



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA

DETECCIÓN DEL POLIMORFISMO +62G/A EN LA REGIÓN 3'UTR DEL GEN DE LA RESISTINA EN PACIENTES CON SÍNDROME METABÓLICO Y DIABETES.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A :
Q. B. P. ARELI FIERRO TORRES

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MÓNICA ESPINOZA ROJO

CHILPANCINGO, GRO., JULIO DEL 2006

**DETECCIÓN DEL POLIMORFISMO +62G/A EN LA REGIÓN 3'UTR
DEL GEN DE LA RESISTINA EN PACIENTES CON SÍNDROME
METABÓLICO Y DIABETES.**

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas y en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular de la Unidad Académica de Medicina de la Universidad Autónoma de Guerrero,

Bajo la dirección de la:

Dra. Mónica Espinoza Rojo

La asesoría externa de la:

Dra. Eva González Jasso

La asesoría interna de:

Dr. Saúl López Silva
M.C. Eduardo Martínez Sandoval
Dr. Alfonso Bernabé Carreño
M.C. Eugenia Flores Alfaro

AGRADECIMIENTOS

Todo lo puedo en Cristo que me fortalece

Filip. 4:13

Gracias a **Dios** porque en todo momento se ha manifestado en mi vida y sus bendiciones han sido palpables porque cuando muchas cosas en su momento no entendí ¿por qué pasaban?, ahora sé que él tenía sus propósitos para mí.

Gracias a mis **padres y mejores amigos Q.B.P. Celestino Fierro Hipólito y Profesora Magdalena Torres Fierro** porque ellos han sido el mejor ejemplo a seguir en mi vida y me han enseñado que todo se logra a través de trabajo y esfuerzo, los amo.

Gracias a **mi amado Zair** por su apoyo incondicional, comprensión y especialmente el apoyo espiritual.

Gracias a **mis hermanos Celes, Araceli y Dani** porque siempre contribuyeron alentándome a seguir con el cariño mostrado hacia mí, los quiero mucho.

Gracias a mis cuñados Alejandro y Claudia por su apoyo moral y a mis sobrinitos: Jael, Jeshua y Nuvia que, por sus sonrisas y balbuceos no perdí la cabeza en esta maestría.

Gracias al Lic. Cruz Hernández Gamboa Director de la Preparatoria Número 1 quién me brindó su apoyo para combinar mis estudios de la Maestría con mi trabajo.

Gracias a la Doctora Mónica por contribuir en mi formación académica, por su paciencia y guía como tutora y Directora de ésta tesis.

Gracias a la Doctora Berenice por ser la primera persona que me impulsó a estudiar ésta maestría.

Gracias al Doctor Alfonso Bernabé y la Maestra María Elena porque en mis momentos difíciles y de impaciencia durante este recorrido de trabajo, me mostraron su amistad y confianza alentándome a seguir.

Gracias al Doctor Eduardo Sandoval no solo por su tiempo dedicado en el análisis estadístico de este trabajo, sino también por brindarme confianza y amistad.

Gracias a la Dra. Eva González Jasso por su tiempo dedicado en esta tesis porque sin conocerme, valoró mi trabajo aceptando ser mi asesora externa dándose cuenta de todo el empeño y esfuerzo que dedique para culminar con esta meta.

Gracias al Doctor Saúl y a la Doctora Adakatia por haberme brindado un espacio en el laboratorio de Biología Molecular en Acapulco para realizar parte de ésta tesis.

Gracias a la Maestra Gloria por brindarme espacio en el laboratorio de inmunología para realizar técnicas específicas de mi tesis.

Gracias a los maestros y personal encargado del laboratorio de Biomedicina Molecular por brindarme apoyo cuando lo necesité.

Gracias a Paola que más que trabajadora del área administrativa de la maestría, fué primero una persona que me brindó su apoyo y amistad.

Gracias a la Maestra Patricia Chiñas por su tiempo y apoyo profesional dedicado a este trabajo.

Gracias a todas las personas que creyeron en mí para llegar a finalizar ésta meta propuesta y que Dios les Bendiga siempre.

Sinceramente **A R E L I**

Julio 2006.

DEDICATORIA

Este trabajo está **dedicado a mis padres** Celestino Fierro Hipólito y Magdalena Torres Fierro con todo mi amor y cariño **y a mis abuelitas** que en este tiempo dejaron de existir físicamente pero siempre existirán en mi corazón.

Gracias a Dios porque por él existieron ellas

y

existen mis padres y yo.

INDICE

	Pag.
Abreviaturas.	1
Índice de Figuras.	2
Índice de cuadros.	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
<i>I.-INTRODUCCION</i>	6
<i>II.-MATERIAL Y METODOS</i>	11
III.-RESULTADOS	14
IV.-DISCUSION Y CONCLUSION	22
V.-REFERENCIAS	26
VI.-ANEXO	29

Abreviaturas

SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms (polimorfismos de un solo nucleótido)
SM	Síndrome Metabólico
DMT2	Diabetes Mellitus tipo 2
RI	Resistencia a Insulina
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RFLPs	Restriction Fragment Length Polymorphism (Restricción de los Fragmentos Polimórficos de Longitud Variable)
TNF-α	Tumor Necrosis Factor- α (Factor de Necrosis Tumoral Alfa)
IL-6	Interleucina seis
PAI-1	Inhibidor del Activador de Plasminógeno uno
GLUT-4	Transportador de Glucosa Tipo cuatro
RFLMs	Resistin-like molecules (Moléculas Semejantes a Resistina)
FIZZ	Found in Inflammatory Zone (encontrada en zona inflamatoria)
HDL	High Density Lipoprotein (Lipoproteína de Alta Densidad)
UTR	Untranslated Región (región de no traducción)
AREs	Elementos Ricos en Adenina
ALU	Elementos Ricos en Adenina y Uracilo
RNA	Ribo Nucleic Acid (Acido Ribonucleico)
DNA	Desoxiribo Nucleic Acid (Acido Desoxirribonucleico)
<i>rstn</i>	Gen de la resistina humana

Indice de Figuras

	Pag.
Figura 1. Mecanismos y procesos metabólicos asociados a la resistencia a la insulina en hígado, músculo y tejido adiposo.	7
Figura 2. Resistina, función fisiológica.	8
Figura 3. Los SNPs en resistina. Representación esquemática del locus del gen resistina humana (<i>rstn</i>) y estructura del exón y localización de 9 SNPs.	9
Figura 4. Banco de DNA obtenido de las muestras de los pacientes considerados como casos y controles.	14
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del fragmento amplificado de 249 pb correspondiente al gen de la resistina.	14
Figura 6. Restricción con la enzima BseR1 en el gen de la resistina, gel de poliacrilamida al 7%, para visualizar las variantes génicas del SNP +62G/A.	15

Indice de cuadros

	Pag.
Cuadro 1. Características de casos y controles en la población estudiada de Acapulco, Guerrero.	16
Cuadro 2. Frecuencia de los genotipos del polimorfismo +62G/A en los casos y controles	17
Cuadro 3. Características clínicas y bioquímicas de casos y controles de acuerdo al genotipo en la población de Acapulco, Guerrero.	17
Cuadro 4. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo +62G/A en el gen de la resistina de casos y controles.	18
Cuadro 5. Asociación del polimorfismo +62 G/A con las características de la población total de estudio.	19
Cuadro 6. Asociación del polimorfismo +62G/A con las alteraciones metabólicas de los sujetos en estudio, de acuerdo al diagnóstico	20
Cuadro 7. Características asociadas con el genotipo AA por regresión logística entre casos con síndrome metabólico y controles.	21
Cuadro7.1 Características asociadas con el genotipo AA por regresión logística entre casos de Diabetes Mellitus tipo 2 y controles.	21

