controles) N=60			Diabéticos (Casos) N=60						
	n	(%)	fg	n	(%)	fg				
C/C	57	95	0.95	54	90	0.9	2.05	(0.50-8.41)	1.03	0.3090
C/T	3	5	0.05	6	10	0.1				
T/T	0	0	0	0	0	0				
Frecuencia Alélica										
Alelos	n	(%)	fa	n	(%)	fa				
C	117	(97.5)	0.975	114	(95)	0.95				
T	3	(2.5)	0.025	6	(5)	0.05				

OR (razón de momios), 95% CI, X² de Mantel-Haenszel y valor de p. Se estimó significativo un valor de $p \leq 0.05$.

Asociación entre las variables (Glucosa, Edad, IMC) y la presencia de la variante rs1800961 del gen *HNF4A*.

Con el fin de determinar si los valores de las variables clínicas (nivel de glucosa) y antropométricas (edad e índice de masa corporal) de los individuos heterocigotos (C/T), que eran portadores del SNP rs1800961 mostraban alguna diferencia en relación a los que no lo portaban (los homocigotos C/C); se estimó el estadístico de U de Mann-Whitney (U), tanto intra grupos (Controles con SNP-Controles sin SNP) y (Casos con SNP-Casos sin SNP) como entre grupos (Casos y controles con SNP-Casos y Controles sin SNP), tomándose como significativos los valores de $p \leq 0.05$.

Tabla 16. Comparación de los valores de cada una de las variables, en los portadores (C/T) y no portadores (C/C) de la variante rs1800961, en los grupos estudiados.

Grupo	Variables	SNP rs1800961		U Mann-Whitney	p
		Homocigotos C/C	Heterocigotos C/T		
		$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$		
No diabéticos	Edad (años)	n=57 44.929±1.817	n=3 50±4.932	59.5	0.3871
	IMC(kg/m ²)	26.598±0.644	29.53±5.685	77	0.7861
	Glucosa (mg/dl)	93.035±1.085	99.66±4.371	41.5	0.1401
Diabéticos	Edad (años)	n=54 50±4.932	n=6 44.929±1.817	137.5	0.5543
	IMC(kg/m ²)	28.056±0.496	27.11±1.402	137	0.546
	Glucosa (mg/dl)	176.63±15.623	143.667±16.594	136.5	0.5379
No diabéticos-Diabéticos	Edad (años)	n=111 50.12±1.2588	n=9 54.88±3.758	392.5	0.2886
	IMC(kg/m ²)	27.307±0.413	27.916±1.917	494	0.9603
	Glucosa (mg/dl)	133.073±8.566	129±13.042	385.5	0.2581

U (Estadístico U-de Mann-Whitney), y valor de p.
Se estimó significativo un valor de $p \leq 0.05$.

Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los valores de las variables edad ($p=0.2886$), índice de masa corporal ($p=0.9603$) y Glucosa ($p=0.2581$), respecto a los portadores y no portadores del alelo de riesgo de la variante rs1800961, entre grupos. Ni tampoco dentro de los grupos; por separado. Por

lo que podemos afirmar que la presencia de la variante rs1800961 en los grupos de individuos no diabéticos y diabéticos estudiados, no tuvo influencia sobre los niveles de glucosa, edad e índice de masa corporal (Tabla 16).

Aún tomando en cuenta que no se observaron diferencias significativas en los valores de las variables clínicas y antropométricas de los portadores del SNP respecto a los no portadores, se realizó un análisis de regresión logística para determinar si existía algún grado de asociación entre los parámetros medidos (Edad, Índice de masa corporal, y niveles de glucosa) y la presencia del SNP en ambas poblaciones, tanto casos como controles. Considerándose, para efectos del análisis de la regresión logística bivalente como: 0 a los homocigotos (C/C) no portadores de la variante rs188961 y como 1 a los heterocigotos (C/T) portadores de la variante.

Tabla 17. Estimación del grado de asociación entre los portadores (C/T) y no portadores (C/C) de la variante rs1800961, en los grupos estudiados, con relación a variables: Edad, Índice de masa corporal y niveles de glucosa.

Grupo	Variables	SNP rs1800961		OR	95%IC	X ²	p
		Homocigoto C/C	Heterocigoto C/T				
		x̄	x̄				
No diabéticos	Edad (años)	n=57 44.929	n=3 50	1.044	0.960-1.135	1.014	0.314
	IMC(kg/m ²)	26.598	29.53	0.959	0.747-1.232	0.108	0.742
	Glucosa (mg/dl)	93.035	99.66	1.148	0.968-1.362	2.521	0.112
Diabéticos	Edad (años)	n=54 50	n=6 44.929	1.016	0.936-1.104	0.149	0.699
	IMC(kg/m ²)	28.056	27.11	0.925	0.720-1.188	0.375	0.540
	Glucosa (mg/dl)	176.63	143.667	0.994	0.978-1.010	0.881	0.440
No diabéticos-Diabéticos	Edad (años)	n=111 50.12	n=9 54.88	1.036	0.981-1.094	1.614	0.204
	IMC(kg/m ²)	27.307	27.916	0.962	0.818-1.130	0.227	0.634
	Glucosa (mg/dl)	133.073	129	0.999	0.991-1.008	0.018	0.892

OR (razón de momios) estimada mediante la regresión logística, al igual que el 95% IC, la X² y el valor de p.

Se consideró significativo un valor de p ≤ 0.05.

Los resultados no revelaron asociación entre los valores de las variables: edad, índice de masa corporal, ni los niveles de glucosa en los individuos portadores de la variante, para ninguno de los grupos estudiados, población diabética o no diabética pues sus OR, no tuvieron significancia estadística (Tabla 17).

IX.-DISCUSIÓN

El análisis de nuestros resultados nos permite establecer diferencias en relación a los parámetros biológicos (Edad), antropométricos (IMC) y bioquímicos (Glucosa) entre los pacientes con DM2 y los individuos no diabéticos, apreciándose variaciones en la distribución regional de los individuos que padecen la enfermedad y los que no la tienen. Los individuos diabéticos (casos) se concentran en mayor parte en la zona centro (DF, Estado de México, Guanajuato), sureste (Veracruz) y suroeste del país (Oaxaca y Michoacán), coincidiendo con lo reportado por la encuesta de epidemiología de Sistema único de vigilancia epidemiológica (SUIVE) para el año 2009, donde se registró la mayor prevalencia de DM2 en los estados de: México, D.F., Jalisco y Veracruz, con una prevalencia de 10.84 por cada 100,000 habitantes, según el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), la Secretaría de Salubridad y Asistencia (SSA) y el Instituto de Seguridad Social para los Trabajadores del Estado (ISSTE) (Sandoval *et al.*, 2009). Es contrastante que estos estados presenten condiciones de vida tan disímiles, el acelerado estilo de vida (hablando del D.F) aunado a los factores de riesgo como la mala alimentación alta en grasas y carbohidratos, y la predisposición genética, condicionan el desarrollo de la enfermedad (Shai; *et al.*, 2006). Carrillo y Panduro 2001, mencionan que los factores genéticos predisponen a la diabetes mellitus tipo 2 y el desarrollo de la enfermedad depende en gran parte de la alimentación, actividad física, factores ambientales y acción hormonal. García *et al.*, 2002, menciona que cambios recientes y repentinos en los estilos de vida tradicionales; como los que se ven en los inmigrantes recién llegados a los centros urbanos y grandes ciudades como Ciudad de México, Guadalajara y Monterrey, pueden precipitar la manifestación clínica de la alta susceptibilidad genética a desarrollar diabetes, la cual es una característica establecida de la población Mexicana. En nuestros resultados observamos que los estados donde

se presentó la mayor distribución de pacientes con DM2 coincide con los sitios de mayor mestizaje y donde se asentó gran parte de los pueblos mesoamericanos que habitaron el México antiguo, se ha determinado que la mayor parte de la población mexicana es una mezcla que consiste de diferentes acervos genéticos, incluidos los amerindios (65%), los europeos (principalmente de España, 30%) y en menor grado los africanos (5%) (Martínez *et al.*, 2007). Carrillo y Panduro 2001, mencionan que existen variaciones geográficas y étnicas en la prevalencia de la DM tipo 2 y que comunidades indígenas sin mestizaje como en el Norte de México han mostrado bajas prevalencias de diabetes (0% en indígenas duranguenses), en tanto que la prevalencia aumenta hacia el sur de México (7.2%) y en las regiones donde la población está más urbanizada (Mestizos duranguenses rurales 3.3% y Mestizos duranguenses Urbanos 9.0% de prevalencia en diabetes respectivamente) sugiriendo que la participación de los factores ambientales se hacen evidentes con las diferencias en la prevalencia de una población que vive en comunidades urbanas o rurales de una misma región. Granados-Silvestre *et al.*, 2006, menciona que nuestros ancestros presentan una mayor predisposición genética al desarrollo de DM2 y los estilos de vida occidental tienen un importante impacto en el incremento de la diabetes en el mundo, habiéndose observado que en poblaciones multiétnicas se presentan grupos que poseen una mayor prevalencia de diabetes, lo cual sugería que algunas poblaciones poseen un fondo genético que las hacen más susceptibles para la enfermedad.

Los individuos no diabéticos -como se observa en los resultados- aún cuando provienen en su mayoría del D.F., son originarios de diversas regiones del país observándose una población más heterogénea con individuos procedentes de estados del norte de México como: Durango, Chihuahua, Tampico y Sinaloa, lo cual habla de diferentes estilos de

vida, ambientes climáticos distintos, que influyen y determinan la expresión de su carga genética. Silva-Zolezzi *et al.*, 2009 menciona que en México durante el período prehispánico, eran más numerosos los grupos étnicos en el centro y sur de México y contaban con una cohesión política, religiosa y social más sólida que los grupos étnicos de la región del norte y que los patrones genéticos resultado del mestizaje han sido profundamente influenciados por las diferencias en las densidades de población parental y crecimiento demográfico, pues desde entonces los procesos de mestizaje en regiones geográficamente distantes se han visto afectados por diferentes condiciones demográficas e históricas que han modelado la estructura de los mexicanos, generando heterogeneidad genética entre y al interior de las diferentes regiones de todo México.

Las pequeñas variaciones observadas en este estudio en relación a los patrones de distribución de los pacientes diabéticos y los individuos no diabéticos, representan las diferencias en la carga genética, dinámicas demográficas, patrones de asentamientos humanos y densidades de las antiguas poblaciones amerindias que habitaban este país.

En nuestros resultados, observamos que la mayor parte de los individuos que presentaron diabetes eran mujeres 73%, contra 27% de hombres. De acuerdo a los resultados de la Encuesta Nacional de Salud (ENSA) 2000 en Secretaría de Salud 2008, la prevalencia nacional de diabetes mellitus para adultos de más de 20 años fue ligeramente mayor en mujeres (7.8%) respecto de los hombres (7.2%); y el SUIVE en el 2009, reportó que en México de los casos acumulados de DM2 para el primer semestre del 2009, el 40% correspondía a pacientes del sexo masculino y el 60% al sexo femenino (Sandoval *et al.*, 2009); es decir una proporción de 1.2 mujeres con Diabetes mellitus por cada hombre afectado.

Observamos también una diferencia significativa en las edades promedio de los individuos diabéticos 55.78 años y los individuos sanos 45.18 años. Según la Encuesta Nacional de Salud 2005 en Secretaría de Salud 2008, se reporta un claro incremento en el riesgo de diabetes mellitus en los mexicanos, conforme se incrementa la edad a partir de los 40 años. Sandoval *et al.*, 2009 menciona que en relación a los grupos de edad, la enfermedad se presenta más frecuentemente en el decenio de 50 a 59 años, tanto en hombres como en mujeres, seguido de las personas de la tercera edad.

En nuestros resultados también fue evidente que la enfermedad se manifestó a edades más tempranas en las mujeres 53.66 años que en los hombres 61.63 años. Una de las causas que puede estar condicionando esto, es la acción hormonal, la cual presenta grandes cambios a lo largo del ciclo de vida de una mujer. Carrillo y Panduro 2001, mencionan que pueden existir casos en que la diabetes sea producida por genes que predisponen y que su desarrollo depende del estilo de vida en la edad adulta y también pueden existir casos de DM2 debidos a la reprogramación de genes por la acción hormonal en el desarrollo embrionario combinada con el estilo de vida en la edad adulta (fenocopia).

Otro dato que se evidenció en nuestros resultados fue que los niveles de glucosa entre los pacientes diabéticos -aún estando bajo tratamiento farmacológico- eran en promedio altos (173.33 ± 109.9), y mostraban gran variabilidad entre los mismos individuos; este valor está por encima de los límites permitidos por la ADA (>130 mg/dl glucosa en ayuno), para los individuos bajo tratamiento farmacológico, lo que nos habla de un descontrol metabólico en estos individuos, y es indicativo de que los fármacos recibidos para el control de la glucosa para este grupo en particular no están ejerciendo

su función; lo cual a su vez influye en la evolución de la enfermedad, pudiendo generar otras complicaciones en el individuo. Es ya sabido que la hiperglicemia crónica, genera glucotoxicidad para las células y es responsable de varias patologías. En el Programa de Acción específico 2007-2012 de diabetes mellitus, se menciona que la diabetes triplica el riesgo de aterosclerosis manifestada por infartos del miocardio y embolias cerebrales, y es la principal causa de insuficiencia renal, ceguera, amputaciones no traumáticas, hospitalizaciones e incapacidad prematura, que generan el 30% de la mortalidad general. (Secretaría de Salud 2008).

Otro de los parámetros que fueron medidos en el presente trabajo fue el IMC, es bien conocido que uno de los factores de riesgo que puede predisponer al desarrollo de diabetes mellitus es la obesidad y el sobrepeso (Alpizar Salazar, 2007; Villareal *et al.*, 2008). Secretaría de Salud 2008, menciona que la población con obesidad, según su índice de masa corporal y circunferencia de la cintura, presenta una prevalencia mucho mayor de diabetes mellitus, que aquella sin obesidad. (Secretaría de Salud 2008).

En nuestros resultados aún cuando no se observó una diferencia significativa en el promedio del IMC entre individuos no diabéticos y diabéticos (27 y 29 Kg/cm² respectivamente) en ambos grupos se presentó sobrepeso, (índices de masa corporal mayores a 25kg/m² pero menores a 29kg/m² según la escala de clasificación de la OMS). Dedoussis *et al.*, 2007, señala que el incremento de personas con diabetes en años recientes no sólo se debe a los factores genéticos sino al incremento de personas obesas. Nuestros resultados se suman a los varios estudios que evidencian el hecho de que el sobrepeso y la obesidad (la cual se presentó en ambos grupos) están siendo un factor determinante en el desarrollo y evolución de la diabetes entre los mexicanos. En

México en años recientes se ha presentado un incremento notable en sobrepeso y obesidad (Alpizar-Salazar 2007), lo que va aunado a los hábitos alimenticios de la población. La alta vulnerabilidad a los cambios en los hábitos alimenticios y actividad física en varios grupos étnicos se ha atribuido a la selección desde hace mucho tiempo de un genotipo "ahorrador", que confiere una ventaja durante los períodos de las condiciones de vida precarias, pero se convierte en desventaja dado un entorno socio-económico de abundancia y un estilo de vida sedentario. México está experimentando cambios socio-económicos en su transición de la situación de un país subdesarrollado a la de una de un país en desarrollo. En este marco de transición epidemiológica, la prevalencia de la diabetes es rápida y en continuo aumento. (García *et al*, 2002). Secretaría de Salud 2008, menciona que la diabetes inicia con el incremento de peso que ocurre años previos al diagnóstico, el cual se relaciona con resistencia a la insulina y la consecuente hiperglucemia (la concentración de glucosa en sangre aumenta al principio sólo después de ingerir alimentos y años después aún en estado de ayuno) Dedoussis *et al.*, 2007, señala que la resistencia a la insulina se debe al incremento de los ácidos grasos en la célula provocando la inhibición de las vías implicadas en el catabolismo de la glucosa, además de la deficiencia en el metabolismo de los ácidos grasos en los adipocitos y deficiencia en la oxidación de estos en las mitocondrias (Permutt *et al.*, 2005; Dedoussis *et al.*, 2007).

Se hizo evidente también que tanto en hombres como en mujeres de ambos grupos (diabéticos y no diabéticos) , se presentó sobrepeso sin llegar a obesidad, sin embargo hubo un predominio de mujeres con sobrepeso en el grupo de diabéticas y aún cuando en los estudios de asociación de estas variables, con el riesgo a desarrollar la enfermedad no se haya haya registrado asociación significativa alguna; salta a la vista

que las mujeres diabéticas analizadas en el estudio, presentaron mayores índices de masa corporal (28.66 kg/m^2). Lo cual es coincidente con lo reportado para otro estudio realizado por Aguilar-Juárez 2009, en población mexicana donde reporta un predominio del sexo femenino con índices de Masa Corporal (IMC) promedio de 29 kg/m^2 y diabetes mellitus tipo 2. (Revista de Endocrinología y Nutrición, vol 14, no 3 en Aguilar-Juárez 2009). Aguilar-Juárez 2009, señala que en el caso del sexo femenino se ha documentado que el sobrepeso y/o la obesidad, se pueden explicar por la presencia de la menopausia, ya que hay alteraciones a nivel de los lípidos, pudiéndose presentar un aumento de los niveles de LDL y disminución de los niveles de HDL, y que en el 50% de las mujeres menopáusicas puede haber un incremento de los niveles de colesterol por arriba de 200 mg/dl , y un aumento del índice de masa corporal y de la grasa total.