RESUMEN

Dos SNPs en la región 3'UTR del gen de la resistina han sido detectados. En este trabajo el SNP +62G/A fue asociado con DMT2 e Hipertensión. Las variantes fueron identificadas por PCR y RFLPs en 272 individuos; los grupos incluyeron SM, DMT2 y sujetos normales. **RESULTADOS:** La variante GG fue predominante (78%) sobre la variante AA (22%). La frecuencia alélica +62A, fue de: 0.664 en DMT2 y de 0.363 en SM comparados con los sujetos controles (0.401). El riesgo crudo mostró asociación significativa entre genotipo AA con: sexo femenino (RM=2, IC95% 1.0 a 3.5 p=0.03), con perímetro de cintura arriba de 88 cm (RM=3, IC95% 1.1 a 5.8 p=0.01) y con glucosa arriba de 126 mg/dl (RM=4, IC95% 1.8 a 7.0 p=0.000), y en el análisis estratificado la variante AA mostró que existe cuatro veces más probabilidad de presentar DMT2 (RM=4, IC95% 2.0 a 8.2 p=<0.000), siete veces más probabilidad en sexo masculino (RM=7, IC95% 1.9 a 24.7 p=<0.000). La presencia de DMT2 y el genotipo AA fueron asociados con dislipidemias; hipertrigliceridemia (RM=8, IC95% 0.95 a 9.6 p=0.002) e hipercolesterolemia en hombres (RM=3, IC95% 1.3 a 7.5 p=0.005). Por regresión logística la asociación se mantuvo con Hipertensión sistólica en SM (RM=6.6, IC95% 2.4-18.6 p=<0.00) y con glucosa alterada en DMT2 (RM=726, IC95% 87.5 a 6029.8 P=<0.000). La variante AA en la región 3'UTR del gen resistina esta asociado con Diabetes mellitus tipo 2 y con hipertensión sistólica en pacientes con síndrome metabólico.

palabras clave: Adiposito, Resistencia a Insulina

ABSTRACT

Two SNPs in the region 3'UTR of resistin gene have been detected. In this work the SNP +62G/A was associated with DMT2 and hypertension. The variants were identified by PCR and RFLPs in 272 subjects; the groups included SM, DMT2 and normal control subjects. **RESULT:** The GG variant was predominant (78%) over the AA variant (22%). The allelic frequency +62A, was: 0.664 in DMT2 and 0.363 in SM compared with control subjects (0.401). The crude risk showed significant association between AA genotype with: sex feminine (RM=2,IC95% 1.0 a 3.5 p=0.03), with waist circumference upper of 88 cm (RM=3,IC95% 1.1 a 5.8 p=0.01) and with glucose upper of 126 mg/dl (RM=4,IC95% 1.8 a 7.0 p=<0.000), and the stratify analysis this AA variant showed that exist four times more probability of present DMT2 (RM=4.0,IC95% 2.0 a 8.2 p=<0.000), seven times more probability in sex masculine (RM=7,IC95% 1.9 a 24.7 p=<0.000). DMT2 and AA genotype were associated with dislipidemias; hipertrigliceridemia (RM=8,IC95% 0.95 a 9.6 p=0.002) and hypercholesterolemia in men (RM=3,IC95% 1.3 a 7.5 p=0.005). By logistic regression the association was maintained with hypertension systole in SM (RM=7,IC95%2.4-18.6 p=<0.00) and with glucose altered in DMT2 (RM=726,IC95% 87.5 a 6029.8 p=<0.000). The AA variant in the region 3'UTR of resistin gene is associated with Diabetes Mellitus Tipo 2 and with hypertension systole in patients with Metabolic Syndrome.

Key words: Adipocyte, Insulin resistance

I.- INTRODUCCIÓN

Las primeras observaciones clínicas sobre el Síndrome Metabólico (SM) fueron publicadas por la década de 1920 por el médico sueco Eskylin y el español, Gregorio Marañón al encontrar en algunos de sus pacientes asociación entre hipertensión arterial y diabetes,¹ aunque actualmente ya es bien reconocido y documentado que las características del SM pueden estar presentes 10 años antes de la detección de DMT2.² A partir de 1998, este Síndrome fue descrito por Reaven como la agrupación de: intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, hipertensión arterial, hipertrigliceridemia y disminución de lipoproteínas de alta densidad (HDL), con el nombre de síndrome X, éste síndrome ha recibido diferentes denominaciones: síndrome de resistencia a insulina, síndrome plurimetabólico, cuarteto de la muerte, síndrome dismetabólico, cardiovascular y más recientemente propuesto por la OMS como SM.³

El denominador común entre las diferentes manifestaciones del SM se ha atribuido a la resistencia a insulina (RI) la cual con el tiempo puede llevar a una intolerancia a la glucosa y posteriormente a una alteración secundaria como lo es la DMT2 cuya prevalencia en México es de 10.7% en la población entre 20 y 69 años de edad y en el Estado de Guerrero es del 11.7%. La RI puede ser el mecanismo etiopatogénico que conduce a otras alteraciones que suponen factores de riesgo cardiovascular, como son las alteraciones en el metabolismo lipídico (aumento de triglicéridos, disminución de HDL) y la hipertensión arterial

¹ La etiología de este síndrome es multifactorial, la genética y los factores medioambientales desempeñan un papel muy importante, entre estos últimos la obesidad se ha considerado como un factor determinante del SM,¹ ya que se ha reportado en algunos estudios que el trastorno inicial de RI parece centrarse en funciones del adipocito y consiste en una incapacidad para continuar almacenando ácidos grasos, secundaria a una predisposición genética, alteraciones dietéticas, etc. (Fig. 1). Desde este punto de vista, el adipocito ahora debe ser considerado no solo un depósito de almacenamiento sino como un órgano secretor donde algunas sustancias y hormonas liberadas por él podrían participar en la RI,⁴ por lo tanto la obesidad ha sido considerada también como un principal factor de riesgo para la Diabetes Mellitus tipo 2.⁶