Ahora bien, una vez establecida la descripción clínico-antropométrica de nuestra población y, basándonos en la evidencia que confiere un papel importante a la variante rs1800961 C>T del gen *HNF4A* en la susceptibilidad genética a desarrollar DM2, en poblaciones como la Japonesa (Zhu *et al.*, 2003), Danesa (Ek *et al.*, 2008) y la misma población mestiza mexicana (Menjívar *et al.*, 2008); nos dimos a la tarea de determinar, en el presente estudio la frecuencia genotípica y alélica de esta variante rs1800961 C>T en población mestiza mexicana diabética y no diabética. Estableciendo lo siguiente con base en nuestros resultados

Las frecuencias genotípicas y alélicas para la variante rs1800961 C> T, fueron similares entre los individuos no diabéticos y los pacientes diabéticos, y aún cuando no se registraron diferencias significativas entre los grupos -lo que se comprobó al realizar el análisis estadístico y determinar el valor de $X^2 = 1.03$ $p = 0.3090$ - pudimos apreciar que

la frecuencia del genotipo C/T (0.05=5%) y del alelo de riesgo "T" (0.025=2.5%) en la población mestiza mexicana no diabética es alta, comparada con la reportada para población japonesa (C/T=0.008=0.8%, T=0.0042=0.42%) (Zhu *et al.*, 2003) u otras poblaciones a nivel mundial en el Mapa de Haplotipos Internacional (Hapmap 2010), para diferentes poblaciones no diabéticas: entre ellas mexicanos que radican en los Ángeles California (C/T=0.020=2.0%, T =0.01=1.0%); Chinos Han de Beijing, (C/T=0.024=2.4%, T=0.012=1.2%), Toscanos en Italia (C/T=0.023=2.3%, T=0.011=1.1%) y Japoneses de Tokyo (C/T=0.012=1.2%, T=0.006=0.6%). Esta alta frecuencia del polimorfismo se encuentra en concordancia: con la reportada en estudios anteriores realizados en población no diabética, mestiza Mexicana por Menjívar *et al.*, 2008 (C/T=0.056=5.6%, T=0.0266=2.6%) y Granados-Silvestre *et al.*, 2006 (C/T=0.053=5.3%, T=0.026=2.6%); aunque un poco menor a la del estudio de Rodríguez-Trejo *et al.*, 2006, donde reportó haber registrado frecuencias muy altas de esta variante (C/T=0.13=13%) en una población de 100 jóvenes Mexicanos mestizos sin diabetes, que presentaban sobrepeso e hiperlipidemias. Estas altas frecuencias tanto del genotipo C/T como del alelo menor T de la variante rs1800961 C>T, se presentan aún en un número mayor en las poblaciones autóctonas mexicanas; como quedó de manifiesto en el estudio de Granados-Silvestre *et al.*, 2006, donde reportó haber registrado frecuencias genotípicas del heterocigoto C/T y del alelo menor (T), en poblaciones en Mazahuas de (C/T=0.064=6.4%, T=0.0266=3.22%) y Teenek (C/T=0.114=11.4%, T=0.0571=5.71%); postulando luego que existía un fondo genético propio de los grupos autóctonos mexicanos, que contribuía a la aparición de diabetes en la población mestiza Mexicana (Granados-Silvestre *et al.*, 2006).

En este orden de ideas, como se mostró en los resultados del presente estudio, La frecuencia genotípica del heterocigoto C/T y del alelo de riesgo T del polimorfismo rs1800961 fué menor entre los individuos sin diabetes(C/T=0.05=5%, T=0.025=2.5%) , que entre los pacientes diabéticos (C/T=0.1=10%, T=0.05=5%), y aún cuando en el análisis estadístico no se registró un riesgo asociado significativo al desarrollo de diabetes, (OR=2.05, 95%CI= 0.50-8.41, p=0.3029), fue claramente observable que la frecuencia con que se presentó el polimorfismo rs 1800961 C>T en la población de diabéticos, incluidos en este estudio, fue el doble de la registrada en los individuos no diabéticos, observándose además que estas frecuencias son altas comparadas con poblaciones como la Japonesa del estudio de Zhu *et al.*, 2003, donde el heterocigoto C/T y el alelo de riesgo (T) presentaron frecuencias de: (C/T=0.0354=3.54%, T=0.0177=1.77%), asociadas a un riesgo a desarrollar diabetes de 4.3 veces más (OR=4.3 y p=0.015) cuando el polimorfismo estaba presente (Zhu *et al.*, 2003); o en la población Danesa del estudio de Ek *et al.*, 2008, quien reportó frecuencias de C/T=0.089=8.9% y T=0.042=4.2% .asociadas a un riesgo significativo de 1.23 veces más de desarrollar diabetes con la presencia del polimorfismo. La alta frecuencia con la que se presentó este polimorfismo en la población de diabéticos evaluados en nuestro estudio, es coincidente con lo reportado en el estudio de Menjívar *et al.*, 2008 para población diabética mexicana (C/T=0.16=16%, T=0.08=8%) quien además menciona que la presencia de este alelo en la población estaba asociado a un riesgo de 3.38 veces más de desarrollar la enfermedad que aquellos que no eran portadores de la variante; aunque nuestras frecuencias, -comparadas a las frecuencias encontradas por ella en la población de diabéticos- fueron ligeramente más bajas. Las causas de esto las desconocemos, pero podemos pensar -sin afirmar- que las diferencias, observadas entre las frecuencias reportadas en ese estudio y en nuestro trabajo pueden explicarse

por la pequeña cantidad de individuos analizados en el presente estudio. Con todo ello, pese al bajo número de población analizada y al no haber observado asociación significativa entre la frecuencia del polimorfismo y el riesgo a desarrollar diabetes mellitus en nuestra población, podemos afirmar que las frecuencias de la variante rs1800961 C>T (T139I) en nuestra población de mestizos mexicanos diabéticos, corresponden a las más altas reportadas en la literatura comparadas con otras poblaciones en el mundo, tal cual lo registraron los estudios de Menjívar *et al.*, 2008.

Por otra parte, aún cuando la variante rs1800961 C>T (T139I) no registró asociación significativa con ninguno de los parámetros clínico-antropométricos evaluados en el presente estudio (Edad, índice de masa corporal y niveles de glucosa); pero aunado al hecho de haber observado una alta frecuencia de la variante en las poblaciones diabéticas analizadas en nuestro estudio y dada la evidencia previa que implica al polimorfismo rs1800961 C>T de *HNF4A* en el riesgo asociado a predisponer al desarrollo de diabetes en población mestiza Mexicana y en otras poblaciones: consideramos que la pequeña cantidad de pacientes diabéticos (casos) e individuos no diabéticos (controles) analizados aquí, podría estar sesgando los resultados por lo que se sugiere aumentar el número de casos, y controles, para incrementar el poder estadístico de estas resoluciones.

X.-CONCLUSIONES

1. Los individuos con DM2 procedían principalmente de los estados del centro y suroeste de México
2. Entre los individuos que presentaron DM2, el sexo femenino fue el género predominante
3. La DM2 se manifestó a edades más tempranas en mujeres que en hombres.
4. La edad y los niveles de glucosa fueron significativamente mayores en los pacientes diabéticos en relación a los individuos no diabéticos. Los individuos con DM2 no presentaron un buen control de sus niveles de glucosa, aún estando bajo farmacoterapia.
5. Los individuos de ambas poblaciones estudiadas (diabéticos y no diabéticos) presentaron sobrepeso sin llegar a obesidad.
6. La distribución genotípica y la frecuencia alélica del alelo de riesgo (T) de la variante rs1800961, fue similar en ambos grupos, sin observarse diferencias significativas entre ellos.
7. La presencia del polimorfismo rs1800961 C>T (Tre 139 Iso) del gen *HNF4A* no se asoció con el desarrollo de DM2 en la población de estudio.
8. La frecuencia genotípica de la variante rs1800961 C>T de la población estudiada es alta comparada con otras poblaciones a nivel mundial y concuerda con lo reportado anteriormente por la Dra. Menjívar y su grupo de trabajo para población mexicana diabética y no diabética.
9. No se observaron diferencias significativas en los Niveles de glucosa, Edad e Índice de masa corporal entre los portadores del alelo de riesgo y los no portadores de la variante; ni se registró asociación alguna entre la frecuencia de la

variante rs1800961 C>T y los niveles de glucosa, Edad e IMC, de ambos grupos estudiados.

10. Considerando los objetivos del presente estudio y con base en nuestros resultados la variante rs1800961 C>T de *HNF4A* no puede emplearse como marcador pronóstico en nuestra población, dado que la frecuencia alélica del alelo menor no presentó asociación significativa con el riesgo a desarrollar Diabetes Mellitus tipo 2.

11. Los resultados estadísticos, no apoyan la posibilidad de que la variante rs 1800961 de *HNF4A*, contribuya a la susceptibilidad a desarrollar DM2 en las poblaciones estudiadas, sin embargo se sugiere realizar un estudio donde se incremente el número de casos y controles para aumentar el poder estadístico de estas resoluciones.

XI.-BIBLIOGRAFÍA

Abderrahmani A., Chèvre J.C., Otabe S., Chikri M., Hani E.H., Vaxillaire M., Hinokio Y., Horikawa Y., Bell G.I., Froguel P., Genetic variation in the hepatocyte nuclear factor-3beta gene (HNF3B) does not contribute to maturity-onset diabetes of the young in French Caucasians. *Diabetes*. 2000; 49(2):306-308.

Aguilar SCA, Reyes E, Ordóñez MA, Arellano M, Ramírez JS, Domínguez LA, Martínez F JR, Velasco P ML, Alpizar M, García GF, Gómez PF, Rull J and Tusié L MT. Early-Onset Type 2 Diabetes: Metabolic and Genetic Characterization in the Mexican Population. *J. Clin. Endocrinol Metab*. 2001; 86(1): 220-226.

Aguilar SCA, Vázquez ChC. (2008). Sistema de actualización Médica en Diabetes. Libro 2 Fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 2 y de la resistencia a la insulina. Intersistemas. México D.F.41-89.

Aguilar JM. (2009). Caracterización de los polimorfismos T759T del Gen Sur-1 y E23K del Gen Kir 6.2 en pacientes mexicanos con DMT2 en tratamiento con sulfonilureas. Tesis de maestría, Escuela Superior de Medicina.

Alpizar, SM. (2007).Guía para el manejo integral del paciente diabético., 2 tomos (2ª edición), Mexico, D.F. Alfil. Tomo I, 274p

Andrulionyté L, Laukkanen O, Chiasson J.L, Laakso M. Single nucleotide polymorphisms of the HNF4 α gene are associated with the conversion to type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM trial. *J Mol Med*. 2006; Jul, 84: 701–708.

Andersson E A, Pilgaard K, Pisinger C, Harder MN, Grarup N, & Færch K, Poulsen P, & Witte DR, Jørgensen T, Vaag A, Hansen T, Pedersen O. Type 2 diabetes risk alleles near ADCY5, CDKAL1 and HHEX-IDE are associated with reduced birthweight. *Diabetologia*. 2010; 53:1908–1916.

Bartoov SR, Hertz R, Wang H, Wollheim BC, Bar TJ, Walker DM. Activation of the insulin gene promoter through a direct effect of hepatocyte nuclear factor 4_{*}. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002; Jul, 277(29): 25914–25919.

Bagwell AM, Bento JL, Mychaleckyj JC, Freedman BI, Langefeld CD and Bowden DW. Genetic Analysis of *HNF4A* Polymorphisms in Caucasian-American Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2005; April, 54:1185-1190

Boesgaard TW, , Gjesing AP, Grarup N, Rutanen J, Jansson PA, Hribal ML, Sesti G, Fritsche A, Stefan N, Staiger H, Häring H, Smith U, Laakso M, Pedersen O, Hansen T; EUGENE2 Consortium .Variant near ADAMTS9 known to associate with type 2 diabetes is related to insulin resistance in offspring of type 2 diabetes patients--EUGENE2 study. *PLoS ONE*. 2009 Sep, 4(9):e7236.

Bolotin E, Schnabl J, Sladek FM *HNF4A* (Homo sapiens). *Transcription Factor Encyclopedia*. 2010 (tomado de <http://www.cisreg.ca/cgi-bin/tfe/articles.pl?tfid=140>
28 de Octubre 2010.

Bogan AA, Dallas-Yang Q, Ruse MD Jr, Maeda Y, Jiang G, Nepomuceno L, Scanlan TS, Cohen FE, Sladek FM. Analysis of protein dimerization and ligand binding of orphan receptor HNF4alpha. *J Mol Biol.* 2000 Sep 29; 302(4):831-51.

Burton P R..Collaborators 258. Wellcome Trust Case Control Consortium, [Group Author], Biol RA Genet & Genom Study Syndicate, [Group Author], Breast Canc Susceptib Collaborat, [Group Author]. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature.* 2007; Jun, 447 (7145):661-678.

Carmena R. en Segovia DAJM, Mora TF. Ochoa y la medicina clínica. Capítulo 6. Complejidad de la diabetes mellitus tipo 2. Farmaindustria serie científica. Madrid . 2004. 79-88.

Carrillo C, Panduro CA. Genética de la diabetes mellitus tipo 2. *Investigación en Salud.* México, 2001;. Marzo, (III): 27-34.

Dedoussis GVZ, Kaliora AC, Panagiotakos DB. Genes, Diet and Type 2 Diabetes Mellitus: A Review. *Rev Diabet Stud.* 2007; 3(4): 13-24.

Del Bosque PL, Aguilar SCA, Tusie LMT, et al. Association of the calpain-10 gene with type 2 diabetes mellitus in a Mexican population. *Mol Genet Metab,* 2004; 81:122-126.

Domínguez LA, Miliar GA, X Segura KY, Riba L, Esparza LJ, Ramírez JS, Rodríguez TM, Canizales QS, Cabrera VS, Fragoso OV, Aguilar SC, Altamirano BN, Calzada LR, Robles VC, Bravo RL, Tusié LM. Mutations in MODY Genes Are not Common Cause of

Early-Onset Type 2 Diabetes in Mexican Families. *Journal of the Pancreas(ONLINE)*. 2005; May, 6(3):238-245.

Drewes H, senkel S, Holewa B, and Ryffel GU. Human Hepatocyte Nuclear Factor 4 Isoforms Are Encoded by Distinct and Differentially Expressed Genes. *Molecular and Cellular Biology*. 1996; Mar,16(3): 925–931.

Duesing K, Fatemifar G, Charpentier G, Marre M, Tichet J, Hercberg S, Balkau B, Froguel P, Gibson F. Evaluation of the association of IGF2BP2 variants with type 2 diabetes in French Caucasians. *Diabetes*, 2008; Jul, 57(7):1992-1996.

Ek J, Schack Ch, Packert D, Glu" mer Ch, Borch K, Jørgensen T, Pedersen O and Hansen T. The Functional Thr130Ile and Val255Met Polymorphisms of the Hepatocyte Nuclear Factor-4_ (*HNF4A*): Gene Associations with Type 2 Diabetes or Altered beta-cell function among Danes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005; May, 90(5):3054-3059.

Ezzidi I, Turki A, Messaoudi S, Chaieb M, Kacem M, Al-Khateeb GM, Mahjoub T, Almawi WY, Mtiraoui N. Common polymorphisms of calpain-10 and the risk of Type 2 Diabetes in a Tunisian Arab population: a case-control study. *BMC Med Genet*, 2010; May (11):75.1-8.

Granados-Silvestre Ma, Ortiz-López g. Menjívar Marta. Evaluación de la frecuencia de la Mutacion T130I del gen *HNF4A* en dos Grupos indígenas mexicanos. 2° Congreso Nacional de Química Médica. 2006; 1-4

Grant, WR, Moore FA, Florez JC. Genetic Architecture of Type 2 Diabetes: Recent Progress and Clinical Implications. *Diabetes care*, 2009; June, 32 (6): 1107-114.

García E, Aguilar SCA, Tusié Luna T and Rull RJA. Early-Onset Type 2 Diabetes in Mexico. *Imaj*. 2002; Jun, 4: 444-447.

González JF. Regulation of Hepatocyte Nuclear Factor 4 α -mediated Transcription. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2008; 23 (1): 2–7.

Guzmán JN, Madrigal BM, Revisión de las características clínicas, metabólicas y genéticas de la diabetes mellitus. *Bioquímica*. 2003; 28(2): 14-23.

Gupta RK, Vatamaniuk MZ, Lee CS, Flaschen RC, Fulmer JT, Matschinsky FM, Duncan SA, Kaestner KH. The MODY1 gene HNF-4 α regulates selected genes involved in insulin secretion. *J Clin Invest*, 2005; April; 115(4):1006–1015.

Hall RK, Sladekt MF, Granner KD. The orphan receptors COUP-TF and HNF-4 serve as accessory factors required for induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by glucocorticoids. *Biochemistry*. 1995; January, 92: 412-416.

Hani EH, Suaud L., Boutin P., Chevre J.-C., Durand E., Philippi A., Demenais F., Vionnet N., Furuta H., Velho G., Bell G.I., Laine B., Froguel P. "A missense mutation in hepatocyte nuclear factor-4- α , resulting in a reduced transactivation activity, in human late-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus." *J. Clin. Invest*, 1998; 101:521-526

Harries LW, Locke JM, Shields B, Hanley NA, Hanley KP, Steele A, Njølstad PR, Ellard S and Hattersley AT. The Diabetic Phenotype in *HNF4A* Mutation Carriers Is Moderated By the Expression of *HNF4A* Isoforms From the P1 Promoter During Fetal Development. *Diabetes*. 2008; June, 57: 1745-1752.

Hirota k, Sakamaki IJ, Ishida J, Shimamoto Y, Nishihara S, Kazuhide ONK, Yamamoto M. A combination of HNF-4 and Foxo1 is required for reciprocal transcriptional regulation of Glucokinase and Glucose-6-phosphatase genes in response to fasting and feeding. *Journal of Biological Chemistry*. 2008; nov 283(47): 32432-32441.

Hoek, VM, Dehghan A., Witteman CMJ, Van Duijn MC, Uitterlinden GA, Oostra, AB, Hofman A, Sijbrands JGE, Janssens JWC. Predicting type 2 diabetes based on polymorphisms. From genome-wide association studies A population-Based Study: *Diabetes*. 2008; nov 57:3122-3128.

Holewa B, Pogge V, Strandmann E, Zapp D, Lorenz P, Ryffel GU. Transcriptional hierarchy in *Xenopus* embryogenesis: HNF4 a maternal factor involved in the developmental activation of the gene encoding the tissue specific transcription factor HNF1 alpha (LFB1). 1996. *Mechanisms of Development* **54** 45–57.

Horikawa Y, Miyake K, Yasuda K, Enya M, Hirota Y, Yamagata K, Hinokio Y, Oka Y, Iwasaki N, Iwamoto Y, Yamada Y, Seino Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Yamamoto K, Tokunaga K, Takeda J, Kasuga M.. Replication of genome-wide association studies of type 2 diabetes susceptibility in Japan. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Aug;93(8):3136-3141.

Huang J, , Karakucuk V, Levitsky LL, Rhoads DB Expression of HNF4alpha variants in pancreatic islets and Ins-1 beta cells. *Diabetes Metab Res Rev.* 2008 Oct;24(7):533-543.

Jones JR, Barrick C, Kim KA, Lindner J, Blondeau B, Fujimoto Y, Shiota M, Kesterson RA, Kahn BB, Magnuson MA. Deletion of PPARgamma in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005; April, 102(17): 6207–12.

Koo BK, Cho YM, Park BL, Cheong HS, Shin HD, Jang HC, Kim SY, Lee HK, Park KS. Polymorphisms of KCNJ11 (Kir6.2 gene) are associated with Type 2 diabetes and hypertension in the Korean population. *Diabet. Med.* 2007; 24 (2): 178–86.

Lazo-de-la-Vega-Monroy ML, Fernández Mejía C. Factores transcripcionales de la célula α adulta . *Rev Invest Clín.* 2008; Sep, 61 (5): 428-446.

Lehman DM, Richardson DK, Jenkinson PCh, Hunt JK, Dyer DT, Leach JR, Arya R, Abboud EH, Blangero J, Duggirala R, Stern PM. *Brief report* p2 promoter variants of the hepatocyte nuclear factor 4_ gene are associated with type 2 Diabetes in Mexican Americans. *Diabetes*, 2007; feb, 56: 513-517.

Li J, Ning G, Duncan SA. 2000 Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4 alpha. *Genes and Development* **14** 464–474.

Liu Y, , Liu Z, Song Y, Zhou D, Zhang D, Zhao T, Chen Z, Yu L, Yang Y, Feng G, Li J, Zhang J, Liu S, Zhang Z, He L, Xu H Meta-analysis added power to identify variants in FTO associated with type 2 diabetes and obesity in the Asian population. *Obesity (Silver Spring)*. 2010 Aug,18(8):1619-1624.

Love GLD, Wasson J, Ma J, Jin CH, Glaser B, KS Brian and Permutt A. .A Common Polymorphism in the Upstream Promoter Region of the Hepatocyte Nuclear Factor-4_ Gene on Chromosome 20q Is Associated With Type 2 Diabetes and Appears to Contribute to the Evidence for Linkage in an Ashkenazi Jewish Population. *Diabetes*. 2004; Apr, 53: 1134-1140.

Lu P, Liu J, Melikishvili M, fried GM, In-Chi Y. Crystallization of hepatocyte nuclear factor 4a (HNF4a) in complex with the HNF1a promoter Element. *Acta Cryst*. 2008 section F 64: 313-317.

Martinez-Marignac V, Valladares A, Cameron C, Chan A, Perera A, Globus-Goldberg R, Wacher N, McKeigue P, O'Donnell D, Shriver M, Cruz M, Parra J. E. Admixture in Mexico City: implications for admixture mapping of Type 2 diabetes genetic risk factors. *Hum Genet*. 2007.120:807–819.

Mahler RJ, Adler ML. Type 2 Diabetes Mellitus: Update on Diagnosis, Pathophysiology, and Treatment. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1999; 84(4):1165-1171

Menjívar M, Granados SMA, Montúfar RI, Herrera M, Tusié LMT, Canizales QS, Aguilar SCA, Ortiz LMG. High frequency of T130I mutation of *HNF4A* gene in Mexican patients with early-onset type 2 diabetes. *Clin Genet.* 2008 Feb; 73(2):185- 187

Muller YL,, Infante AM, Hanson RL, Love-Gregory L, Knowler W, Bogardus C, Baier LJ. J Variants in hepatocyte nuclear factor 4alpha are modestly associated with type 2 diabetes in Pima Indians. *Diabetes.* 2005 Oct, 54(10):3035-3039.

Navarro- Tableros V, Sánchez SMC, García S, Hiriart M. Autocrine regulation of single pancreatic beta-cell survival. *Diabetes.* 2004; 53 (8): 2018-2023.

NOM PROYECTO de Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-1994, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes; para quedar como Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-015-SSA2-2007, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus. Secretaría de Salud.

Omori S, Tanaka Y, Takahashi A, Hirose H, Kashiwagi A, Kaku K, Kawamori R, Nakamura Y, Maeda S. Association of CDKAL1, IGF2BP2, CDKN2A/B, HHEX, SLC30A8, and KCNJ11 with susceptibility to type 2 diabetes in a Japanese population. *Diabetes.* 2008; Mar, 57(3):791-795.

Permutt MA, Wasson J, Cox N. Genetic epidemiology of diabetes. *The Journal of Clinical Investigation.* 2005; 115 (6): 1431-1439.

Perry JR, Frayling TM. New gene variants alter type 2 diabetes risk predominantly through reduced beta-cell function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2008; Jul; 11(4):371-377.

Rodríguez-Trejo A, Ortiz LG, Menjívar M. Evaluación del polimorfismo T130 I del gen HNF-4 α como factor de riesgo de Diabetes mellitus tipo 2 de aparición temprana en alumnos de la facultad de Química de la UNAM. *Medigraphic Artemisa.* 2006; Mar, 31.

Ryffel GUR. Mutations in the human genes encoding the transcription factors of the hepatocyte nuclear factor (HNF)1 and HNF4 families: functional and pathological consequences. *Journal of Molecular Endocrinology.* 2001; 27:11–29.

Sandoval B.L.A, Martínez M.M.I. El Suive y la prevalencia de Diabetes mellitus tipo II en México hasta la semana 13 de 2009 (Segunda y última parte). Sistema nacional de vigilancia epidemiológica. *Epidemiología* 2009; 2 a 8 de Agosto 31(26): 1-4. (Checado en <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2009/sem31/pdf/edit3109.pdf>).

Salehi A, Vieira E, Gylfe E. Paradoxical stimulation of glucagon secretion by high glucose concentrations. *Diabetes* 2006; 55:2318-2323

Sesti G, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Sbraccia P and Lauro R. Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *The FASEB Journal.* 2001; Oct, 15: 2099-2111.

Servitja JM, Ferrer J. Transcriptional networks controlling pancreatic development and beta cell function. *Diabetologia* 2004, 47: 597-613.

Secretaría de Salud. Subsecretaría de Prevención y promoción de la salud. Programa de Acción Específico 2007-2012. Diabetes Mellitus. *Secretaría de Salud*. 2008: 82pp.

Shai I, Jiang R, Manson JE, Stampfer MJ, Willett WC, Colditz GA, Hu FB. Ethnicity, Obesity, and Risk of Type 2 Diabetes in Women. *Diabetes care*. 2006; July, 29(7):1585-1590.

Silander K, Mohlke KL, Scott LJ, Peck EC, Hollstein P, Skol AD, Jackson AU, Deloukas P, Hunt S, Stavrides G, Chines PS, Erdos MR, Narisu N, Conneely KN, Li CH, Fingerlin TE, Dhanjal SK, Valle TT, Bergman RN, Tuomilehto J, Watanabe RM, Boehnke M and Collins FS. Genetic Variation Near the Hepatocyte Nuclear Factor-4_ Gene Predicts Susceptibility to Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2004; April, 53:1141-1149.

Silva-Zolezzi I, Hidalgo MA, Estrada GJ, Fernandez LJC, Uribe FL, Contreras A, Balam OE, del Bosque-Plata L, Lara C, Velazquez.FD, Goya R, Hernandez LE, Davila C, Barrientos E, March S, Jimenez SG. Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 May 26; 106(21):8611-86116.

Sookoian S, Gemma C, Pirola CJ. Influence of hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha) gene variants on the risk of type 2 diabetes: a meta-analysis in 49,577 individuals. *Mol Genet Metab*. 2010 Jan; 99(1):80-89.

Sandoval BLA, Martínez MI. El SUIVE y la prevalencia de diabetes mellitus tipo II en México hasta la semana 13 de 2009 (segunda y última parte), Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiología semana 31 del 2 al 8 Agosto. *Epidemiología*. 2009, 26 (31): 1-4.

Stoffel M, Duncan AS. The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4a regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997, nov, 94:13209–13214.

Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW: Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*. 2005; 365:1333–1346.

Tusié Luna M, La genética de la diabetes mellitus tipo 2: genes implicados en la diabetes de aparición temprana. *Rev Invest Clín*, 2000; May-Jun, 52 (3): 296-305.

Van-Vliet Ostaptchouk JV, Onland-Moret NC, van Haeften TW, Franke L, Elbers CC, Shiri-Sverdlov R, van der Schouw YT, Hofker MH, Wijmenga C. HHEX gene polymorphisms are associated with type 2 diabetes in the Dutch Breda cohort. *Eur J Hum Genet.*, 2008 May;16 (5):652-656.

Velueta VL, Esquivel if, Vargas TAC, Arcos GDR, Boldo LXM, Cortés PJL, Sánchez BG, Matínez LMC. Estudio de los polimorfismos en los genes HNF-4a y HNF-1^a en dos poblaciones de la etnia Chontal del estado de Tabasco. 2004. Congreso Anual de la Sociedad Mexicana de Genética 2006. San cristobal de las Casas Chiapas del 25 al 29 de septiembre.

Wu Y, Li H, Loos RJ, Yu Z, Ye X, Chen L, Pan A, Hu FB, Lin X. Common variants in CDKAL1, CDKN2A/B, IGF2BP2, SLC30A8, and HHEX/IDE genes are associated with type 2 diabetes and impaired fasting glucose in a Chinese Han population. *Diabetes*. 2008, Oct; 57(10):2834-2842.

Wang JC, Stafford JM, Granner DK. SRC-1 and GRIP1 coactivate transcription with hepatocyte nuclear factor 4. *J Biol Chem*, 1998; 273:30847–30850.

Yamagata K, Furuta H, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Cox NJ, Fajans SS, Signorini S, Stoffel M & Bell GI. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4 alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature*, 1996; 384:458–460.

Yuan X, Chi T, Lin M, Evans JR, Dong Y, Bolotin E, Sherman MA, Forman BM, Sladek FM. Identification of an Endogenous Ligand Bound to a Native Orphan Nuclear Receptor. *PLoS ONE*, 2009; May, 4(5).

Zhou Z, Kang X, Jiang Y, Song Z, Feng W, Mclain JC, Kang J. Preservation of Hepatocyte Nuclear Factor-4a is associated with zinc Protection against TNF-a Hepatocyte in Mice. *Exp. Biol. Med.* 2007; 232(5):622-628.

Zhu Q., Yamagata K., Miura A., Shihara N., Horikawa Y., Takeda J., Miyagawa J., Matsuzawa Y. "T130I mutation in HNF-4alpha gene is a loss-of-function mutation in hepatocytes and is associated with late-onset Type 2 diabetes mellitus in Japanese subjects.. *Diabetologia*. 2003 Apr; 46(4):567-573.

XII.-ANEXOS

ANEXO 1.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACION EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN LA SALUD

México, Distrito Federal, a _____ de _____ del 2008.

Por medio de la presente acepto participar en el proyecto de investigación titulado:

“DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL GEN *HNF4- α* EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2”.

El objetivo de este estudio es “Determinar el polimorfismo del gen HNF4-ALPHA en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2”. Se me ha explicado que mi participación consistirá en estar de acuerdo que se me tome una muestra de sangre de 5ml, misma que será analizada en el laboratorio de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad, para la determinación de dicho gen.

Mi participación en este estudio no provoca riesgos, inconvenientes o molestias más que solo los propios que trae la punción para la extracción de la muestra sanguínea, mismos riesgos del cual ya he sido informado. El investigador principal se ha comprometido a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la presente investigación.

Entiendo que conservo el derecho de no dar mi consentimiento informado para participar en el estudio. El investigador principal me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de

que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma absolutamente confidencial.

1) PROPOSITO DEL ESTUDIO

Las tres complicaciones principales a las que se encuentran expuestos los enfermos son: retinopatía que progresivamente ocasiona ceguera; nefropatía, conduce a insuficiencia renal; y vasculopatía periférica, principal causante de cardiopatía isquémica, insuficiencia cardiaca y pié diabético. Estos padecimientos son, fundamentalmente, los responsables de la disminución en calidad de vida de estas personas. Actualmente hay algunos estudios a nivel mundial y en México donde se ha registrado que la modificación en ciertos genes entre ellos el HNF4-alfa aumenta la predisposición de las personas al desarrollo de esta enfermedad. Con la finalidad de contar con una prueba diagnóstico que nos permita identificar a aquellos individuos en riesgo de desarrollar la enfermedad, poder influir en sus hábitos de vida y evitar o retrasar la aparición de la enfermedad para ofrecerles una mejor calidad de vida, estamos trabajando en el protocolo de investigación titulado “**Determinación de polimorfismos del gen *HNF4-a* en pacientes con diabetes tipo 2**”.

Este es un estudio el cual se esta realizando en la Unidad de Especialidades Medicas del Ejercito y Fuerza Area Mexicana con aproximadamente 100 participantes (hombres y mujeres). El presente estudio tiene como finalidad identificar determinar las variantes del gen HNF4-alpha y establecer su posible asociación con el desarrollo de esta enfermedad.

Se espera que su participación voluntaria en este estudio , si tiene alguna duda su médico podrá darle la información pertinente.

relacionado con los exámenes de laboratorio y consultas programados durante el estudio.

11) ¿CON QUIEN CONTACTAR PARA MAS INFORMACION?

Puede obtener información adicional durante el estudio de:

(nombre y número de teléfono del investigador y/o médico)

Incluida cualquier pregunta relacionada con los derechos de los pacientes que participan en investigaciones biomédicas.

Yo, _____ (nombre y apellidos del participante):

He leído el documento de consentimiento informado para este estudio. He recibido una explicación de la naturaleza, propósito, y riesgos previsibles del estudio, y de lo que se espera que yo haga. Mis preguntas han sido contestadas satisfactoriamente.