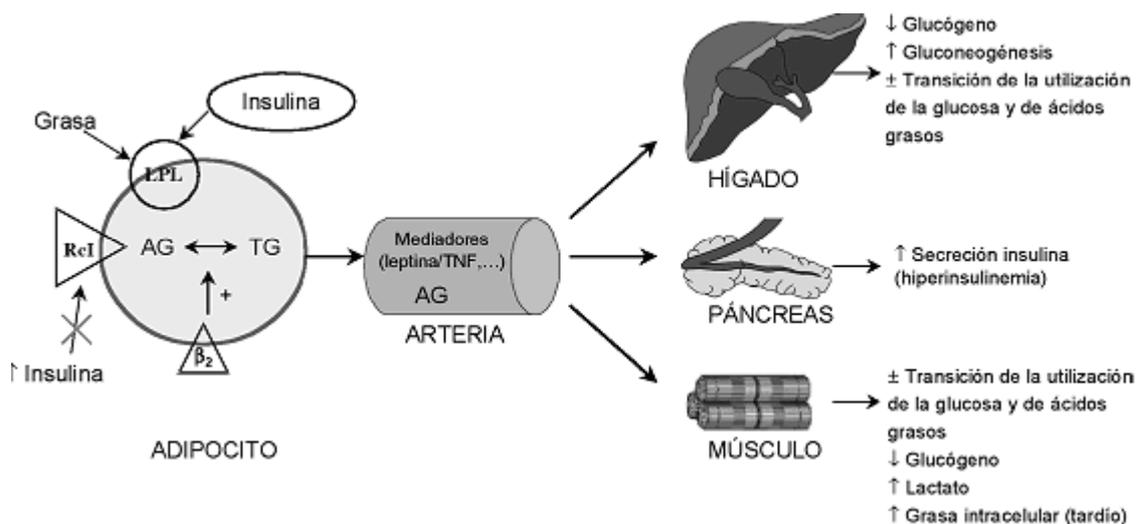


Fig.1. Mecanismos y procesos metabólicos asociados a la resistencia a la insulina en hígado, músculo y tejido adiposo. AG: ácidos grasos; receptores adrenérgicos; LPL: lipoproteinlipasa; ReI: receptor de insulina; TG: triglicéridos; TNF: factor de necrosis tumoral.

Actualmente se conoce que las células adiposas son capaces de segregar o liberar un número importante de factores circulantes, incluyendo varias hormonas peptídicas como la leptina y citocinas tales como el Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF α), la interleucina 6 (IL-6), el Inhibidor del Activador del Plasminógeno 1(PAI-1) y Angiotensinógeno.⁷

Recientemente se ha descubierto otro factor proteínico liberado por adipocitos llamado resistina.⁸ La resistina es una proteína de 114 aminoácidos y 12.5 kDa que pertenece a la familia de RFLMs (moléculas semejantes a resistina) o proteínas FIZZ (encontradas en zona inflamatoria), se caracteriza por un extremo carboxilo terminal rico en cisteína y por formar homodímeros por puentes disulfuro.^{11,12,13,14} Está codificada por el gen *rstn*, su nombre es debido a la relación directa con la resistencia a insulina, esta relación se determinó en experimentos realizados en roedores donde esta hormona se encontró aumentada en ratones (macho C57BI/6j; hembra FVB/N), que presentaron resistencia a la insulina y obesidad genética u obesidad inducida por la dieta.^{8,15,29} Algunos estudios sugieren que la resistina es capaz de disminuir el transporte de glucosa en el adipocito,⁸ además de que se ha observado que es una molécula inducida durante la diferenciación de adipocitos, al ser secretada

de forma irregular al incrementar el volumen de los adipocitos actúa de manera autocrina sobre los mismos e induce su sobreexpresión^{15,29} coincidentemente, en algunos estudios, el aumento en la expresión de la resistina se relaciona con una marcada disminución en la expresión de GLUT4 tanto en personas obesas como en personas con DMT2.^{5,30} Se considera que la secreción incrementada de la resistina sea uno de los posibles mecanismos por el cual la obesidad puede permitir la resistencia a insulina, influyendo directamente con la DMT2.^{9,10,27} Experimentalmente esta proteína puede ser regulada por tratamiento antidiabético ya que en estudios realizados con células 3T3-L1, una línea celular proveniente de adipocitos, el tratamiento con Tiazolidinediona, disminuye la expresión del mensajero de la resistina y por consecuencia de la proteína.²⁸ (Fig. 2)

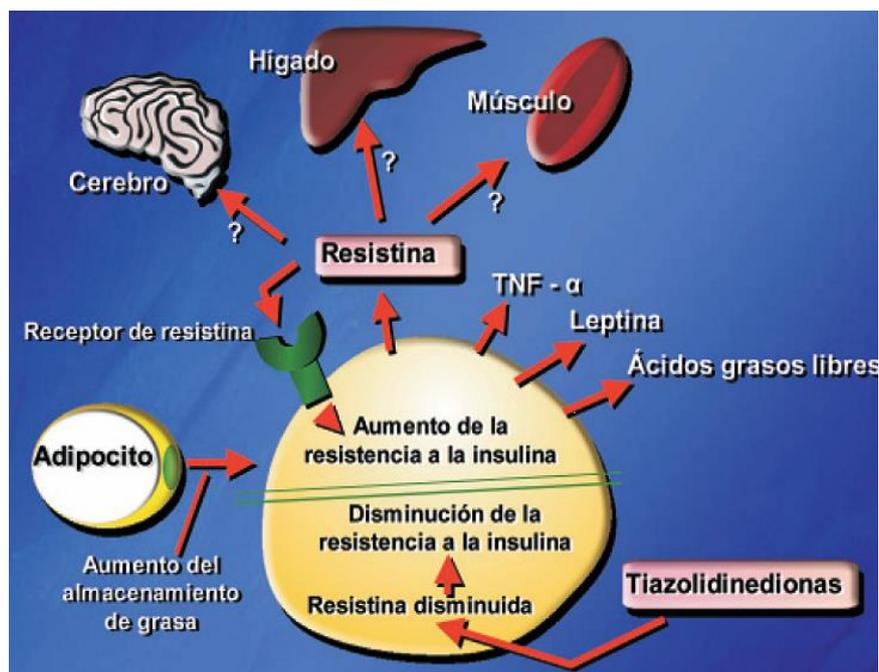


Fig. 2 Función fisiológica de la resistina.

Recientemente en otro modelo experimental con ratas Wistar se identificó que por “*splicing*” alternativo se origina una nueva isoforma de resistina,²⁵ también se ha identificado un transcrito originado por “*splicing*” alternativo y la distribución de su RNAm en tejido humano²⁷ y se ha demostrado que los niveles de RNAm de la resistina están elevados en el tejido adiposo abdominal comparado con grasa subcutánea¹⁶ por lo que se ha reportado como una

hormona con función autocrina y endocrina sobre tejido adiposo,²⁷ aunque son pocos los estudios hechos en humanos, se presume su posible participación en la etiopatogenia de la RI y DMT2, y son necesarios mas estudios para confirmar que el gen de la resistina (*rstn*) está involucrado de manera endocrina en la adipogénesis y el metabolismo de los adipocitos.²⁶

En el gen *rstn* codificado en el cromosoma 19, se han encontrado varios SNPs,¹¹ y se ha observado que pueden modular el riesgo de diabetes asociado con un peso corporal dado.¹⁶ En la región promotora del gen se ha estudiado los polimorfismos -638 G>A, -420C>G y -358G/A, los cuales se han asociado con niveles de resistina sérica sin encontrar asociación estadísticamente significativa, a pesar de lo anterior se han realizado estudios donde se observa una asociación estadísticamente significativa entre los SNPs -420 C<G y -537A>C y obesidad y/o DMT2, se ha demostrado que pueden incrementar el riesgo para obesidad por relacionarse con un Índice de Masa Corporal mayor a 30 kg/m² en pacientes sanos,¹⁷ otro SNP -180C>G se ha correlacionado con niveles altos de RNAm de resistina y RI sin asociarse con diabetes¹⁸ Por otro lado se han reportado nueve SNPs en regiones no codificantes (Figura 3) los cuales pueden influir en la acción de la insulina en interacción con obesidad, como el SNP +181G/A localizado en el intrón 2,^{19,30} sin embargo otros estudios realizados con SNPs (-167C>T, +257C>T y +299G>A) localizados también en intrones, ninguno se le ha asociado con obesidad ni diabetes³¹