PACIENTE

INVESTIGADOR

Grado, Nombre y Firma

Grado, Nombre y Firma

TESTIGO (1)

TESTIGO (2)

Grado, Nombre y Firma

Grado, Nombre y Firma

ANEXO 2.
MEXICANO

EJERCITO

ESCUELA MILITAR DE GRADUADOS DE SANIDAD
PROTOCOLO DE DIABETES TIPO 2 (HNF4-ALPHA)

FICHA DE IDENTIFICACIÓN:	
GRADO: _____	NOMBRE: _____
MATRICULA: _____	EDAD: _____ ESCOLARIDAD: _____
SEXO: (M) (H)	
SOMATOMETRÍA Y LABORATORIO:	VALORES AL MOMENTO DEL DIAGNOSTICO
PESO: _____ TALLA: _____ IMC: _____	
PRESION ARTERIAL (mmHg): _____	DIAGNÓSTICO: _____
CINTURA: _____	FREC.CARD.: _____
HbA1C: _____	GLUCOSA EN SANGRE: _____ GLUCOSA EN ORINA: _____
COLESTEROL: _____	LDL: _____ HDL: _____
TRIGLICERIDOS: _____	
TIEMPO DE DIAGNOSTICO DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2: _____	
DATOS PERSONALES	
DIRECCION: _____	
TELEFONO: _____	ORIGINARIO DE: _____
PADRE ORIGINARIO DE: _____	MADRE ORIGINARIO DE: _____
MEDICAMENTOS	
NOMBRE: _____	FRECUENCIA: _____
ANTECEDENTES PERSONALES PATOLÓGICOS	
ENFERMEDADES AUTOINMUNES: (SI) (NO)	TIPO: _____
RETINOPATIA: (SI) (NO)	TIPO: _____
HIPERTENSIÓN (SI) (NO)	
DIABETES: (SI) (NO)	TIPO: _____
CARDIOPATÍAS: (SI) (NO)	CUAL: _____
NEFROPATÍAS: (SI) (NO)	CUAL: _____
HEPATOPATÍAS (SI) (NO)	CUAL: _____
VASCULOPATÍAS (SI) (NO)	CUAL: _____
ANTECEDENTES HEREDITARIOS:	
TUBERCULOSIS: (SI) (NO)	TIPO: _____
HIPERTENSIÓN: (SI) (NO)	QUE FAMILIAR: _____
DIABETES: (SI) (NO)	QUE FAMILIAR: _____
TIPO: _____	
CARDIOPATÍAS: (SI) (NO)	CUAL: _____ QUE FAMILIAR: _____
NEFROPATÍAS: (SI) (NO)	CUAL: _____ QUE FAMILIAR: _____
HEPATOPATÍAS: (SI) (NO)	CUAL: _____
VASCULOPATÍAS: (SI) (NO)	CUAL: _____

ATENDIÓ

 GRADO, NOMBRE Y FIRMA

1861 TTAACCCCCA CCCCTCCCCG GCAGAGCCTC CACCCCTTCA CAGAGGCTAG GCCAAGACTC
 1921 CCAGCAGATC TTCCCAGAGG ACGGTTTGAA AGGAAGGCAG AGAGGGCACT GGGAGGAGGC
 1981 AGTGGGAGGG CGGAGGGCGG GGGCCTTCGG GGTGGGCGCC CAGGGTAGGG CAGGTGGCCG
 2041 CGGCGTGGAG GCAGGGAGAA TCGGACTCTC CAAAACCCTC GTCGACATGG ACATGGCCGA
 2101 CTACAGTGCT GCACTGGACC CAGCCTACAC CACCCTGGAA TTTGAGAATG TGCAGGTGTT
 2161 GACGATGGGC AATGGTAGGT GGGGGCAGAT GTGCCAGGT GTGCCAGTGG GGGCAGGTGT
 2221 GCCTGGGTCC AGGAGCAGAT CTTTGGCACT CAACTTTGGG GTGGGAGGAG AATGATACAA
 2281 AATGGTAGGT TGGTCTACA GGCCAGCACA GGTGTTGCCA AGTGAAGCCC ATGTGCCAG
 2341 GCACAGTGAT CACAGGCATT CTGGGTGAAG GGAGGCCTGC AAGGGCCAAT TTCCAGCAAA
 2401 AGTCGATCCC GGCTATTCTT CCCAGGCCCT TCCAGTCCTC ACTGCCTCAC AGTGGCTCTG
 2461 CTTGGCGCTT GGCACAGTGA CGTGATGGTG AGCTCCCCCT TGGTGCCCAG CTCCAGCGAT
 2521 TCAGCCCAGC ACGGCCCTT CGTGAACCC TGGGCCTAG GTTCAGAGAG ACGGCAAGGG
 2581 ATGTTGTATC CCTGGAGATG GTGGTTGGAG ACATAACCGC ATTTCTCGGT GTCTTTGGGA
 2641 CTTTCCTAGG GAAATGAAAT TGGCACTTAG GGAAAATGGA GCTCTCAGGG AAGTTTTGCT
 2701 AACTACGAAG CCAACTCAGC ACTGTGTGTG TTGTGTGTGC GTTCGTGTGT GATAGTGAGT
 2761 TTCCATGTAG GTTGTATGGG TGGGGTGATG CCTTCAGGAA CCCATTTGCA TATGTGTGTT
 2821 CATTGTCTC TGTGTGTGAG TTCTGGGTCT ATTTTCCTTT GTATTCATTG AGTGGGTCTG
 2881 TGTTTGTGTC TTAGGAGTTG CCCGTGTTGA TCTTGCTTAT GTATGTAAGT GTGTATGTGT
 2941 GTGTACTTGT GTCTGTGGAT GTTTGTACAT GTGTGCTGTG TGTGCGGGTC ATAGAGCACA
 3001 TGTGTTTGTG CATGCGGACC TGTTGGAGTG CCCTGTTCTT CCTGCATCTT TATCCTGTAT
 3061 GGGCGTTTTG TCGTGTGCC ATATTTGTAC CTGCTGTGTA TATATGCAGT TCCCTGTGCT
 3121 GCGGGCGGGG GTCAGCGGTC TCTGGTGTGC ACGACTGCAC AGACCCAAAT GCAGGACTCT
 3181 GTTGTGGCCA CTCACCAAGT GAGATTGATA TCAGCAACAT GTCCGTTTGT CTCTGAGCAG
 3241 ATTTTGTGTC CGCTGCGTCT CGCCAGATTG AGGCATCCCC TCCGACATCA CTGGAGCATA
 3301 TCTGGAGGGG TGGACAGTTC TCCACAGGGA GGTAGGGGAA AAGAGGAGGC CCGGAAACCC
 3361 CTCCTGGAGG GAAGAGCCCC ATCGGTCCCA GGCCAGCCTC AGAGGAGAGG GGGCAGGCAG
 3421 CTGGCTGAGG TCAGCCTGCC ACCCTGCTTC CTTCTGTGTC TTGGAGCCAC TCAGCCAGTA
 3481 TGAGGCTGCA GCTCCAGCTG AAGTCTGGAA TCTTGTGGTC AGCTCAGCTA GGGTGGAGGAG
 3541 GCAGCTGCTG GGCCTGCTT GTTGTGAGCT CAGCAGGTGC TCACCTGCCC CTGCCGTCCA
 3601 GTCACGTGTG ACCTTGGGCA TGTCACCTCC CCTATCCTGG CTTCTGTATC TTCTACAAAA
 3661 CAGGCTTCAT TCCCCAGGC CTGCTGGCTG GACGGCTTTT AGGCCTGTCT GAGGACCACG
 3721 CCAGGAGCGC AAGGCAAAAA CACACCAGAG ATAGCAAACA AGCTGCTGCT GCACTAGGTG
 3781 GAGTGTGTG TGGCCCCACG AGGACCACTG CCCTGCCCTG GGCTGCTCCC CGCCCCATC
 3841 ACTTTTTTCCA AGCCCAGGAA CTGTGTGCTC CTGAGGCAGA GGCCAAGCCC CTGAACTGGG
 3901 AGTCCCAAAG ACAAGACCAC CTCCAGCTCT GGAACCAGAA AGATCTGGGC TCAAATCCGG
 3961 CATAGATCCT TCCAACCTGT GTGAATGTGG CAAGGCAATT TCCTCTCTGA GCCTCAGTTT
 4021 CCTCACCTAT AAAATGGGAA TAAATAATAG TGTCTGTCTC CCAGGGCTGG CCAGAGGATA
 4081 AATAAGATGA GGTGCCTGGG TGCTTAGCCC TGGTAAAGGG CCTGGCCCCA CCATGGGTCA
 4141 TCTCAAGGGC TCTGAGCATC TGTAAGCAGG GTCCCCACAT TCCTCACTGG AGTTTGAAGT
 4201 GGTCTGAATT GGGGTTATGT GAAGTTGTCC TCTGAAGTGT TTTGAGTACA TCCTGGGCTG
 4261 GTGTCTGAAA GGCTCCAAGG ATATTTCTCC CCCGTCCTCT CCCCACCCCA ATGGAGCAGC
 4321 AGCCCTGGGT GGCTCCTTGT TCATTAGAGG CCCAGCAGAC ACCTCAACAT GTGTGGCACT

4381 GGCTGGAGTA GCCCAGCAAG CCTGGACCAT AAACCCATGG CTCTGCTTCA CGGGAAGCAG
4441 TGCGATGACA CCAGGAAGCC ACTTTTCCTC TCTAAGCCTC AGTGTCTCTCA TCTGTGGAAT
4501 AGAGGTGCTC GGCTGACCTC AGAGGGGAGA TGATAGAGCT GACAGCCCCC AGCCCATCCT
4561 GCCTCAGAGG TGGGAGCTAC TTCCCCAGCC TCCTGCTGAA TGGCCAGGAG CTGTGGGGGT
4621 CAGCTCTCCC CGGGGGTCGG GGGAGGAGAG GCCGAGGGAG AAAGGGCACC CACGTGGCTT
4681 AACAAATTATC CCCATCTCCA GGAATAATTC ACCAAGTGGA GGGGGCTGCA CTCCTGGGGA
4741 CACCTGGGAG TCTGCGATGG CAGAAATGAG ATGCGGCAGT GTCTGCTTGT GCAAGGAGCC
4801 TGGAAGTCTT CTGCTCCGAG AGTTTTCTTA TGTGGAAAAG TTTTTATTTT ATGAACACTG
4861 ATATAGTGCT TACTATGTGC CAAGCACTTC ACATACACAT ATGAGAATTC ACCGAATCCC
4921 CATAACGAAC CTAGGGGAAT ATCACGTTCC CCATTTTACA AGTGAGGAAA CAAAAGCATA
4981 GAGAAGTAAA CGAACACAGT CAATGTCACA CGGCTAAAAA GTGGGCAAGC TGGAATTGAA
5041 CCCTGGGCAG AAGGACTTCA GAGGCTGTGC TGTTACCTAC AGTGCATGGC CCTCTCTGGG
5101 TCTTAACTGG ATGCCCTGA GGAATCCAAG GTTGGATTCA GGATTTCTAT GAATACACGT
5161 GTGTGTGTGT GTGTCTGTGT ATGTGTGTAT GTTTGTGCAT GTGAGCATGT GTGTGTGGAC
5221 TGTGTGTATG TGTATGTATA TGTGTGGACT GTATGTGTGC ACACATTTGT ATATGTGTGT
5281 GTTGTATGTG TTGTATGTAT GCATGTGTGT GACTATGTG CAAGTGTGTG CAATGTATGT
5341 GGAAGTGTGT CATGTGTGGA CTGTGTGTAT GTGTGTGCAT GTGTGTGGAG CGTGTGTGTG
5401 CTTATGTGTG GACTCTGTGT TCATGTGTGT GACTGTATG TGTACACATG TGTGTATATA
5461 TGTGTGTGTG TGCCTGTGTC TGTGTGGTGT GTGGACTGTG TGGTGTGTGT GAACTGTGGT
5521 GTGTGTGTGC GTGACTGTGT GGTGTGTGTG CGCGTGTGTG TGACTGCTTG GTGTGTGTGA
5581 ACTGTGGTGT GTGTGGTGTG TGTGTGCTTG TGTGTGGTGT GTGTGCGTGT GTGGGAACTG
5641 TGTGGTGTGT GTGGACTGTG GTGTGTAAGG TGTGTGTGTG CTTGTGTGTG GTGTGTGCGT
5701 GTGTGTGGAC TGTGTGGTGC GTGTGTGTGC TTGTGTGTGG ACTGTGTGGT GCGTGTGTGT
5761 GGAAGTGTGT GTGCGTGTGT GTGCTTGTGC GTAGCGTGTG TGCCTGTGTG TGGACTGTGT
5821 GGCACACACG CTTGCATTTT CCCGGGGGCT GACCCATTGC ATTTGTTCATC TTCTTCAAAG
5881 GGGTCTATCT TTGCTGAAAG ATTTGCTGAC AAATAAAGGG GGTTCAGCTG CTGCTATTTT
5941 TTTAAATTTG GAAACAAATT TTTTAAATTT TTTAAATTTT TTAAATTTGG AAACAGACCA
6001 GTCAAAGTGC TGCCTTTTAT GGTTAGAGAA AATGAGGCCC AGAAGAAATT GAAGCAGGGA
6061 AAGCGAAGTT GCCCAAGTTT ACAGGCGAGT TAGTGGCAGC ATCAGCAGTA GTGCCAGGA
6121 CTCCTGGCAC CCAGCCCAAG ATCCTCTTTC CACCTGCCTC TACGGCCCCC CTCACATTTG
6181 TGTAGATGCA GTAGCTTTTG CCTGTGGGAT GGGAGGGATG GGAGATGTGT CCAGACCCTC
6241 CTAGGAGGCC ACATGAGTGT GACTGTTCTC GGCCCAAGTC TTTCTCGTTC CTCAGAGAAT
6301 TTGCGGGGCC CCTGGGCACA CAAGCTGAGA TCCACCCAGC CCTGGTCCCT TGGCAAGAAC
6361 TGAGGGACAG GACCTGGTTC TGGGGAAAAT GCAGGGGAAT GTTTCTCCCT TCCACAGCCC
6421 CTTTGCAGT TAGGAGGCCG GCTCCACCC CAGAAGGTGG CCAGGTTTTT ATGCCTTCTT
6481 AGAGAAAGCT GGGGCTCGTG GCCTCCACCA CAGGGAGACG CAGACCCTCA GAAACAAGTC
6541 TGTGAAGTCA CAACCAGCCC CAGTTTACAG ATGTGAAACT GAAGCTCCAA AAAGTCAGGA
6601 GGTCACTGAG TGGGGAGGTG ATGGAGTGGG AACAGCCCCC AGATCTGGCT GAGGCCGAAG
6661 CCCTGGAGAG ATCCCCGCAA GGCTCCCTTA GATGCCTGAC ATTCTGTTCT TCCTGAAGCC
6721 TCACTCCCTT CTCTCCTGGC GCAGACACGT CCCCATCAGA AGGCACCAAC CTCAACGCGC
6781 CCAACAGCCT GGGTGTGAGC GCCCTGTGTG CCATCTGCGG GGACCGGGCC ACGGGCAAAC
6841 ACTACGGTGC CTCGAGCTGT GACGGCTGCA AGGGCTTCTT CCGGAGGAGC GTGCGGAAGA

6901 ACCACATGTA CTCCTGCAGG TGAGGAGCCT CAATTTCTTC AGCTGGGAAA TGGGCACACT
6961 TGGGCTCATG GCCCCAAGGT CTGTCTTCTC CCTGAGTGGG TAGGTCCCAG AGACAGCTGC
7021 CCTTCAGGGC CTTCAAGGCT CTTCTGGTTT TGTA AAAAGAC TTTGTGAATC CAAGAAGAGC
7081 ATCTATTCTA GGAACCACAT TTA CTGATCA TCAAGCTACT GGCTGCCGTT TATTGAGCTC
7141 TTATCATATG CCAGGCACAA TACTAAGTCT TTGTGTGTAT TTACTCATCC CCTTGAGCCC
7201 ATTGTTCTTT TTCCATTCC ATGGGGCCTC TCCTGAAGCC TCAGTAGATG AGCCCGTCTT
7261 CCAGTCTGGT GCTGTTTTTTG GGACAAATAG GAGATTGACC CCAGGCCGTT CCACCTACCC
7321 CAGGGGCTTC CACCAACCCC AAAGTCTTCC CAAGGCCTTG GAGAGCCCTC TTTTCGAAAGC
7381 ATCTCCTGTT CTGGGTAATG ACAATAATAA AATCATAGCA GCTGTCAATT GCGAGCACTT
7441 GTCATGTACA AAGACTGTGC CCCATCGGCG CATGACTTCA TTTACCTGT CAACACCCCT
7501 GTGAGATGGT TACTGTTGTT ATTCCCATTT TATAGAGGAG GAAGCTGTGG CTTGGAGGGC
7561 TAGGCATTTG CCAAGGTCA ACCAGCTTGA ATCACTGGCA GAGCCAGGGT TAACATTCAG
7621 GGCCCCACCC ATCACCACGG TGTGGCACTG CCTCTACTTC CTATCCCCCT CCAGAGAGAG
7681 GCTTATGTGA ACCGAGTATT AACTCTGAGC CATAACCAGG AGCCTGCTAT GGGTTCTGAG
7741 CTTTTATAGG ATGTGGTGGA AATAGCAGGG CTCTGGTACT CCAGAGGTCA AGGTTCCCAA
7801 CTCAGCTCTA ACACCAACCA GCAGAGCGAC CCAGGACCAC ATGTTGCCTC TCTGAGCCTC
7861 AGTTTTCCCA TGTTTAGCAG GACAGGACTG GGCTCTTAGA GAGTTCATAG CACCTTTCCA
7921 GCTCCTGGTG GGTTC AAGAG AGAACTCCCG GGATGAAGAG ATGAGAGCAC TGAGGTTGGG
7981 GGGTCAACTG GATAGCCAGG GCCCTAGTTC TGTCCTAAGA GGAGGAAGTT GTGTCTTCTC
8041 CATCCAACCA TCCAAAGCCC TCCCCAGATT TAGCCGGCAG TGC GTGGTGG ACAAAAGACAA
8101 GAGGAACCAG TGCCGCTACT GCAGGCTCAA GAAATGCTTC CGGGCTGGCA TGAAGAAGGA
8161 AAGTGAGCCT CGGCCCTCCC CGCCCCACCA CCACTGCCCC ACCTGCACCC ACAGCTCCCC
8221 GACAGTCATT TACA ACTGTA GCCACACTTT ATGACTCAGT GGCAGGCCCC AGGGTGACTG
8281 GCTAATGGCT GAGAAGAGGG AGGGCCTGGA AATCTGACCA TAGGGAGCGG CTGGGCTTGG
8341 TCTTGAGAAA GATTCAGAGA GATAAGCTCC CACTCTTGGC TCCTCAGGCT CCCAGCAACC
8401 ACCACCCTG CCTGCCTGTC TGC GCCACCA CAAAGCAGCC ACGTTGTGTG TGTGTGTGTG
8461 TGTGTGTGTG TGTGTGTGTT TAATATAATA TTTCGAACAT TAGGACAAGC ATAGAGAATG
8521 ATATTGCAAA CATCTGAGTA CTCACTATCC CAACTTTACA AAAGGGACAG CCAGAGGAGC
8581 CCGATGCCTG AGCTTCCGGT CCCAGGGACA AATGCCCCAG TTCCCTTAGT ATTCATTCTG
8641 GGGTATCACG TGATCTCAA AGTCTTCACA TTCTAGAAAA TGGGAACAAG ACCCCAGACC
8701 CATCCTGGAC AAAGGAGGAG AAGACCAGAG CACAACATTT ATTAAGGTCT TGCCAGGCTT
8761 CCTGCTACCA GCAGGTATCA GTC ACTGGGC TGTGCTTTTT CCACACTTCA GTAGGTTGGG
8821 TTCATTTT CAT TTTTCATGACA ACCCTATATG GGAAAATGTT GTGAAAATGA AATGAGCCCA
8881 GCCCATTGAA CCTATTACAA TTCCTCCCTT TTTGTGGATG AAGGAACTGA GGCCACAAT
8941 GGTTAAGCAA CTTGCCTAGG GCCCCACAAC TGATCCTTGG AAGATCTGAA GTCCAGAGC
9001 TTCTGCTATT TGGACCACAC TTCAGCACTG TCTATTATTT TATGCTCTCC AGATAACCAGG
9061 GACATTTAAA ATTGTTTTCA GCCCAAGCAA GGAAGCAAA AATCTTTTAA CTGCTTTAAA
9121 GTA ACTTGAG GCCAGGCGCA GTGAATCAGG CCTGTAATCC CAGCACTTTG GGAGGCCGAG
9181 GCAGGCAAAAT CATTTGAGGT CAAGAGTTCG AGACCATCCT GACCAACATG GTAAAACCCC
9241 GTCTCTACTA AAAATACAAA AAAATTAGCT GGGCGTGGTG GTGCATGCCT GTAGTCCTAG
9301 C TACTCGGAA GGCTGAGGCA GGAGAATTGC TTGAACCCAA GAGGAGGCGG TTGCAGTGAG
9361 CTGAGATCAT GCCACTGCAC TCCAGACTGG GCAAGACAGC GAGACTCTCT CAAAAAAAT