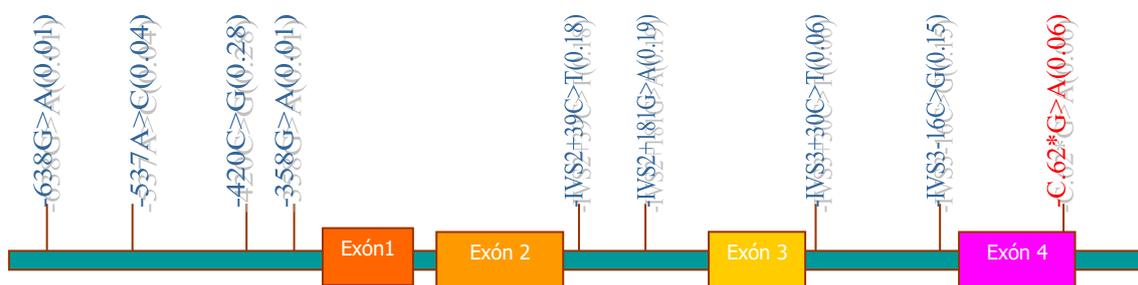


Fig. 3 Los SNPs en resistina. Representación esquemática del locus del gen resistina humana (*rstn*) y estructura del exón y localización de 9 SNPs. El número es basado en el número de acceso al banco de genes.

En el año 2001 Cao y Hegele reportaron dos SNPs uno en la posición +39C>T que está a 39 pares de bases río abajo entre el exón 2 y el intrón 2, el

otro SNP +62G/A está localizado a 62 pares de bases río abajo de la última base del codón de terminación en la región 3'UTR del exón 4,²¹ con estos dos SNPs realizaron un estudio en diabéticos de varios grupos étnicos (africanos, caucásicos, chinos, Indios del Este y Amerindios) y reportaron que la frecuencia alélica +62A en la región 3'UTR es baja y algunos de estos pacientes tenían lipodistrofia.²¹ En otro estudio realizado en población china, el SNP +62G/A estudiado también en pacientes diabéticos reportó que el genotipo homocigoto GG es estadísticamente significativo asociado con hipertensión, resultando esta misma asociación en otro estudio realizado en una población alemana, caucásica.²³ Min Shan y colaboradores en el 2003 sugirieron que el polimorfismo +62G/A en la región 3' UTR puede afectar la expresión del gen de resistina e influenciar la diferenciación y maduración de adipocitos por el papel que se ha observado que juega en dicha diferenciación celular y de este modo contribuir a la patogénesis de resistencia a insulina y diabetes tipo 2, porque en estas patologías existe un desorden en la movilización y almacenamiento de grasa y un desequilibrio en la proliferación celular de adipocitos.²² Aunque el mecanismo exacto del polimorfismo +62G/A sobre las regiones UTR no se conoce, se sabe que los polimorfismos que caen en esta región, pueden regular la expresión de un gen a través de la modulación de la estabilidad del RNAm ya sea aumentando o disminuyendo su promedio de vida del mensajero. Por otro lado algunos UTR controlan el estado de poliadenilación del transcrito ya que muchos RNAm son traducionalmente inactivos hasta que ellos sufren poliadenilación citoplasmática adicional. Es conocido también que estas regiones son afectadas en su traducción también por secuencias que son altamente conservadas en 3'UTR como las secuencias AREs y los repetidos ALU(AUUU)nA)²⁴ Por los trabajos que se han reportado sobre este SNP +62G/A en la región 3'UTR del gen *rstn* y su asociación con la RI. El objetivo de este estudio es identificar en una población de Guerrero a este polimorfismo de un solo nucleótido + 62G/A como marcador de diagnóstico temprano para la DMT2 y encontrar su correlación como un factor de riesgo para anticipar también la progresión de SM a DMT2 en tal población.

II.- MATERIAL Y METODOS

Se incluyeron 272 pacientes Trabajadores de la Universidad Autónoma de Guerrero en el municipio de Acapulco Guerrero, agrupados como: 68 pacientes con Síndrome Metabólico, 68 pacientes con diabetes, definidos como caso tipo 1 y caso tipo 2 correspondientemente y 136 sujetos normales (sin SM y sin diabetes) definiéndolos como controles.

Para **definir** los **casos** se tomaron los siguientes criterios:

caso tipo 1 presentar tres de cinco parámetros

- 1.-Perímetro de cintura mayor de 88 cm en mujeres o mayor de 102 cm en hombres
- 2.-Triglicéridos mayor de 150 mg/dl,
- 3.-HDL colesterol bajo < 50 en Mujeres y < de 40 en hombres.
- 4.-Hipertensión Arterial mayor de 135/85 mmHg
- 5.-Glucosa > 110 mg/dl)

caso tipo 2:

Presentar Diabetes Mellitus Tipo 2 sin tomar en cuenta el tiempo de habersele diagnosticado.

Para **definir** los **controles**, se tomaron los siguientes criterios.

- 1.- No presentar Diabetes
- 2.-No cumplir con tres parámetros de los antes mencionados para ser diagnosticado como Síndrome Metabólico.

La muestra de los pacientes con SM y pacientes sanos se obtuvieron durante los meses de octubre 2004 a enero 2005, a partir de las muestras de sangre obtenidas durante este tiempo se realizó la extracción de DNA para formar un banco de DNA (Fig 4). Las muestras de los pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2 se obtuvieron durante el período julio-septiembre 2005 realizándoles mediciones clínicas y antropométricas, posteriormente realizando la extracción

de DNA para complementar el banco de DNA ya formado con los primeros pacientes en Acapulco, Guerrero.

EXTRACCIÓN DE DNA

Se extrajo DNA de leucocitos de sangre periférica: en un tubo Falcon estéril se depositó sangre. Tris-base 1M pH 7.6; sacarosa 1M; Tritón, agua desionizada estéril (TTS), se centrifugó y decantó, al botón celular se agregó 1 ml de TTS, se centrifugó y decantó. Se lavó hasta obtener un botón celular blanco. Se añadió cloruro de sodio, duodecil sulfato de sodio, NaCl saturado homogenizando todo y centrifugando a 11,500 rpm 25 min a 4° C, decantándose y agregando 2 ml de etanol absoluto observando la formación de una hebra de DNA. Se procedió a almacenar toda la noche a -20°C con etanol absoluto, se recuperó el DNA del etanol absoluto y se transfirió a un tubo eppendorf con etanol al 70%. Se resuspendió el DNA en agua desionizada y se almacenó a -70°C . El DNA se cuantificó por espectrofotometría (260 nm) en un biofotómetro.

IDENTIFICACIÓN DEL GEN RESISTINA MEDIANTE PCR

El DNA purificado de todas las muestras se sometió a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para amplificar el DNA genómico, se utilizaron los iniciadores. Sentido 5´AGA GTC CAC GCT CCT GTG TT3´ y Antisentido 5´ CAT CTC CAG GTT TAT TTC CAG C 3´ de acuerdo al método de Cao y Hegele. Las reacciones de PCR se realizaron con 0.3 µg (300 ng) de DNA genómico, 20 pmol de iniciadores, 0.2 mmol/litro de cada deoxinucleotidos (ATP,GTP,CTP, TTP) 0.5 U *Taq* DNA polimerasa y 1.5 mmol/litro de MgCl₂. La amplificación se realizó en el termociclador Thermal Cycler eppendorf. Las condiciones de amplificación fueron: una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min., temperatura de desnaturalización 94°, temperatura de alineamiento 58° y temperatura de renaturalización 72 °C llevándose a cabo durante 30 ciclos, terminando con un solo paso de extensión a 72° C por 10 minutos, amplificándose un fragmento de 249 pb *Figura 5*.