9421 AAAAAAGTAA CGAGTTCATT TTCGAATCTC TTCATTTCTT GCTCCTCTAA ACTCAACCTT
 9481 TCCCAGCTCT GCGACTAGTC CCAGACCTTC CCTTCTAGCC CACAGTTGTG CCGTACCAGC
 9541 CAAACCTTGG TCTAGTCTCG CTAGTTGGGT ACAAACACCC CTCACCCCA TCACCCAGC
 9601 ACACCCAGAG AGCAGGAACG TAGGACCCAG CTTGCTCCAG GGCCCACTGA GAAGGAGGGG
 9661 AGGGGAGGCT TTGGTAGACT CTCTTTCCCC TGTATCTGCT CCTGGCCCCC TGTTTTCTCT
 9721 GCCCCCTCCC TTGGAAATAT CTTCTATGTC TCATCCTTAT GGGACCTTAG TCTGGGCTCA
 9781 TGAGCTGTCT TGGAAAATCT GGGCTTGCTG ATCCCGATGC AGGAGTGGGT GGTCCCAAG
 9841 GCCTGCTCTG AACGCTGCAA TTCTAACATC TAGATATCAG TGGTTCTCCA AGGGCAAGAG
 9901 GGGCTTTTTA AGCTGCAAAT ACTCCCTCCT CTCCTCAAAC CAGTTTTCAA TGGGGTTAAG
 9961 CCTGTCTCAT CCACTTCAAC TTCCATTTTG TGGACTGGGA AAGATTATGA ATGGGAACCT
 10021 GATGCATGTG TGAACAGTTG GAGGCAAGAA AAAGATTGAG AACTACAGTC TAAGGTTCCA
 10081 ACATTTCTGT GGTGTGATTA GTCAGTGATT CCATTATCCC AAAAGCCTAA GATTTTAGGC
 10141 ACTATGATTC CTCATAGGTG TCATCCAGAG GGCCTGTGT TTGAGAGAAC AGCTCTCTCA
 10201 CAGTGAAAGT TCAGGTCTGT GACAGGCAGA TGGGAGAGGG GTTGGCAGCC CTCCTGAGTG
 10261 GATGGCTACC CACCTCCACT GCGTGTGGCC TGGTCTGCG TGTGGTCAGT TGTTATAAAT
 10321 GTCTTTTATT AGACATCCAG AGTCATTTTC ACTTGTGTAA TTTAGGGACA TTTCTGTCTC
 10381 TTCTGGGCTC TAGTTTTCCC ATCTATAAAA TGAGGACATT GGATAATGAA CCCTTCAGCC
 10441 CTATGAGTCT CGCTCCTCAC TCCCTGACCT ACCTGCACAA GTCACACTGC CCACTAGGAT
 10501 GGGTGTGTTT GTTCCCTGGT CCCTTCTTTT TTTTTTTTTT TTAGATGGAA TTTGCTCTT
 10561 GTTGGCCAGG CTGGAGTGCA ATGGCAGTAT CTCGGCTCAC TGCAACCTCC ACCTCCTGGG
 10621 TGTGAGTGAT TCTCCTGCCT CAGCCTCCCA AGTAGCTGGG ATTACAGGCA TGTGCCACCA
 10681 CACCTGGCTA ATTTTGTATT TTTAGTAGAG ACAGGGTTTC ACCATATTGG CCAGGCTGGT
 10741 CTGGAACCCC CGACCTCAGG TGATCCGCTT CGGCCTCCCA AAGTGCTGGG ATTATAGGCA
 10801 TGAGCCACTG CGCCCGGCCC CTGGCCCTTT CTTGAGCTGC TGCAAAGCCA GCAAACCCCT
 10861 TACTAGGCTC CTGGAAGGGG GATGAGAGCC CCAGACCATT CAGCCTTAGC TCAGCCTTGA
 10921 AAATAGCTGC TTGCTTCTCG GCCCAGGGAA ACGGACATGC TGCCCGGAGG ATAGGAGAGT
 10981 TGGCTGATGG CGAGTGAGCG TGGGTTAGTC GATGCTAGTG TTTGTTTACA TGCCTGGGTT
 11041 ACCTGGAAGA TCATGACACA TGCAGTCACT TGGTTGTTTT GAGAACGGGC CAGAGTGACA
 11101 AAGTGTTTCA TTGCCACTGT GGTCAAGCCA TAGGAAATGA GGGTATTCTT AGCTGTGCCT
 11161 GTCTTCTAGG CCCCACCACC CCTCCTCAGC CTGCTGGGAA GCTCCCAAAG CCAAAGAAA
 11221 GTCTCGGTGG AAGTCTCACT GGCCAGGAGA GTTGGGACAA GTTTTTATTT CTTTTTCTTG
 11281 ATGACCTTAG GAGAATTTGA GGAAGTAAAC CCTAAAATAG TCCCTGAGAA CCAGAAAGTG
 11341 TGAGCTGGAA AGGTAGGATT TCAAGACCAG CTGAGTCTAT AAGAGGTCAT CAAATCTACC
 11401 TGCTCCCCAC TTTACAGAAG AGGACACTGA GGCTAGAGAG GTGATGTGAC GGGTCAGGGG
 11461 TGGAGTCAGG TCTAGAATC AGGCTCCCA GAGCTGAGCA GACACCAAGC TCCCTGGAGT
 11521 GAAACTTGCA GTGATCAGCT TGGGAGGCAC ATTTCTTGAT CTAGATGGCT GAAACTTTCT
 11581 CTCGACCACA GAGAGGGGCT TCAGGTCTCA TGGGCCTATA AGTCTCTGCC ACAGGATAGT
 11641 CCACCATGGC TGGAAAGGGC TCCCTGGAAG GCCAAAGAAT CCAGGGAGAA CCCTGGGGGT
 11701 CAGTGGGCCA ACAGCAGGTC AAGAATTCTT TCCTGCAACC GAAAGCCAGG GAGACAGACA
 11761 CCTGCCTTGG CCTAAGCTGT CAGGCCAGG ACAAATATTC GGCTCCTGGC ATCAAAAACC
 11821 CAGCCAGAA AGCGGACCCA GAGTTGCAGG AGGTGAGCGT AGGTGATGGG CCAGGGCCA
 11881 TCTGAAGAGG CCTTCTCGG AAGCCCCTGC CTGCTCCCC ACAGCCCCCT ACCCAGGAGT

11941 TCCCTGGGAA GACAGGCTCA TCACCTCTCC GCCTCTGCCC AGGTCGGTTA ATATTCAATA
 12001 GAAGTTACAT TAGGTCCCCG ACCCTGCTAA TACTGAGCAA ACATTTGGAA AACATCATTG
 12061 CGTGA CTGAG CTCGCGCCGG GCACTGATAA CGCCCGCTA ACCTTGAGGA GCCCTATCCG
 12121 CAGCTGCTGA CAGCAGCCCT TTCATTCCGC CCGCCGGCCA CTCGGCGCCC TGATGGGTGG
 12181 GTGCGGGTGC TGGCAGGAGG CTGCCGTGGG AGGGGTGTGG GCGGGTGGGG TGGACGGCCC
 12241 GGTGAGGGAA GCCGTGCTCT GAGCTGGCCC CGTCCACATG GTGGTCTGAG AGGAGGTTGC
 12301 TTGCTCTGG ACTTCTGTTC TATCCACTGA CTCCCGGGCT CAAGTGCAAA GGATTTGACT
 12361 TTTATTCTCT GATTTTAAACA ATGTGTCAAC ATCAAGAGAA AGTTGAATAG CTGGGGTGTG
 12421 AATGTTCCCT GGAGAAATAG GGTTCTTATA AGAATTAGAG TTTATGACCA GGTGTGGTGC
 12481 CTCGCACCTG TAATCCAGC ATTTTGTGAG GCTGAGTGA TCACTTAAAG CCAGTTTTTC
 12541 GAGACCAGCC TGGGCAACCT AATGAGACCC CGTCTCTCAA AAAAAAAAAA AAATTTAGCC
 12601 AGGCGTGGTG GCACACGCCT ATAATCCAG CTATTCGGGA GGCTGAGGCA GGAGGATCGC
 12661 TTGAGCCAG GAGGTTGAGG CTGCAGTGAG CTATGATTGC ACCACTGCAG TCCAGCCTGG
 12721 GCAACAAAAT GAGACCCCAT CTCGAAAAA AAAAAGAAAA AGAATTAGAG CTTGTCTCTT
 12781 CCAATGCCTT CGTTCTCTCA CTGCACAAAT ATTCATTGAG TACCTACTGT GAACCAGGCC
 12841 CTGTTCTGGT GGCTGGGACT ACAGCAGTGA ACTAGAGGGA TGGAGTTTTG GCCTTCTGAA
 12901 GCTTTCCTTC TCAGAGAGAG ACAGATAGTA AAGGAAGTAA CAAATAATTC TACAATAAGT
 12961 GACTTGAAGA AAAATAAAGC ATGGGGGGCA GGGCCAGGGT GGGAGTCATG TTGTGTTAGA
 13021 CAGGGTGGCT GGAGAGGGTG TCTGAAAGGC GACATTTGTG CAGAGGCAGG AGTCAAATGA
 13081 AGATGCTGCT GCGCTGTGCA GGAAAGGGAA CCCCAGGCAG TGACCACAGC AGCCTACAAG
 13141 CGTGCGGATG CGTCCAGGTG GGGAGGCGGG TTTTCGCGGA CAGAGTGTGT AGGGGGAAGC
 13201 CGGTAAAAGG TCGGATCCGA GAGGAGAGGA AGGGCCCTGG GGACTTGTGA GGTGGAAGG
 13261 CACTGGTTTT GAGCAGCAGG CGACATGACT TGAACGGATC CCTCTGTCTC TGAGAGGAAC
 13321 ACAGACTGCA GCGCAAGGC AGAAGCAGAG CCCAGGAGGA GGCTGATCTA ATCCAGGAGA
 13381 GACAGCGGGC CTGGGAGCAG GGAGGGAGCA GCAGGTCTGT TTGTGAGGAT CACGACAGCA
 13441 CTGGGGTGTG AGGGGAAGCC AAGGAAGGTG GCCAGGCTTG ATGCCAGTCC CTGAGACGAG
 13501 AAAGAGTGCA GGGAGCCGGC TGGCAGGGAA ATGCCTACGG GTAGGGAAAC TGAGCCCCAG
 13561 AGAGAGGCTG CGATTGCCAC CGGCACACAG AGTGGCAGGT TCCAGACAGG AAGCCGGGTC
 13621 TGGTGCAGCT TCAACCTCCC TCCTTTCTGA ATCAGCCAAG CCTCATTCCA CAGTGAGGCC
 13681 TCTTGGACTC CAAGGGCTAT CCCATCCACT GTCGGGATGG TGGAAGGATC ATCTTCTATC
 13741 TCAGGCCAGG ACTGACCCAG ATGGGAGCAG GCAGTGGAGC CTGGGGCCCC GGTGGGCGTA
 13801 GGCTCCAGAT CCCTCAGTGC CTGGAACAGA GCAGCAGTGG GAGGGAGGGA GACAGCGCCT
 13861 GGCCTTGCTG ATGCTGAGGT TAGTCTGGAG TACATGCAGC TCCTGCTGAT GGACAAAACC
 13921 ATCAAGGCAG TTGGAGCCCC CAGATCCTCT TGTTGAGGAA TCCCCAGGCC ATCTCCTTGT
 13981 CACCCAGAGT AATTTGTTTT GCTTGCTTTA CTCACTTTCA TTTGGAAAGA AAGGGACCCT
 14041 TTTGTAGACC AGAGCTTGAA CATCTTTAAG CTAGTCAGAT CCCCTCCTCA ATGCTCAAGA
 14101 CCAATTTTAA ACCCATAGCC GAGTCTTCAC TGTCTTGCGC GCCCCTGCTG ATGGGTGGAT
 14161 CACTCTTATA GCCTCTCCAT TGTGTTGGGG GCAGTTGTGA TATGTGGAAA GTTCTTCCAC
 14221 CAGCTGAGTT AGAGGCCATC TCCCCTCATT CCACATGCTG ATGTGGGCTT GTTCTCTGGA
 14281 CACCCCCAC CTCCTGCTCC CACTCCTCAT CAGTCACAGA CACCCCCACC CCCTACTCCA
 14341 TCCCTGTTCT CCCTCCTCAC CTCTCTGTGC CTCCTCACAG CCGTCCAGAA TGAGCGGGAC
 14401 CGGATCAGCA CTCGAAGGTC AAGCTATGAG GACAGCAGCC TGCCCTCCAT CAATGCGCTC

EXON 4
 (107nt) 35 aa
 nt 417 C>T
 (14381-14487)