Una alícuota de 8 µl de la mezcla de la reacción amplificada se sometió a electroforénesis en gel de agarosa al 1.5%, se tiñó con bromuro de etidio y se

examinó visualmente en el transluminador de luz ultravioleta (FOTO/UV^R15, FOTODYNE^R INCORPORATED).

ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO MEDIANTE (RFLPs) Restricción de los Fragmentos largos Polimórficos de Longitud Variable.

El producto de la PCR se sometió a una endonucleasa de restricción: enzima BseR1. La mezcla de reacción fue la siguiente: 1 µl de amortiguador, 0.3 µl de enzima y 10 µl de DNA amplificado, incubándose la mezcla en un baño metabólico a 37°C durante toda la noche para la actividad de la enzima. En el gen resistina, si el alelo es 62G no ocurre el corte. Para el alelo 62A se producen dos fragmentos uno de 238 pb y el otro de 11 pb. Estos fragmentos fueron visualizados en electroforesis de geles de poliacrilamida al 7% y teñidos con Bromuro de etidio.

Análisis Estadístico

Se capturó la base de datos en SPSS y todo el análisis se llevó a cabo con el Software estadístico STATA 8.1 Se obtuvo la frecuencia absoluta y relativa de las variables cualitativas y para las variables cuantitativas la media y desviación estándar. La distribución de la frecuencia alélica de este polimorfismo fue obtenida por Hardy-Weinberg.

Para relacionar los genotipos con la presencia de Diabetes y SM se determinaron las características clínicas y bioquímicas de casos y controles por genotipo, la razón de momios, obteniendo los Intervalos a un nivel de confianza del 95%. Se realizó asociación con Análisis de Regresión Logística.

III.- RESULTADOS

Las muestras de sangre que se obtuvieron de 272 Trabajadores de la Universidad Autónoma de Guerrero en Acapulco, Guerrero y que cumplieron con los criterios de inclusión para este estudio de casos y controles fueron procesadas para obtener un banco de DNA (Figura 4) y en cada una de estas muestras se amplificó e identificó por PCR el gen de la resistina, como un fragmento de 249 pb (Figura 5) utilizando los iniciadores: sentido 5'AGA GTC CAC GCT CCT GTG TT3' y antisentido 5' CAT CTC CAG GTT TAT TTC CAG C 3'. Dicho fragmento se secuenció para confirmar que correspondía a la secuencia reportada de este gen (anexo-pag.29)

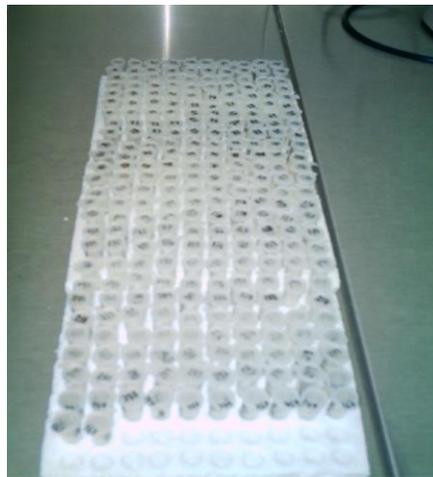


Fig. 4 Muestras de DNA de los pacientes considerados como casos y controles en este estudio.

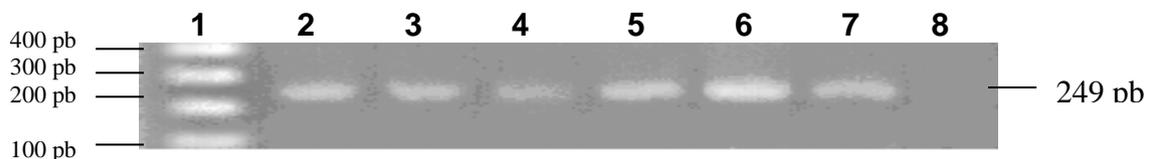


Fig. 5 Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del fragmento amplificado de 249 pb correspondiente al gen de la resistina, carril 1: Marcador de Peso Molecular de 100 pb carril 2: control positivo de 249 pb, carril 3: paciente sano, carril 4: paciente con SM, carril 5 a 7 pacientes con DMT2, carril 8: control negativo (H₂O).

A partir de los fragmentos de PCR, se realizó análisis de Restricción de los Fragmentos Polimórficos de longitud variable (RFLPs) encontrando las siguientes variantes génicas del SNP +62G/A: genotipo homocigoto GG representado por un fragmento de longitud de 249 pb y genotipo homocigoto AA por fragmentos de longitud de 238 pb y 11 pb, visualizándolos en gel de poliacrilamida al 7% como se muestra en la (Figura 6). El genotipo heterocigoto GA no se encontró en esta población de estudio.

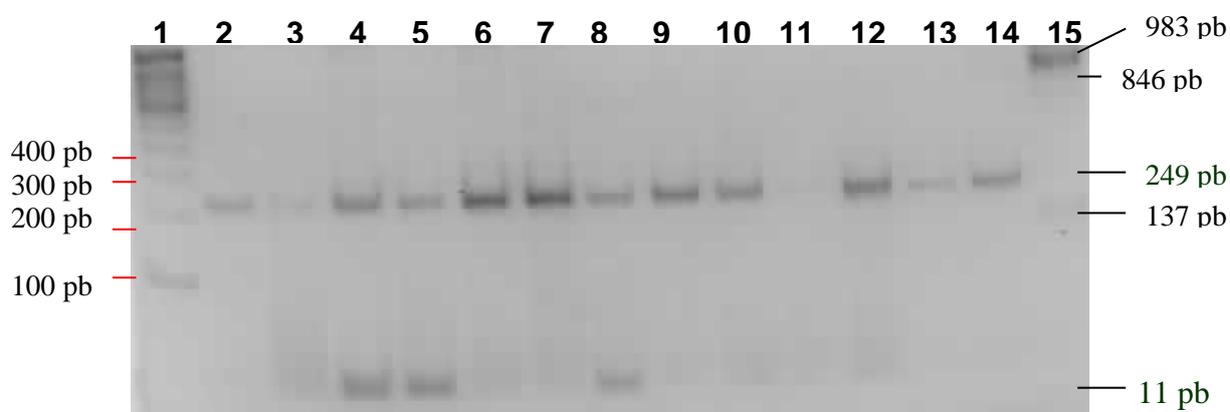


Fig. 6 Gel de poliacrilamida al 7%, para visualizar las variantes génicas del SNP +62G/A; carril 1: Marcador de peso molecular (100 pb), carril 2: gen resistina sin restricción (control negativo), carril: 3 a 5 y 8 genotipo AA , carril: 6, 7 y 9 a 14 genotipo GG, carril: 15 un fragmento de 983 pb del gen gliceraldehído en el cual el corte con la enzima BseR1 generó dos fragmentos uno de 846 pb y otro de 137 pb (control positivo).

En el cuadro 1, se muestra que la edad promedio del grupo de estudio fue 48 años, el sexo femenino predominó con el 58%, el perímetro de cintura mayor de 88 cm indicó obesidad abdominal entre las mujeres. El grupo de casos con síndrome metabólico del sexo masculino tuvieron una media de perímetro de cintura de 106 cm indicando obesidad abdominal. El subgrupo de casos (SM y DMT2) mostraron niveles altos de triglicéridos 229 ± 97 mg/dl y 201 ± 107 mg/dl respectivamente en comparación con los controles 170 ± 138 mg/dl.

En el cuadro 2 se muestran los genotipos del SNP +62G/A encontrados tanto en casos como en controles, la variante GG predominó un 78% y la variante AA 22%, la variante GA no se encontró.

La edad promedio de casos con DMT2 que presentaron la variante GG fue de 55 años que es más alta en comparación a los controles que tienen dicha variante (46 años). Los casos con síndrome metabólico que presentaron la variante AA muestran un valor promedio de triglicéridos más alto (255±104 mg/dl) en comparación con los controles (150±186 mg/dl).

Cuadro 1. Características de casos y controles en la población estudiada de Acapulco, Guerrero.

CARACTERISTICA	GRUPO EN ESTUDIO	CASOS		CONTROLES INDIVIDUOS SANOS
		<i>Síndrome Metabólico</i>	<i>Diabetes Mellitus Tipo 2</i>	
Edad	n=272 48 ± 9	n=68 47± 9	N=68 55±10	n=136 46±8
Sexo				
Hombres	112(41%)	26(38%)	20(30%)	66(48%)
Mujeres	160(59%)	42(62%)	48(70%)	70(52%)
IMC				
Hombres	29± 8	35±13	29±4	27±3
Mujeres	28± 4	30± 3	28± 4	27± 5
P. Cintura				
Hombres	97±9	106±7	98±10	93±8
Mujeres	91±10	97±8	93±10	87±9
Presión sistólica	114± 14	118±15	110±16	113±10
Presión diastólica	73± 10	77± 12	72± 11	72± 8
Glucosa (mg/dl)	118±67	88± 13	207±82	88±12
Triglicéridos (mg/dl)	193±127	229±97	201±107	170±138
HDL-Colesterol (mg/dl)				
Hombres	45±25	35±7	42±9	50± 30
Mujeres	51±31	39±7	48±25	60±39

Media ± Desviación estándar

Se observa un valor promedio de colesterol-HDL (37 mg/dl) menos de 50 mg/dl indicando hipercolesterolemia en el sexo femenino con la variante AA en comparación con los controles con la misma variante (76 mg/dl). Cuadro 3.

En el cuadro 4, se muestran las frecuencias génicas y alélicas del polimorfismo encontradas en los casos y controles estudiados. La frecuencia del alelo +62A fue más alta en casos DMT2 (0.664) en comparación con los controles (0.401).

El análisis de riesgo crudo mostró una asociación entre el genotipo AA y el sexo femenino (RM=2, IC95% 1.0 a 3.5 p=0.03), asociación entre este genotipo y el desarrollo de un perímetro de cintura mayor de 88 cm (RM=3, IC1.1 a 5.8 p=0.01), así como cuatro veces más probabilidad de presentar una glucosa alterada (>126 mg/dl) en un individuo que presenta este genotipo AA (RM=4, IC95% 1.8 – 7.0 p=<0.000) cuadro 5.

Cuadro 2. Frecuencia de los genotipos del polimorfismo +62G/A en los casos y controles

Variante genica	Síndrome Metabólico N=68	Diabetes Mellitus tipo 2 n=68	TOTAL CASOS n=136	CONTROLES n=136	TOTAL GRUPO ESTUDIO
GG	59(87%)	38(56%)	97(35%)	114(42%)	211(78%)
AA	9(13%)	30(44%)	39(14%)	22(8%)	61(22%)
TOTAL	68(100%)	68(100%)	136	136	272(100%)

Cuadro 3. Características clínicas y bioquímicas de casos y controles de acuerdo al genotipo en la población de Acapulco, Guerrero.

PARAMETRO	CASOS				CONTROLES		
	Síndrome Metabólico		Diabetes Mellitus Tipo 2		Variante GG	Variante AA	
	Variant e GG	Variante AA	Variante GG	Variante AA			
Edad	47± 8	47± 11	55± 10	54± 9	46± 8	47± 11	
Sexo							
	Hombres	24	2	11	9	59	7
	Mujeres	35	7	27	21	55	15
IMC							
	Hombres	35± 14	30± 5	27± 3	30± 5	27± 3	26± 2
	Mujeres	30± 3	30± 3	28± 3	29± 5	26± 5	28± 5
P. Cintura							
	Hombres	105±7	109±10	95±8	102±10	93±8	93±4
	Mujeres	96±8	98±9	93±10	93±10	87±9	89±10
Presión sistólica		119±16	113±8	112± 17	194±107	112±11	114±8
Presión diastólica		78± 12	72± 9	72± 11	71± 11	72± 8	75± 8
Glucosa (mg/dl)		88±13	89±13	202±80	214±85	88±11	89±13
Triglicéridos (mg/dl)		225±97	255±104	207±138	194±107	174±147	150±186
HDL-Colesterol (mg/dl)							
	Hombres	34± 7	39 ±3	38 ± 4	47± 11	50±30	56± 40
	Mujeres	40± 7	37± 8	51 ± 32	45 ± 12	56± 33	76± 56

Media ± Desviación estándar

Al realizar el análisis estratificado se observó que un individuo que tiene el genotipo AA tiene cuatro veces más probabilidades de presentar DMT2 en comparación con los que no tienen este genotipo y es estadísticamente significativo (RM=4.0, IC95% 2.0 a 8.2 p=0.000), un individuo de sexo masculino con genotipo AA tiene siete veces más probabilidad de presentar DMT2 (RM=7, IC95% 1.9 A 24.7p=0.000) y tres veces esta probabilidad si es de sexo femenino (RM=3, IC95% 1.6 a 6.6 p=0.01). El genotipo AA en una persona con DMT2 se asocia con las dislipidemias; hipertrigliceridemia (RM=8,IC95% 0.95 a 9.6 p=0.002) es decir existe ocho veces más probabilidad que se desarrolle desorden en los triglicéridos por dicho genotipo, y tres veces más probabilidad de hipercolesterolemia si es sexo femenino (RM=3,IC95% 1.3 a 7.5 p=0.005) cuadro 6.

Cuadro 4. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo +62G/A en el gen de la resistina de casos y controles

Grupo por Diagnóstico		Frecuencia alélica
	n	+62A
Sujetos sanos	136	0.401
Sujetos con Síndrome Metabólico	68	0.363
Sujetos con Diabetes Mellitus Tipo 2	68	0.664

NOTA: Calculado por el método de Hardy-Weinberg

Cuadro 5. Asociación del polimorfismo +62 G/A con las características de la población total de estudio.