14461 CTGCAGGCGG AGGTCTGTCT CCGACAGGTA CCGGGGTGAT CCTGCCACCC ACCCAGGGAT
14521 CCCCCACACT ACAGAGGAGC TCACCTCCTC CACCTCCATT CTCCCCAGCC AGGCCTGGA
14581 GCAGCTGACG GGAGGGGCTT CAGATATTAC AGAAGGGACA CTGAGTCCGG TTTCACATGG
14641 CCCAGTTTGC AGCAAGGGCA GGAATCGAAC CTGGCGCCCT GGGGCACTTT CTAATTCATC
14701 CTACTGCCTG CATCCCACAG GCCAAGCAGA GTCTTCACCT TCACTGAGGG CCTGCGATCA
14761 GCTCAGCTCC GAGAGAACAG AGCAGTGGCT CAGTGGAGAG AGGTGGCAAA GTGGGGCCCA
14821 GCCCTTCCCT TGCTGAGTGA CTTTGGGCAA GTCACAGCAC CTCTCTGAGC CATGGTTGCC
14881 TCATTGTCTAG AAAAGGATGA TGATTTTTTTG CCCTGCTTCT CCTCTAAGGC TGACAGACTC
14941 CTTGGGGCTC TAAAGCTGAC AGAGGAGGGG GCAGGGGGCA GGTAACAGGT GAAGGCACAG
15001 AGGGAGCCCT TCTCCCTCAT CCCTGCCTCC TCCCTCCCTC CGTTTTTACC CTGAGCTTCC
15061 TTCAGAGCTG GAGGGCACCC ACTATCCAGC CCCCTCCCA CATCTGATTC CAGGGAGGGG
15121 GCTCTGTGCA GGGGACAGAG AGTGCGGGAG GGCCCGGACA TCTCCAGCAT TTTCTTCCCT
15181 GTATCTCTCG AAGATCACCT CCCCCGTCTC CGGGATCAAC GGCACATTC GGGCGAAGAA
15241 GATTGCCAGC ATCGCAGATG TGTGTGAGTC CATGAAGGAG CAGCTGCTGG TTCTCGTTGA
15301 GTGGGCCAAG TACATCCCAG CTTTCTGCGA GCTCCCCCTG GACGACCAGG TGAGGATGGG
15361 CGTGGATGGT GGGCAGTAGT GGGCAGTGGG CGGGGCAGCC AGGGGGCTGC TGGCCACCT
15421 GGGATATAGC CGTGGACTGG CTTGATTTTA TTTTATTTAA CAAAATATGT AGTGCACACA
15481 CGTGTCTGAA ACTTTAAATC ACCTTACAAA TATTAACTCA GTTAGCTCCT CCAACAATC
15541 TATGAGGTAG GTACTAAGGT ACTATTATTA CTGCCATCTC ATAGGTGAGG AGATTGGGGC
15601 ACAGAGAGGT TAAGTAACCT GCTCAAGGTC ACATAGCTAC TATCCAGCAT AGCTGGGATT
15661 AGAACCTGGC AGGAAGCTCC AAAGTCCAAG CTCCTGACCA TTGTACCTGA GGCTCTCCCA
15721 GGGGGATGTT GACAGGGACC CTAGGACAGG GATCAGGAGA TTTTGGCTTA AGCTATGGCT
15781 CTAAGACTGG TTGTCTGCCT AATCCTGGGC AAATGAGTTC CTCTCTCTGA GCCTCAGTGT
15841 TCTCTTATCT GTAAAGTGGG AATGATAATA TCCACTTTAG AGTGTGGTTG GGAGGATTGA
15901 GGACATTGGT GTCTGAAAAG TACAAAAATC AGGTGATGGG GCAAGCTGCA CAGTGGCCAG
15961 ACCAGAGCTG GTCTCCCTAA ACATTAGTTT CTTCTTGTG TCCCACCAA ACGATTGAAC
16021 TCAGCATCGT GTTTCCCACC AAAACAATTG AACTGAGCAT CATATTTCCC ACCGTACATT
16081 TTTTTGGAAT ACTGAAATGT CCCTAGGGGG AAGAAAGGGT TGAAGGAAGG TGGCGTGTGT
16141 CTGAGGACAG ATGAATTTCTG GAGATGCCAC CTATGAAGCT CCTGCCCAGA GCACCCCTGG
16201 GCCTCCAAAG AGATGTTACC CATCTGGGGA AGAGGAGCTG GGCTGGGCCA CCTCCTCAGC
16261 TTCGGAGACA GACTCTGGTG CATTGCTTA CCCGTTTCGC ACCTTTGCAT AAGACACTGA
16321 CAATGCATGT GAGTCTGTGA AAGCTTCTGA GAAGTCTCGT CCAGGCAGTT GTTTGACTTT
16381 GCAGAGGCCG AGGCTTCTCA AACTCCTTCG GCAAGATTCT CCTGGAACAC CTATTAATAC
16441 TGCACATTGG GACACTGTGA AAACGCTGGT TTGGCTTGTC CCCAGCCTCA TACAGGGGCT
16501 GGACCCGGGG CCTCTTCCA TGGTTCCTCC TTCCATTAGC AGAGTCGACA GGGCAAGGAT
16561 CTTGGACAAT CCGCCCCTAC CCTCTCCCTT GTTCTTGTG CTCTGGCCCC AGTCCCCTCT
16621 GCTGGAGTCT CTACATTAAT GTTTAATCCC TCCTGTTTCT TCCCAGGGGC TTAGCAGGGC
16681 AACAAGATAC CCCCAACCTG AGCAATTGTT AACCTCGATT TCCCACCAA ACCTCCCTGG
16741 CTGGGGCTCA GAGCATTCTC AGAGAGCAAT GATGGGTGGC CAATAACACA GGACAATCAT
16801 TAACACACCA CCCCAGCTC CCGGCCACC CCCAGAACA GCTGCCATAT CAGGGGGTTG
16861 AACCTGGGAT CAGAAGGGTT CCCAGCTCCC CATTCTGGT ATATGAGGAG CCCAGCTTGC
16921 CCAATGCAGG TGGGGCATCC CTGGGAAAGT CGGGGGCATT GTCCTCCAAA GGGCTTCCCA

16981 ATTTTGTGGA CATTGCCCCA GAAACTAGAT TCCCAGTTGG TGTGCTTCTT GGGCCTGGAT
17041 ACAATTGCAG AAAGAGATTG GGGCTTAGAG AGAGACAGAA ATTTGCCTGA AGTCACAGAG
17101 CAAGTTAGCG ACAGAACTGG GATTCAAATC CAGGTCTTCC GCTTCGCGAT GTGAAGGCCA
17161 CTGGAGTGAC TGATGAAAGA CTTGCACAGT GCCCAGTGCG CAGGAGGCGC TTGGCAATCA
17221 GCATCCTCGG CCTCCCTCCA TACTGGTCAT GGAAAGTGGA TTTTCCCTCC CAGGCAGTTT
17281 CCTCTTTTTT TGTTTTCTTC ACAGGTTTCT ATCCATGGGG AATAGAAGGG GCAAGGACAA
17341 GTGGCTGCCC AGGAGCAGCT AGAGCTAGAG AGGAAGTCAA GATGTTTGCT CATTCAATCA
17401 TTCATTTCCC CTTTCCTTCC TTCATTCAA TATTTATTGA AGGCTTATTT TGTGCCAAAT
17461 ATCTTCAGAC AAATGCCTTC TTTCTCTAA CAACAATTT ACCTCCTTAG AGGCCTTCTC
17521 TGACCTCCCC ATCTAACGTA GCCATTCTTG CCCCATTGCT CTCACCATCC TTTCCACTCC
17581 CCTCCCTCCC TCCTTCCCTT CCTCCCACCT TTTCTCCTTC CTTCTTTCTT TTATGCTGTG
17641 ATCACCTGTG GTCCTCTGTA CTTATTTGTT CTCTACTATC TGTTTCATCT CTCTCCTATA
17701 AATGTTAGTT CGATGAGATT AGAGACCTTG TCTCTCGTTT TTAAACATTG TGCCTCCATT
17761 GTCTTAAAAA GTGTCTGGCA TTTAGTAGGC ATTTAGGATT TGATAACTGA AAGAATGAAC
17821 AATCAAATTA ATGAACAAAC AAAGGCATTT TAACCTTCTA GTTTGGCTTG CTATGGAACC
17881 TCCAACTCC CTAACCCAAC CTTGAAGATG AGAAGATGAG ATCCTTGAGG CTACCAGCCT
17941 GGTGCTGTTT TGTTTCAAGC CATCCTTTGG TCCTCAGGCA AGCACTAAAG CAGATGGCTC
18001 TCAGTGGGCT GGCTATGTCC TTCTGTGAGC TTGCTGGGCC CCTACCTATG ACTCCAGTCT
18061 TAGAAGTCTT GCCTTGTACC CCCTGCAGAG AAGGGTTTCA TCAAGCTGAT TCTCTGCCAG
18121 GGGCCAGTGC TCATACATTT GCTCTGAGAA GGACCAGCCC TGAGACCTAA CATCCACATC
18181 CAAGTTCTTG TAATGCCCTC TCAGAATCCT GGAGTCCTGC AATGTCGATC CCTGGAGGGA
18241 TCTGCCAGAC CAATGATTTT CCAAACAGAA TTGCACTTCA GAGTCAACTA TGGAGCTTTT
18301 TAAACACAGA TCCCTGGGCC CACCCTAAAC ATACAAAATC AGGATCAGAA TCTCAGGGCC
18361 TAAGAATCTG TATTTTCAGG CCGGGCGCAG TGGTTCACAC CTGTAATCTC AGCACTTTGG
18421 GAGGCTGAGT TGGGCTGATC ACCTGAGGTC AGGAGTTCGA GATCAGCCTG GCAATATGGT
18481 GAAACCCCGT CTCTACTAAA AATAAAATTA GCCAGGCATG GTGGTGCACG CCTGTAGTCT
18541 CAGCTACTCT GGAGGCTGAG GCACGAGAAT CACTTGAACC TGGGAGGCGG AAGCTGCAGT
18601 GAGCCGAGAT CATGCCACTG CACTCCAGCC TGGGTGACAG AGTGAGACTC TGTCTCAAAA
18661 AAAAAAAAAA AAATAGAATC TGTATTTTTA CAAAGCACCC TTCATAATTC TCCATAGCTG
18721 GTCCATGGGT GGAATTTTGG GACCCACAGT TTTGGAACCT TTTGGGATCA TAGACCTTTT
18781 TGAGAATCTC AAAAAAGAAA AAAAAAGCAC ACAGAATGTT GCTTACAGTT TCATCAGGCA
18841 CACAGAAGAG GCCCAGCACG AAGCAGTTTC TTGCCCAAGG ACACAGCAGT TCAAGGACAG
18901 AGTCAGCGCG AGGTCTCTCA GCTCTGAGCA CATGTTCTTT CCCCTTCCAG GTTTCTAGTT
18961 TTATGGGTAG TAGTTTTATG ATGCCCATTT CACAGTTCAG GCAGGTAGAG GCAGAGGGGA
19021 GCATTAAGCT GACTTGCCCA GCGTCACTGA GTTGGCTACG GGCAGCCTTC CCAAGGGTAC
19081 AGATGGCAAA CACTGTTTCT TCTCTCTTTC AGGTGGCCCT GCTCAGAGCC CATGCTGGCG
19141 AGCACCTGCT GCTCGGAGCC ACCAAGAGAT CCATGGTGTT CAAGGACGTG CTGCTCCTAG
19201 GTGAGGCGGC TGCCTGCCCT GGCCAGGGCT CCAGGGAGGG TATGCCTAGC ATGGCACTCA
19261 CCCAGGCAAG GAGATTCACA TGGTGGCATG CAAGGGTGAG GGAGACTAGT CAGGAGTGGC
19321 CCTGTCTCA GGCTTGCAAT AGAGGGCTCC AGGACTCAGT TTTCAACTGG GTACCCCACT
19381 CAGATGCAAG GAAATGTGGA TGCAAGTCAC CAAATCCCA GCATTGAAGT CAGAGCACGA
19441 TCAGGGTTAT CCCTGGAATT ACCTGTGCAT CCTTTTTTCT TTTGACAGAG TCTTGCTCTG

19501 TCACTCAGGC TGGAGTGCAA TGATGTGATC TCGGCTCACT TCAGCCTCCA CCCGCCACGT
19561 TCAAGCAATT CTCCTGCCTC ACCCTCCAGA GTTGCTGGGA CCACAGGCGT GCACCACCAC
19621 ACCCAGCTAA TTTTTGTATT TTTAGTAGAG ACAGGGTTTC ACCATGTTGA CCAGGCTGGT
19681 CTCAAACCTCC TGGCCTCAAA TAATCCACCC GCCTCAGTCT CCCAAAGTGC TGGGATTACA
19741 GGTGTGAGCC ACCGCGCCTG GCCTACCTGT GCATTCTGAT GTTCTTTCTG GAGTAGGAGC
19801 AAGAGGTGGT TAAGAATGGC ACAAAGCCCC AGCCCGCGTC ACCTGTGCCT TCATGGCATA
19861 GTTATTATTT TAAACGCTTG TACAGCACAC ACTGTGTGCC AGGGACTGTG CTCACTGCTT
19921 TGCAAACACT ACCTATTTTA ATATAACAAT GCTATGAGGG AAGCTCGATT ATTTATCCTC
19981 ATCTTATAGA TAAGAAAACCT GAGGCACAGA GAGGTTAAGT AACTTATCCA ACTATAACCA
20041 GCTATCAGGG GCAGAGCCAT TTAAGCAGGG CAGTGCAGTT CCAGAATCTG GTCCTTTAAC
20101 CTTGATGCTT TGGTGCCTAT CAGGTGACCT TTGAATGTCA TCGATCTTGT GAGTCATGTT
20161 GGTAAATGGA GCTTGGGTCA TGTGAAAGAG GTCCTAGAAA GCCAAGTTCC AAGCTCAGCC
20221 GGATGACTCA AGGCAGCTTA TCTTCTGAAT CTGGGCCTCA GCTTCCTTAC CTGTGAAATG
20281 GGAGTCACCA TCCCTGCAGG TCCTCCTCCC ACAGGCACCA GCTATCTTGC CAACTTAAAA
20341 GCCAAACTA GAGGAGAGGG GTCAACCCAA GGTGACTTCC CATCCTCCCT CCCTCCCAAC
20401 CTTCCAGGC AATGACTACA TTGTCCCTCG GCACTGCCCG GAGCTGGCGG AGATGAGCCG
20461 GGTGTCCATA CGCATCCTTG ACGAGCTGGT GCTGCCCTTC CAGGAGCTGC AGATCGATGA
20521 CAATGAGTAT GCCTACCTCA AAGCCATCAT CTTCTTTGAC CCAGGTACAG TGCACACCTC
20581 CTAAGCCATC CCTGACTCTC TCTCCAGAAC GCTCTGCCAG ACTTCTCCTA TTGGGTTCTG
20641 TACTACTGAGT TCACAGCCTC ATCTCATGTT AACGACAGCC AGGAGAGGCC GTTTTCATTT
20701 AACAGATGAG GCAAGTCAAG ATTTGAAGAG ACAATATGGC CGGGCGCAGT GGCTCACACC
20761 TGTAATCCCA GCACTTTGGG AGGCTGAGGC GGGCGGATCA CCTGAGGTCA GGGGTTCAAG
20821 ATGAGCCTGG CTAACATGGA GAAACCCCAT CTCTACTAAA AATACAAAAA TTAGCCAGGC
20881 ATGGTGGTGC ACGCCTGTAA TCCCAGCTAT TCGGGAGGCT GAGGCAGGAG AATTGCTTGA
20941 ACCTGGGAGG CGGAGGTTGC AGTGAGCCAA GATCCCAGCA CTGCATTCCA GCCTGGGTGA
21001 CTCCATCTCA AAAAAACAAA AACAAAGGGA GGATATGACT TGACAGGGCA CCCTGACTCC
21061 AAAGGCCTGG GCTTTCCCTT CTTTTACTTC TTCCCTCCAT CCTTCTTTCT CTTTTACTTC
21121 CATCTTCTC TTTTCTTTCA TATTTGCTTC TTTTCTCAA AAAAATTTAT CAAAATAATA
21181 TCTAGAACCG GATGTGGTGG CTCACATCTG TAATCCCAGC ACTTTGGGAG GCAGAGGCAG
21241 GAGGATCACT TCAGGCCAGG AGTTCGAGGC CAGCCTGGCC AACATAACAA GACCTCGTCT
21301 CTATAGAAAC TAAAAAAAT TAGCCAGGGA TAGTGGTGAG CACCTGCAGT CCCAGCTACT
21361 CGGGAGGCCA AGGTGAGCAC CTGCAGTCCC AGCTACTCAG GAGGCCAAGG TGGGAGGATC
21421 TCTTGAGCCC AGGAGGTGGA GGCTGCTGTG AGATGTGATT GCACCACTGC ACTCCAGTCT
21481 GGGTGACAAA GCAAGACCTC ATCTAAAAAA TAATAATAAA TAAATAAATA AATCTACACA
21541 TACTTAAAT GCAAATACTT CTCCCCATCC TACTTTTCCA GCTCTAAGTC TACTCCCCAA
21601 GAGAAGCATG TCTGATTATT TTAATTGTTT CTTCTGGCAG TTTCTCAAC AATTCTAAAT
21661 GAAAGACAAA GCCTTATATT TGTTGATGCA TCCATTTTGG ATCATAATGT TCCTCCTAGG
21721 ATGGCAGAGG ATTTTGCTTT TCTCCATCAC CATTCCCATC TTTTCTTCCC CATTTTTCCC
21781 AATATATTTT TATTGCTATT TTTGAGTCTC TGTTGCAAGT TATGTGCTTT TATCTTTCTC
21841 TTCTTGTTCT ATCAACTGTA GACGGTATCT CCCAACCTT CACATTGCAG GATGAAGAAA
21901 AAGCATTCTT ACCCTCTCCT GTGGCTCTTG GCTCTCCTCT CCCATTCTG TCCACTGACT
21961 TTTGCACCTG CATTTATACA GAATGCATTT GTCATCAGTC TTTGTACAAA ACTTGCTTTT

22021 GTTTCACAGC ATCAAAGGTG CCTGAACTCT GGAGGCTTGC TTGCCTTCCC TGCTTACATG
 22081 TTAGAGGGGA CCTACTGTGT GCCAGGCACT GTCCTTCACG CTGCAAATAG ATTACCTCTA
 22141 GTAATAATAG TAATGAAAAG GCTGGGTGTG GTGGCTCACG CCTGTAATCC CAGCACTTTG
 22201 GGAGACTGAG GCAGGCAGAT TACTTGACGT CAGGAGTTCA AGACCAGCCT GGCCAACATG
 22261 GTGAAACCCC GTCTCTACTA AAAATACAAA AATCAGTTGT GTGTGGTGGT CCGTGCCTGT
 22321 AATCCCAGCT ACTCAGGAGG CTGAGGCAGG AGAATCGCTT GAACCTGGGA GCGGGGGGTT
 22381 GCAGTGAGCC AAGATCATGC CATTGCACTC CAGCCTGGGC AACCAAGAGCA AAACCTCATC
 22441 TCAAAAAAAT ACATATATGT GTATATATAT ATAATATATA TTATATATAT ATAATATATA
 22501 GTGATATATA TAGTATATAG TGATATATTA CGTATAATAT ATATTATATA TAGTGATATA
 22561 TATTTTATAT ATATATAGTG ATATATATTA TATATAGAGA GAGTGATGAA GTGGAAGATG
 22621 AGCCCCATGT ATTGAATGCT CCCTAAAGAG CTGTTTTTAA ACACTTTATG TGGATTGTCT
 22681 TACTTACCAA CATGGTACCT GTGAAGTAGG AATTATTATT ATCTCCATTT TACAGATAAG
 22741 GAAACTGAGG CATGATTAAC TTGCTCAAGG TCACACAACC GGAAAATGGC AGAGCTTGGG
 22801 TTTGAACTTC AGACCACCTG TCAATCCCAA TTTCTCTCTC TCAAGCCCAC ATTCTTACCT
 22861 ACCACCTGCT ATCCCACACT TACCAGAGGG TGAGATTTCT AGTTCTAGTT CCCTCCACAG
 22921 CCTGGCCCAG CCTGTATCCT CTGTAGTGCT CAACACGAGG CTGGACTGGC AGAATTGTTC
 22981 TGCAAATGG GAAGGATCAC TGATGCTGAG TCAGAGGCAG CAGCCTCCAG CAATTTGAAG
 23041 GGGCGGGGGA CCTAGTTCAA GGCCTGGCAT GCAGGAGGTG CTCAATAAAC ATGTGTGGCC
 23101 TGAATGAACT AATGAATAAG CATGATTCAG TGGAGACAGC CCACTAGAAA TGTGGGTGAA
 23161 TGTTCTTTCT GCCACTTCCT TTGTCCATGA AAGAGGAAAT AAATGCATTA CCTCCATGAA
 23221 GGTTGAGATT AAATATTGTA TGACCGCTTA AGTTCCTTTC TAGGCTAAGG ATCTAGAATT
 23281 TATTCACTGA TTTTTTTTTT ATTCAATCAT CCAGCCATCT AACAAAAAAT ATACATATAG
 23341 TTATCAATAA ATATATATTT ATATATAAAT ATATATTTTT TAAAAATATAT ATATATATAG
 23401 TCTGTCACCC AGGCTGGAGT GCAGTGGCAC CGTCTTGGCT CACTGCGACC TCCACCTCCC
 23461 AGTTTCAAGC GATTCTCCCA CCTCACCTCC TGAGTCGCTG GGATTACAGG CATGTGTCAC
 23521 CACGCCAGGT GAATTTTTGT ATTATCAGTA GAGATGGGGT TTCACCATAT TGACCAGGCT
 23581 GGTCTCAAAC TCCTGACCTC AAGTGATCCC CCCGCCTCGG CCTCTGACAG TGCTGGGCTT
 23641 ACAGGCATGA GCCACCATGC CTGGCCCTAT TCAATAAATA TTGACTATGC ATGGTGCTAG
 23701 GTGGTGAGTT TGAAAAGGCA AAGGCCGGGT GCAGTGGCTC ACGCCTGTAA TCCCAACATT
 23761 TTGGGAGGCT GAGGCAGGCA GATTACTTGA GGTGAGAAGT TTGAGATGAG CCTGACCAGC
 23821 ATGGTGAAAC CCCGTCTCTA CTAAAATACA AAAATTAGCT GGGTGTGGTG GTGTGTGCCT
 23881 GTAATCCCAG CTAATCGGGA GGCTGAGGCA GGAGAATCGC TTGAACCCAG GAGGCAGAGG
 23941 TTGCGGTGAG CCGAGATCAC GCCACTGCAC TCCAGGCTGG GGGTCAGAGG GAGACTCAGT
 24001 CTCAAAATAA AATAAAATAA AATAAAAATG GCAAATAAGA CATAACGCTG CCCCTGCCAA
 24061 ACTCACAGTT GGATGGCACA ACAATTACAT CCTGTGTGGT CAGCAGTGAT GGAGGGCCG
 24121 CAGAGATTTG GAAACAGGAG GGACACAGGA TACAGATATA GGAGGGTAGA AGGCAGACTT
 24181 CCTGGAGGAG GTGAAACCTA ACCTGAGTCC CTAAGGTGAT AGGAAGCAGG AACCAGGGAA
 24241 GGGGAGCCTA TTCTAACACA GTAGAAGCAG CAACTGCTGA GGTCTGGATG AGGGGACCTC
 24301 AACTGTGGCC CAAAACCCCA AGTTCCCATT GTGGCTCTGC CAACAACCTG CTGTGCGACC
 24361 CAGGACAAGT CCTATCTTTG CACTGTGTCT GGGTTTTCCC GTGTGTAAGA TGAGGCGGTT
 24421 GCTAGGTGCT TATTGGATGC ATTCTCAAG TCCCGCCCTC CATCTCCTAT TCCCCTCTCT
 24481 TCTGGTTTGT TGCTTTAGGA AATGTGGCAG AAATCTTTTT CTGCCTGTGT CTAGGAAATC

24541 ATAATTCATG CTGGCGTACC CTGGTTGTTG AGGTCCCTGA ATCCTTGTGC CCACACTGCT
 24601 GAAGACTCCT TGTGTGACAC AAGTCAGGGG ACATCTGGGT CTTGACTCCC CAGATGCTCC
 24661 AGCTGGACCC TGCTGCCCTC CTTGCCCCAC CCTCTTCCAT TGTAGATGCC AAGGGGCTGA
 24721 GCGATCCAGG GAAGATCAAG CGGCTGCGTT CCCAGGTGCA GGTGAGCTTG GAGGACTACA
 24781 TCAACGACCG CCAGTATGAC TCGCGTGGCC GCTTTGGAGA GCTGCTGCTG CTGCTGCCCA
 24841 CCTTGACAGG CATCACCTGG CAGATGATCG AGCAGATCCA GTTCATCAAG CTCTTCGGCA
 24901 TGGCCAAGAT TGACAACCTG TTGCAGGAGA TGCTGCTGGG AGGTCCGTGC CAAGCCCAGG
 24961 AGGGGCGGGG TTGGAGTGGG GACTCCCCAG GAGACAGGCC TCACACAGTG AGCTCACCCC
 25021 TCAGCTCCTT GGCTTCCCCA CTGTGCCGCT TTGGGCAAGT TGCTTAACCT GTCTGTGCCT
 25081 CAGTTTCCTC ACCAGAAAAA TGGGAACAAG GCAATGGTCT ATTTGTTTCTG GCACCGAGAA
 25141 CCTAGCACGT GCCAGTCACT GTTCTAAGTG CTGGCAATTC AGCAAAGAAC AAGATCTTTG
 25201 CCCTCGGGGA GGCTGTGTGT GTGTGAGTAT GTATGGATGC GTGGATATCT GTGTATATGC
 25261 CCGTATGTGC GTGCATGTGT ATATAAAGCC TCACATTTTA TGATTTTGA AATAAACAGGT
 25321 AATATGATAG AGTTTAACTG AAAAGGAATC CTCTTTAGAT AGGGGAGGCC ACAGGAGACC
 25381 TCTCTGAAGT GGTGACTCTT GTGCTAAGAC CCTAACGGCT GAAAGGAAAT GGAAGGCTTA
 25441 AAAGACAAGA GAGGAATATT CCAAGAAGAA GAAACTACTT CAAGGGCTGC GGATAGGAGA
 25501 GAGTGTGTG TTTGAGAAAG AAGGGCAAGG TTGTGAGATG GAGGACGTGT AGGAGGTGAA
 25561 GATGGAGATT GGGCAGAAAC CAAATCATAA ACATATGGCT TTGTCAGCCT TTTCAGAAAT
 25621 TTGGATTTTA TTCTCATTGC AACTATTGTA AGGAGAGTGA AAACCAGACT AAGTATTTTT
 25681 ATTCTTTGAG ACAAAAGTCTC CCTCAATCAT CCAGGCTGGA GTGCAGTGGC ACAATCTTGG
 25741 CTGACTGCAA CCTCCACCTC CCGAGTTCAA GCAATTCTCC TGCCACAGCC TCCTGAGTAG
 25801 TTGGGATTAC AGGCGCCCCG CACCACGCC TGCTCATTTT TTTATATTTT TAGTAAAGAC
 25861 AGGGTTTTAC CCTATTGGCC AAGATGGTCT CAAACTCCTG ACCTCAAGTG ATCACCCACC
 25921 TCAGTCTCCC AAAGTGCTGG AATGACAGGT GTGAGCCGCC ACACCCATCC CAGACTAATG
 25981 CTTCAAACAA ACCACTCTGT TGGGTAGAGA GTGAATTGCA GATTCTCTGAG AATGTCCTG
 26041 TCTCCAATCA TGTGATGGAT GATGGAGGCT TGGACCCTGG CAATGGAGCA GTGAAGATAA
 26101 ACCTGATCAT CTATTTGGAG GAAGAGCCCA CACCCACAGG ATTTGCTGAT TGATCAGACA
 26161 TAGGGAGTGA GAGAAAGAGG AAGAGTCAAG GACAAAGTCT ACATTTTTGC TTTGAGTAGC
 26221 AGAAATGACG ATGGAGTAAT TTAAGTAAAT GAGGAGGACA GAATAACAA CAAGACACTG
 26281 GGTCTGGGGG TGGTAGTGAG GGGTGACCTC AGAGATCCAT TGTGGACCCT CTTTTCTTTT
 26341 TTCCTTTTTT TTTTTTTTTT GAGACGAGAT CTCTCTCTGC CACCCAGGCT GGAGTGCAGT
 26401 GGCACAATCA TAGTTCCTG TAGCCTCAAC CTTCCAGGCT CAAGAGATCC TCCTACCCCA
 26461 GCCTTTCAAG TAGCTGGGAC TACAGGTGCG TGCCACCACA CCCAGCTAAT TCTTCATTCT
 26521 TATTTTTTAT AGAGACAAGG TCTCACTATG TTGCCCAGGC TGGTCTTGAA CTCCTAGCCT
 26581 TAAGCAATCC TTCCGACTTG GCCTCTCAA GTGCTGGGAT TACAGGTGTG AGCCACCATG
 26641 CCCAGCCTCA TTGTGGACTT TCATTAAGCA TGAGATGACT ATTACAAATC CAAGTTATCA
 26701 AGGAGGCTGT TGAATGTATG AGTCTGTTGC TCAAGCACAA GATTAAAGGC AGCTCTGTGG
 26761 AATCAGGGGG AAGATGGAGC CATGGAGGGA AGGGAAGAAG ACTGGCCAGA GGGGTAGGAG
 26821 AAAACCAGGG CAATTCCAGA ATCCAAGAGA AGAGCGTGTT TGAAGGACAG AGTGTTTAAT
 26881 GGTGTTAAAC TCTACAGAGA AACAGAAAGA AGCGGGGAAG AAAGGAGAGG TGAAGAGAGG
 26941 AGGGGAAGAG AGAGGAAAGG GTCCATTGGA TTGACAGCTG GAGGCTCTTG GCAATTGTGT
 27001 TGAAAGCAGC ATCAGAGAGC TGGGAGAGTG GAAACCAGAT TGGAGAGTGC TCCAAGAGA

27061 GTGAGTGGGA AGGTGGAGAT AGAGTAGATA ACCCTTTGAA ATGGTTTGAC TATGAAGGGG
 27121 AGTATGAAGG AGTTAGGATG ACTGCAAGGG AGTGATTAGA ATGATAGGTC ATGGAGTCTG
 27181 GGCTGCACTC AAAAAGAAAT AAAGATAGAG GCCGGGCACG GTGGCTCACA CCTGTAATCC
 27241 TAGCACTTTG GGAGGCCGAG GCGGGTGGAT CACTTGAGGC TAGGAGTTCA AGACCAACCT
 27301 GGCAACACAG CAAAACACCA TCTCTACTAA AAATACAAAA AAAAATTAGC CAGACATGGT
 27361 GGCATGCACC TGTAATCCCA GCTACTCGGG AGGCTGAGGC AGGACAATCA CTTGAACCCG
 27421 GGAGATGGAG GTTGAAGTGA GCTGAGATCA TGACATTGCA CTCCAGCGTG GCGGACAGAA
 27481 CAAGGCTCTG TCTCAACAAC AACAAACAAA GGATGGGGTG ATAGTGAAAA GAGAGTGTCA
 27541 GTGAATTGAC AGTCTCAGTA GGGCTGAAGA ATTTTTGCAG CGATGGTATT AGATTACGGG
 27601 AGCTGGAAGG ACATGAGGTG AAGTCAAAGT GGGGATGTTG AATTCGAGAT TTTGGAGGTG
 27661 TTTTCAGTGAC TGAAGATGAC AAGGCGAGGG TGAGGTTTCT CAACATTGGT ACTATTGATA
 27721 CTTGGAAGT GACAATTCTT TGTTGTGTGG GGCTGTCTCTG TACATTGTTT AGCTGCATCT
 27781 CTGTCCTGTA CCCATAAGGT GCCAGTAGCA CTTCTCCAGT GGTGACAACC AAAAATGTCT
 27841 TTGGATATTG TCAAATGTCT CCTGATGGGC CAAAATCATC CCCAGTTGGG AATCGCTGTT
 27901 ATGTGATAGC TCATTTTCATT CTCACTTTGA CCCTGTGAAC ATGGGGTTAT TATGAATCAG
 27961 GTGTCATTGA GATCAGGATC AGGAGCCTGT GGTCTGTTGC CAAATAATTA AGAGCTCTCT
 28021 GGGCTCAGTT GTCTCATCTG TAGAATGGGC TAATAATAGT ATCCATCCTA TAGGATTGCT
 28081 GTGAGGATTA AATTATGTGA AACATGGGAA GTGCTATACA ACAGTACCTG GCACGTGATA
 28141 ATTGTTAATT ATCAACAATT GTTATTTATC ACTGAAATAG ATGTACTGTA GAGATCGCTT
 28201 GCAAGCGTTG AAATTCCATC ATCGTCATAT TACTCACCAT AGGCTATTAT TAAACCATAT
 28261 CCCATGTGGT ATTTTTACTC CCTGACATAT GTTTGAAGCG GTTACTGTGT TCCAGACAAT
 28321 CTGCTAGGCC CTCAAAGAAA GAAGAAAAAT ACCTCTGAAA TTGTAATGCT CATAGACAGA
 28381 AGAAGTGGTT GTTCTTAAAA GTTGTGTTAC AGACAAATTA CTATGAGAAA TCCAAGGAAG
 28441 GAGAATCAGG AGAGGCTTCT AAAGAGAGGA AATATATGAG CTGGGATTTG GGCTTATGGA
 28501 CATGGAACAG GTTTGGGGTG GAAAAACATC TCTGACAGAA GCAACAACGT GAGCAGAAGC
 28561 ATAGAGATAG AAAAACACAG GGGACACATA GATGCTATAA GTAGGTCAGT TGGCTGCAGC
 28621 AGAGATGTGG GGGATGAGGC TGAAAGGTGA GCGGGGACCA AATGGTTGAA GGACTTGCAC
 28681 TCCAAGGAGC TTTGAGAGCC ATTGATTACA TCCATTATGT TACTATGTGA CCAATACACT
 28741 ACTCATTAGA ACATTTACGT GATCTCAGAG CTTCTTATA TGCACCTTGT TCCTTTCAAC
 28801 TCACTTTTGT TCTCTTGGTT TTTTGGGGTC CTCTTAACAC CCTCATGAAG TCTATAGATG
 28861 GGAATGGTAC ACCCTAGTTT ACTAACCAG GAATAGGTAC CCAACAGGCA CTGCCAATAT
 28921 TGGATGGGCT GGTGATTGG CCACGCCTGA GGAAGATGGC GTCCCAAGGC CTGAGGTCTG
 28981 CATCCAGAC TCTCCATCCT GATCGACCTT CTCTACCTGC AGGGTCCCCC AGCGATGCAC
 29041 CCCATGCCCA CCACCCCTG CACCCTCACC TGATGCAGGA ACATATGGGA ACCAACGTCA
 29101 TCGTTGCCAA CACAATGCC ACTCACCTCA GCAACGGACA GATGTGTGAG TGGCCCCGAC
 29161 CCAGGGGACA GGCAGGTGGG CAAACTCTGG GATTTTACCT TGCAAAGGGT GAGGATGGGG
 29221 CTTAAGACAG GAGGCAGGAG AAAGTGGAGT CTAGAAGGTA GAACCAGGAT GCAACAGTTT
 29281 TCTGGGTTCC AGGGTAGGGA ATAAAGGGCA AGATTGTCCA TTTGTTGAGG CTGTTTATTC
 29341 AGTAAGGTGA CTGACAGCCT TTAAGTGAATG AAGCCATTGT TGGGATGAGG CAATCCACTG
 29401 GATGAGGTAA CCCATTGGGT GAAGATGTTT TTGGGTGAGA ATTCCATTAG TTGACATTGT
 29461 CCATTAAGTA AAAGTGGTCA TTGAAGTAAG GCTGCACAGT TGGGTAAGGC TATCCATTAG
 29521 ACAATTATAT GAGACTACCC ATTGGGTCAG GATGTCTGCT GGGCTAGACC ATCCTCTGAA