Genotipo AA	RM IC(95%)	P
Sexo		
Masculino	1.0 (-)	-
Femenino	2(1.0 – 3.5)	0.03
IMC		
< 30 kg/m ²	1.0 -	-
> 30 kg/m ²	1(0.8 – 2.7)	0.2
Presión Arterial sistólica		
sin Hipertensión	1.0 -	-
con Hipertensión	0.3(0.09 - 1.2)	0.07
Presión Arterial diastólica		
sin Hipertensión	1.0 -	-
con Hipertensión	0.7(0.3 - 1.6)	0.4
Glucosa		
<126 mg/dl	1.0 -	-
> a 126 mg/dl	4(1.8 – 7.0)	0.000
Triglicéridos		
< 150 mg/dl	1.0 (-)	-
> 150 mg/dl	0.8(0.3 – 1.5)	0.3
HDL-Colesterol Bajo		
Sexo masculino		
>40	1.0 (-)	-
< 40	0.8(0.5 - 1.5)	0.5
Sexo femenino		
> 50	1.0	-
< 50	1(0.3 - 7.0)	0.7
Perímetro de Cintura		
Masculino		
< 102 cm	1.0 (-)	-
> 102 cm	2 (0.6 - 4.5)	0.3
Femenino		
< 88 cm	2(0.6 - 4.0)	0.3
> 88 cm	3 (1.1 - 5.8)	0.01

RMs=Razón de Momios, I.C.95%=Intervalos de confianza al 95%
 (*)=valor y categoría de referencia.

El análisis de regresión logística mostró que el genotipo AA en un individuo ya sea hombre o mujer, representa cinco veces la probabilidad de que presente Diabetes Mellitus Tipo 2 (RM=5, IC95%1.6-18.2 p= 0.007).

La Hipertensión sistólica se asoció con el genotipo AA en los casos de SM (RM=7, IC95%2.4-18.6p=<0.00) y no así con los casos DMT2 (RM=3, IC95%0.33-20.4 p=0.4).

Con este análisis se siguió manteniendo la asociación de este genotipo con la glucosa alterada en un individuo con diabetes, indicando que la presencia de dicho genotipo es estadísticamente significativa para presentar valores de glucosa alterada (RM=4,IC95%1.2-15.7p=<0.01) cuadro 7 y 7.1

Cuadro 6. Asociación del polimorfismo +62G/A con las alteraciones metabólicas de los sujetos en estudio, de acuerdo al diagnóstico.

Alteración	SNP +62G/A	CONTROLES n(%)	CASOS n(%)	Casos 1 Síndrome Metabólico	Casos 2 Diabetes Tipo 2	P <0.05	
						Casos 1	Casos 2
	GG	114(83.8%)	97(71.3%)	1.0*	1.0*		
	AA	22(16.2%)	39(28.7%)	0.8(0.3-1.8)	4(2.0 – 8.2)	0.5	0.000
Sexo					1.0*		
	Masculino	66(49%)	46(34%)	0.7(0.1-3.6)	7(1.9-24.7)	0.6	0.000
	Femenino	70(51%)	90(66%)	0.7(0.1-3.6)	3(1.2-6.6)	0.5	0.01
Perímetro de cintura (obesidad abdominal)							
Sexo Masculino							
	No	55(41%)	15(11%)	1.0*	1.0*	-	-
	Si	11(8%)	31 (24 %)	ND	2(0.5-11.0)	-	-
Sexo Femenino							
	No	42(31%)	16(11%)	1.0*	1.0*	-	-
	Si	28(20%)	74 (54%)	0.6(0.2-2.2)	7(0.9– 8.2)	0.4	0.07
Hipertensión sistólica							
	No	130(96%)	111(82%)	1.0*	1.0*	-	-
	Si	6(4%)	25(18%)	1(0.4-2.4)	4(2.0-8.5)	0.9	0.000
Hipertensión diastólica							
	No	122(90%)	106(78%)	1.0*	1.0*	-	-
	Si	14(10%)	30(22%)	0.3(0.4-2.5)	3(0.3-21.7)	0.2	0.3
Dislipidemia:							
Hipertrigliceridemia							
	< 150 mg/dl	84(62 %)	36(26%)	1.0*	1.0*	-	-
	>150 mg/dl	52(38%)	100(74%)	1(0.4– 3.2)	8(0.95–9.6)	0.8	0.002
HDL-colesterol bajo							
Sexo masculino							
	>40	42(31%)	22(17%)	1.0	1.0*	-	-
	<40	24 (19%)	25(18%)	0.4(0.03- 4.2)	4(0.4- 32.2)	0.4	0.2
Sexo femenino							
	>50	58(42%)	56(41%)	-	1.0*	-	-
	<50	12 (8%)	33 (24%)	0.8(0.3-2.1)	3(1.3-7.5)	0.6	0.005
Glucosa Alterada							
	<126 mg/dl	135(99 %)	77(57 %)	1.0*	1.0*	-	-
	> a 126 mg/dl	1 (1 %)	59(43%)	0.8(0.3-2.0)	4(1.2-15.7)	0.6	0.01

RMs=Razón de Momios, I.C.95%=Intervalos de confianza al 95%, (*)=valor y categoría de referencia..

Cuadro 7 Características asociadas con el genotipo AA por regresión logística entre casos con Síndrome Metabólico y controles.

Genotipo AA	CONTROLES n(%)	CASOS SM n(%)	Análisis bivariado crudo RM(IC 95%)	P<0.05	Regresión logística RM(IC95%)	P <0.05
Genotipo GG	114(84%)	97(71%)	1.0*	-	-	-
Genotipo AA	22(16%)	39(29%)	0.8(0.3 – 1.8)	0.000	1(0.4-2.4)	0.9
HTA sistólica						
No	130(96%)	111(82%)	1.0*	-	1.0*	-
Sí	6(4%)	25(18%)	1(0.4-2.4)	0.9	7(2.4-18.6)	<0.00
Glucosa alterada						
<110 mg/dl	135(99 %)	77(57 %)	1.0*	-	1.0*	-
> a 126 mg/dl	1 (1 %)	59(43%)	0.8(0.3-2.0)	0.6	4 (0.3-43.6)	0.3

RMs=Razón de Momios, I.C.95%=Intervalos de confianza al 95%, (*)=valor y categoría de referencia

Cuadro 7.1 Características asociadas con el genotipo AA por regresión logística entre casos de Diabetes Mellitus tipo 2 y controles.

Genotipo AA	CONTROLES n(%)	CASOS DMT2 n(%)	Análisis bivariado crudo RM(IC 95%)	P<0.05	Regresión logística RM(IC95%)	P <0.05
Genotipo GG	114(84%)	97(71%)	1.0*	-	-	-
Genotipo AA	22(16%)	39(29%)	4(2.0 – 8.2)	0.000	5(1.6-18.2)	0.007
HTA sistólica						
No	130(96%)	111(82%)	1.0*	-	1.0*	-
Sí	6(4%)	25(18%)	4(2.0-8.5)	0.000	3(0.33-20.4)	0.4
Glucosa alterada						
<110 mg/dl	135(99 %)	77(57 %)	1.0*	-	1.0*	-
> a 126 mg/dl	1 (1 %)	59(43%)	4(1.8-7.0)	0.000	726(87.5-6029.8)	0.000

RMs=Razón de Momios, I.C.95%=Intervalos de confianza al 95%, (*)=valor y categoría de referencia

IV.- DISCUSION Y CONCLUSION

En este estudio al comparar algunas características clínicas entre los casos y controles, se observa que estos últimos tienen un valor promedio de triglicéridos que se encuentra arriba del valor estándar es decir, el valor es alto al igual que los casos, esto es porque los pacientes que se consideran sanos, podían presentar dos de los cinco parámetros mencionados (perímetro de cintura mayor de 88 cm en la mujer o mayor de 102 cm en el hombre, triglicéridos mayor de 150 mg/dl, HDL colesterol bajo < 40 en mujeres o < 50 en hombres, presentar niveles de glucosa > 110 mg/dl e Hipertensión Arterial mayor de 135/85 mmHg) sin llegar a ser diagnosticados con Síndrome Metabólico de tal forma que quedan incluidos dentro de los controles.