29581 ACCTCCAAAG TATAAACTTG TCATTGGGCA AAGCTCTTCA AAGGATAAGA TTATCAATGG
 29641 GATGAAGTGA TCCACTGAGA TAAGATGATA TTTTACTGAC ATTGTTCTCA GGGAAAGTTT
 29701 TCCATTGAAC AAAGATGGCC AATTGGGTCA AATTTGCTCT CCAAACCTGC CATGAGAGTG
 29761 AGGCCAATTA GTTTCTATTA CTCATCTCCT AAATATCCAA GAAATGGTAT TTTTTGAGCC
 29821 AGCTGGTCCG GGGTTTCATC AACTGCTGCT CTTTCTCCCA GGAAAGAATA TCCCTGTCAC
 29881 CCATCCCATT GCCGCTGGGG ACAGCCAGGC CTGGGCCTTG GTTTGGGAGA AGCAGTCCAA
 29941 GTCTGCATAT CAAATAAATG ATGGAGGAGA TGGGTGGTAG GACCTTCCAG ACCTCATAAA
 30001 ACTTAGGCTT TATGATCTGG GACTCACAGA AGGTTGAGCA ATAAAAGACC TTAGGGATTA
 30061 TCTGGTTTAA TTAATTCTCT CATTTTATAG AGGAAGAAAT TAAGTCAAGG TGGGGCAGGG
 30121 TGGGAGGGGA GAACTTTCCC GGGGCTCTTC ATTTACTCCC ACAAAGGCTG GAATTTTGGAG
 30181 CAGCCCCTGT CTGTCTGTTT GTCCTTCCAG CCACCCCTGA GACCCACAG CCCTCACCGC
 30241 CAGGTGGCTC AGGGTCTGAG CCCTATAAGC TCCTGCCGGG AGCCGTCGCC ACAATCGTCA
 30301 AGCCCCTCTC TGCCATCCCC CAGCCGACCA TCACCAAGCA GGAAGTTATC TAGCAAGCCG
 30361 CTGGGGCTTG GGGGCTCCAC TGGCTCCCCC CAGCCCCCTA AGAGAGCACC TGGTGATCAC
 30421 GTGGTCACGG CAAAGGAAGA CGTGATGCCA GGACCAGTCC CAGAGCAGGA ATGGGAAGGA
 30481 TGAAGGGCCC GAGAACATGG CCTAAGGGCC ACATCCCCTG GCCACCCTTG ACGCCCTGCT
 30541 CTGGATAACA AGACTTTGAC TTGGGGAGAC CTCTACTGCC TTGGACAACCT TTTCTCATGT
 30601 TGAAGCCACT GCCTTACCTC TCACCTTCAT CCATGTCCAA CCCCCGACTT CATCCCAAAG
 30661 GACAGCCGCC TGGAGATGAC TTGAGGCCTT ACTTAAACCC AGCTCCCTTC TTCCCTAGCC
 30721 TGGTGCTTCT CCTCTCCTAG CCCCTGTCAT GGTGTCCAGA CAGAGCCCTG TGAGGCTGGG
 30781 TCCAATTGTG GCACTTGGGG CACCTTGCTC CTCCTTCTGC TGCTGCCCCC ACCTCTGCTG
 30841 CCTCCCTCTG CTGTACCTT GCTCAGCCAT CCCGTCTTCT CCAACACCAC CTCTCCAGAG
 30901 GCCAAGGAGG CCTTGGAAC GATTCCCCCA GTCATTCTGG GAACATGTTG TAAGCACTGA
 30961 CTGGGACCAG GCACCAGGCA GGGTCTAGAA GGCTGTGGTG AGGGAAGACG CCTTTCTCCT
 31021 CCAACCCAAC CTCATCCTCC TTCTTCAGGG ACTTGGGTGG GTACTTGGGT GAGGATCCCT
 31081 GAAGGCCTTC AACCCGAGAA AACAAACCCA GGTGGGCGAC TGCAACAGGA ACTTGGAGTG
 31141 GAGAGGAAAA GCATCAGAAA GAGGCAGACC ATCCACCAGG CCTTTGAGAA AGGGTAGAAT
 31201 TCTGGCTGGT AGAGCAGGTG AGATGGGACA TTCCAAAGAA CAGCCTGAGC CAAGGCCTCG
 31261 TGGTAGTAAG AATCTAGCAA GAATTGAGGA AGAATGGTGT GGGAGAGGGA TGATGAAGAG
 31321 AGAGAGGGCC TGCTGGAGAG CATAGGGTCT GGAACACCAG GCTGAGGTCC TGATCAGCTT
 31381 CAAGGAGTAT GCAGGGAGCT GGGCTTCCAG AAAATGAACA CAGCAGTTCT GCAGAGGACG
 31441 GGAGGCTGGA AGCTGGGAGG TCAGGTGGGG TGGATGATAT AATGCGGGTG AGAGTAATGA
 31501 GGCTTGGGGC TGGAGAGGAC AAGATGGGTA AACCCTCACA TCAGAGTGAC ATCCAGGAGG
 31561 AATAAGCTCC CAGGGCCTGT CTCAAGCTCT TCCTTACTCC CAGGCACTGT CTTAAGGCAT
 31621 CTGACATGCA TCATCTCATT TAATCCTCCC TTCCTCCCTA TTAACCTAGA GATTGTTTTT
 31681 GTTTTTTATT CTCCTCCTCC CTCCCCGCC TCACCCGCC CACTCCCTCC TAACCTAGAG
 31741 ATTGTTACAG AAGCTGAAAT TGC GTTCTAA GAGGTGAAGT GATTTTTTTTT CTGAAACTCA
 31801 CACAACCTAGG AAGTGGCTGA GTCAGGACTT GAACCCAGGT CTCCCTGGAT CAGAACAGGA
 31861 GCTCTTAACT ACAGTGGCTG AATAGCTTCT CCAAAGGCTC CCTGTGTTCT CACCGTGATC
 31921 AAGTTGAGGG GCTTCCGGCT CCCTTCTACA GCCTCAGAAA CCAGACTCGT TCTTCTGGGA
 31981 ACCCTGCCCA CTCCCAGGAC CAAGATTGGC CTGAGGCTGC ACTAAAATTC ACTTAGGGTC
 32041 GAGCATCCTG TTTGCTGATA AATATTAAGG AGAATTCATG ACTCTTGACA GCTTTTCTCT

32101 CTTCACTCCC CAAGTCAAGG GGAGGGGTGG CAGGGGTCTG TTTCTGGAA GTCAGGCTCA
32161 TCTGGCCTGT TGGCATGGGG GTGGGACAGT GTGCACAGTG TGGGGCAGG GGAGGGCTAA
32221 GCAGGCCTGG GTTTGAGGGC TGCTCCGGAG ACCGTCACTC CAGGTGCATT CTGGAAGCAT
32281 TAGACCCAG GATGGAGCGA CCAGCATGTC ATCCATGTGG AATCTTGGTG GCTTTGAGGA
32341 CATTCTGGAA AATGCCACTG ACCAGTGTGA ACAAAGGGA TGTGTTATGG GGCTGGAGGT
32401 GTGATTAGGT AGGAGGGAAA CTGTTGGACC GACTCCTGCC CCCTGCTCAA CACTGACCCC
32461 TCTGAGTGGT TGGAGGCAGT GCCCCAGTGC CCAGAAATCC CACCATTAGT GATTGTTTTT
32521 TATGAGAAAG AGGCGTGGAG AAGTATTGGG GCAATGTGTC AGGGAGGAAT CACCACATCC
32581 CTACGGCAGT CCCAGCCAAG CCCCCAATCC CAGCGGAGAC TGTGCCCTGC TCAGAGCTCC
32641 CAAGCCTTCC CCCACCACCT CACTCAAGTG CCCCTGAAAT CCCTGCCAGA CGGCTCAGCC
32701 TGGTCTGCGG TAAGGCAGGG AGGCTGGAAC CATTTCTGGG CATTGTGGTC ATTCCCCTG
32761 TGTTCTCCA CCTCCTCCCT CCAGCGTTGC TCAGACCTCT GTCTTGGGAG AAAGGTTGAG
32821 ATAAGAATGT CCCATGGAGT GCCGTGGGCA ACAGTGGCCC TTCATGGGAA CAATCTGTTG
32881 GAGCAGGGGG TCAGTTCTCT GCTGGGAATC TACCCCTTTC TGGAGGAGAA ACCCATTCCA
32941 CCTTAATAAC TTTATTGTAA TGTGAGAAAC ACAAACAAA GTTTACTTTT TTGACTCTAA
33001 GCTGACATGA TATTAGAAAA TCTCTCGCTC TCTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTGGCT
33061 ACTTGAGTTG TGGTCTAAA ACATAAAATC TGATGGACAA ACAGAGGGTT GCTGGGGGGA
33121 CAAGCGTGGG CACAATTTCC CCACCAAGAC ACCCTGATCT TCAGGCGGGT CTCAGGAGCT
33181 TCTAAAAATC CGCATGGCTC TCCTGAGAGT GGACAGAGGA GAGGAGAGGG TCAGAAATGA
33241 ACGCTCTTCT ATTTCTTGTC ATTACCAAGC CAATTACTTT TGCCAAATTT TTCTGTGATC
33301 TGCCCTGATT AAGATGAATT GTGAAATTTA CATCAAGCAA TTATCAAAGC GGGCTGGGTC
33361 CCATCAGAAC GACCCACATC TTTCTGTGGG TGTGAATGTC ATTAGGTCTT GCGCTGACCC
33421 CTGAGCCCCC ATCACTGCCG CCTGATGGGG CAAAGAAACA AAAAAATTT CTTACTCTTC
33481 TGTGTTTTAA CAAAAGTTTA TAAAACAAA TAAATGGCGC ATATGTTTTT TAAGTCCTTG
33541 GATAAGTATC TTTTCTTTCA GGTATCAGAA ATAAGACTGA ATCTTCTGGT TCTACTTGGG
33601 GGTAAAAAAA TTTTTTTTAA AGGAAGAATG AGAATAGTTT TATAGTTCTT TGTGATGTGC
33661 AGAATGTTTT TGTGTCCATT ATAATTTTTC AGTCTTCACA TCAAGAGGTA AGCAGTTAGA
33721 CATGATTACT CCCACTTTCC AGATGAGGAG ACTGAGGCTT GGGGGAAGTG ACTTCTCTTG
33781 GAAGGCAGAG GTGGACATCT AACCCCTGGT TCTTGATTCC AAGTACTTAG TATATCGAGA
33841 GAGTGAAAGT TGATCCCCCT TCTTGAAGAG GGGAGTGATG AGGGGAGAGT GCAATGGCAA
33901 GATCTGGAAG AATGGCAAGA GGGTCCAAGG GTCTGTCATC CTCCACCAAG GTTCAAGACA
33961 GAACCTTTTG CTGGGTACC TCAATCTGCC AGCAATGGAA GATGAGTAGC TGTG

Tabla2. SECUENCIA NM_000457.3 DE (HNF4A).

HOMO SAPIENS HEPATOCYTE NUCLEAR FACTOR 4, ALPHA (HNF4A), TRANSCRIPT VARIANT 2, MRNA (NM_000457.3) MRNA-FACTOR HEPATOCÍTICO NUCLEAR 4 ALFA, TRANSCRITO VARIANTE 2. (BASE DE LOS POLIMORFISMOS). EN VERDE AGUA TODA LA REGIÓN CODIFICANTE, EN VERDE FUERTE LOS CODONES DE INICIO (atg) Y FIN DE LA TRANSCRIPCIÓN (tag).

TOMADO DE: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/nm_000457.3. (7 DE OCTUBRE DE 2007).

NCBI Reference Sequence: **NM_000457.3**

LOCUS NM_000457 3239 bp mRNA linear PRI 11-NOV-2010

SOURCE Homo sapiens (human)
ORGANISM [Homo sapiens](#)

ORIGIN

```

1 gggaggagggc agtgggagggg cggaggggagg gggccttcggt ggtggggcgcc cagggtagggg
61 caggtggcccg cggcgtggag gcagggagaa tgcgactctc caaaaccctc gtcgacatgg
121 acatggccga ctacagtgtt gcactggacc cagcctacac caccctggaa tttgagaatg
181 tgcaggtggtt gacgatgggc aatgacacgt ccccatcaga aggcaccaac ctcaacgcgc
241 ccaacagcct gggtgtcagc gccctgtgtg ccatctcggg ggaccgggcc acgggcaaac
301 actacagtg ctcgagctgt gacggctgca agggcttctt ccggaggagc gtgcggaaga
361 accacatgta ctcctgcaga tttagccggc agtgctggtt ggacaaagac aagaggaacc
421 agtgccgcta ctgcaggctc aagaaatgct tccgggctgg catgaagaag gaagccgtcc
481 agaatgagcg ggaccggatc agcactcga ggtcaagcta tgaggacagc agcctgcctt
541 ccatcaatgc gctcctgcag gcgagggtcc tgtcccgaca gatcacctcc cccgtctccg
601 ggatcaacgg cgacattcgg gcgaaaga ttgccagcat cgcagatgtg tgtgagtcca
661 tgaaggagca gctgctggtt ctcgttgagt gggccaagta catcccagct ttctgcgagc
721 tcccctgga cgaccaggtg gccctgctca gagcccatgc tggcgagcac ctgctgctcg
781 gagccaccaa gagatccatg gtgttcaagg acgtgctgct cctaggcaat gactacattg
841 tccctcggca ctgcccggag ctggcggaga tgagccgggt gtccatacgc atccttgacg
901 agctggtgct gcccttccag gagctgcaga tcgatgacaa tgagtatgcc tacctcaaag
961 ccatcatctt ctttgacctc gatgccaagg ggctgagcga tccaggggaag atcaagcggc
1021 tgcgttccca ggtgacaggtg agcttgaggg actacatcaa cgaccgccag tatgactcgc
1081 gtggccgctt tggagagctg ctgctgctgc tgcccacctt gcagagcatt acctggcaga
1141 tgatcgagca gatccagttc atcaagctct tcggcatggc caagattgac aactgtttgc
1201 aggagatgct gctgggaggg tcccccagcg atgcacccca tgcccaccac cccctgcacc
1261 ctcacctgat gcaggaacat atgggaacca acgtcatcgt tgccaacaca atgcccactc
1321 acctcagcaa cggacagatg tgtgagtggc cccgaccag gggacaggca gccaccctg
1381 agacccca gccctcaccg ccaggtggct cagggtctga gccctataag ctcctgcccg
1441 gagccgtcgc cacaatcgtc aagccccctt ctgccatccc ccagccgacc atcaccaagc
1501 aggaagttat ctagcaagcc gctggggctt gggggctcca ctggctcccc ccagccccct
1561 aagagagcac ctggtgatca cgtggtcacg gcaaaggaag acgtgatgcc aggaccagtc
1621 ccagagcagg aatgggaagg atgaagggcc cgagaacatg gcctaagggc cacatcccac
1681 tgccaccctt gacgcccctgc tctggataac aagactttga cttggggaga cctctactgc
1741 cttggacaac ttttctcatg ttgaagccac tgccttcacc ttcaccttca ttcatgtcca
1801 acccccgact tcatcccaaa ggacagccgc ctggagatga cttggagcct tacttaaac
1861 cagctccctt cttccttagc ctggtgcttc tcctctccta gcccctgtca tggtgtccag
1921 acagagccct gtgaggctgg gtccaattgt ggcacttggg gcacctgtct ctcctctctg
1981 ctgctgcccc cacctctgct gcctccctct gctgtcacct tgctcagcca ttccgtcttc
2041 ttccaacacca cctctccaga ggccaaggag gccttgaaa cgattcccc agtcattctg
2101 ggaacatggt gtaagcactg actgggacca ggcaccaggc agggtctaga aggctgtggt
2161 gagggaagac gcctttctcc ttcaacccaa cctcatcctc cttcttcagg gacttgggtg
2221 ggtacttggg tgaggatccc tgaaggcctt caacccgaga aaacaaacc aggttggcga

```

2281 ctgcaacagg aacttggagt ggagaggaaa agcatcagaa agaggcagac catccaccag
 2341 gcctttgaga aagggtagaa ttctggctgg tagagcaggt gagatgggac attccaaaga
 2401 acagcctgag ccaaggccta gtggtagtaa gaatctagca agaattgagg aagaatgggtg
 2461 tgggagaggg atgatgaaga gagagagggc ctgctggaga gcatagggtc tggaacacca
 2521 ggctgaggtc ctgatcagct tcaaggagta tgcagggagc tgggcttcca gaaaatgaac
 2581 acagcagttc tgcagaggac gggaggctgg aagctgggag gtcaggtggg gtggatgata
 2641 taatgcgggt gagagtaatg aggcttgggg ctggagagga caagatgggt aaaccctcac
 2701 atcagagtga catccaggag gaataagctc ccagggcctg tctcaagctc ttccttactc
 2761 ccaggcactg tcttaaggca tctgacatgc atcatctcat ttaatcctcc cttcctccct
 2821 attaacctag agattgtttt tgttttttat tctcctcctc cctccccgcc ctcaccgcc
 2881 cactccctc ctaacctaga gattgttaca gaagctgaaa ttgcgttcta agaggtgaag
 2941 tgattttttt tctgaaactc acacaactag gaagtggctg agtcaggact tgaaccagg
 3001 tctccctgga tcagaacagg agctcttaac tacagtggct gaatagcttc tccaaaggct
 3061 ccctgtgttc tcaccgtgat caagttgagg ggcttccggc tcccttctac agcctcagaa
 3121 accagactcg ttcttctggg aaccctgcc actcccagga ccaagattgg cctgaggctg
 3181 cactaaaatt cacttagggt cgagcatcct gtttgctgat aaatattaag gagaattca

//