En otros dos estudios realizados en población china y en población alemana solamente analizaron sujetos con Diabetes y sujetos sin diabetes. En éste estudio además de incluir pacientes con Diabetes también se incluyeron pacientes con Síndrome Metabólico. La fisiopatología entre estas dos entidades clínicas ha radicado en la resistencia a insulina la cual podría explicarse por factores ambientales como la obesidad y factores genéticos como los SNPs o variantes génicas. En éste estudio, de acuerdo a las variantes génicas del SNP +62G/A, se encontró que el genotipo AA en los casos (SM=9, DMT2=30), tuvo una frecuencia de 14.4% más alta que los controles (8.0%) a diferencia de lo que reportaron Min Shin Tan y colaboradores,²² quienes encontraron este genotipo AA con menos frecuencia en diabéticos que en los no diabéticos, esta diferencia quizás pueda deberse al tamaño de muestra utilizado aquí de 272 sujetos y en los otros dos estudios; 1102 en una población china y 818 en una población alemana. Los datos de éste estudio realizado en población de Acapulco, Guerrero, México, mostraron que el genotipo AA de éste SNP +62G/A se asocia con hipertensión en casos de SM pero no así con Hipertensión en los casos DMT2. Berthold y colaboradores al realizar un estudio de éste SNP +62G/A en alemanes caucásicos encontraron que el genotipo AA se encontró asociado con hipertensión en sujetos sanos más no en sujetos con Diabetes,²³ sin embargo

en éste estudio la asociación entre la presencia de Diabetes Mellitus tipo 2 y la presencia del genotipo AA fue estadísticamente significativa.

Los desordenes metabólicos están presentes en ésta población de estudio y de igual manera que en las otras poblaciones donde se analizó este mismo SNP (+62G/A) ^{22,23} pero en ninguno de los estudios estos desordenes (triglicéridos elevados, colesterol HDL bajo, Índice de Masa Corporal y obesidad abdominal) han sido significativos.

En el análisis por regresión logística los desordenes asociados con el genotipo AA en este estudio fueron: la glucosa alterada (RM=726, IC95% 87.5 a 6029.8 p=0.000) que puede predisponer a un individuo a resistencia a insulina y con el tiempo posiblemente a una diabetes mellitus tipo 2, pero no a Síndrome Metabólico (RM=4, IC95% 0.3 a 43.6 p=0.3) según los datos observados aquí, sin embargo la Hipertensión sí se asoció con el genotipo AA en pacientes con Síndrome metabólico (RM=7, IC95% 2.4 a 18.6 p=0.000). Min Shin Tan y colaboradores, reportaron que éste polimorfismo puede ser un factor independiente asociado con presión arterial sistólica y diastólica en pacientes con diabetes tipo 2, sugiriendo que la resistina puede estar jugando un papel en la patogénesis de Diabetes mellitus tipo 2 e hipertensión relacionada a resistencia a insulina²². La vinculación de hipertensión con la insulina es derivado de la observación de que esta hormona tiene un efecto directo sobre la pared arterial donde estimula la proliferación del músculo liso habiendo evidencias de que la vasodilatación mediada por insulina es dañada en un estado resistente a insulina permitiendo de esta forma la hipertensión.³² Los dos desórdenes (glucosa alterada e hipertensión sistólica) asociados con el genotipo AA significativamente, están estrechamente relacionados por el factor resistencia a insulina que no solo puede afectar el metabolismo de la glucosa sino que posiblemente puede permitir la hipertensión .

Datos previos han reportado que éste síndrome antecede a la Diabetes y que uno de sus desórdenes comunes es la resistencia a insulina, por lo tanto el genotipo AA de éste polimorfismo +62G/A podría estar asociado con hipertensión relacionada a resistencia a insulina en pacientes con Síndrome

Metabólico en esta población estudiada, posteriormente ocasionando una intolerancia a la glucosa y evolucionar a una Diabetes de hecho, en este estudio se demostró que el genotipo AA de este polimorfismo aumenta tres veces el riesgo para pasar de síndrome metabólico a Diabetes Mellitus Tipo 2 (RM=3, IC95% 2.4 a 3.7 $p=0.001$) y que la frecuencia del alelo +62A está predominando en estos pacientes con DMT2 (0.664) en comparación con los pacientes con SM (0.363) y los sujetos sanos (0.401). Considerando que los SNPs deben estudiarse por poblaciones, llama la atención que la frecuencia encontrada de éste alelo en los sujetos sanos es alta, comparada con la encontrada por Cao y Hegele en sujetos que no tienen antecedentes familiares de DMT2 y muestras de DNA de sujetos sanos de varios grupos étnicos, reportando una frecuencia de: 0.15, 0.11, 0.13 y 0.05 en Africanos, Caucasicos, Chinos e Indios del Este, respectivamente y 0.00 tanto en Amerindios e Indígenas. Con esta información se habría esperado encontrar una frecuencia baja o nula ya que correspondemos a los amerindios, sin embargo debemos reconsiderar que la población estudiada de Acapulco, Guerrero está muy cercana a una región (costa chica) donde ya existe mezcla con raza africana y esto posiblemente explique un poco la frecuencia de este alelo encontrada aquí, sin dejar a un lado el factor ambiental.

Actualmente se conoce que algunos SNPs pueden afectar la expresión del gen o modificar la función de una proteína. Se ha reportado que la proteína resistina se encuentra en concentraciones elevadas en pacientes con DMT2¹²; y que a nivel de adipocitos inhibe la captación de glucosa por GLUT-4¹⁰ provocando posiblemente una resistencia a insulina. Aunque el mecanismo exacto de cómo puede actuar esta proteína no se sabe, recientemente se dio a conocer un estudio realizado en Toronto, Canada sobre el papel de la resistina en la patofisiología de resistencia a insulina, estos estudios se realizaron en cultivos celulares derivados células de músculo esquelético de rata (L6), con la finalidad de examinar la captación de la deoxiglucosa-2, la translocación de la proteína GLUT-4 y la concentración de la proteína GLUT-4, así mismo el nivel de fosforilación y contenido total de las proteínas que forman parte de la señalización activada por insulina, lo que incluye: la subunidad beta del receptor de insulina (IRbeta), el Substrato Receptor de Insulina (IRS), Akt y la

cinasa glucogeno sintetasa-3beta (GSK-3beta).³³ Ellos reportaron que al administrar resistina (50nmol/l, 0-24 h) en células L6, ésta regula la función de IRS-1 y AKt1; éstas son dos proteínas que forman parte de esta cascada de señalización y que en condiciones normales cuando la insulina se une a su receptor son fosforilados los residuos de tirosina en la subunidad beta de dicho receptor y la proteína IRS-1 es la primera proteína que recibe la señal por fosforilación en tirosina para mandar el mensaje a otras proteínas como p85, p110, hasta llegar a AKt1 que es una proteína que tiene que ver con la translocación de la proteína GLUT-4 hacia la membrana celular. Cuando se da tratamiento con resistina a estas células, se observó que los niveles proteínicos de IRS1 es baja y disminuye su fosforilación de tirosina, también disminuye la fosforilación de AKt sobre las proteínas T308 y S473 y la producción de Akt y Akt1, además disminuye la captación de deoxiguosa-2 estimulada por insulina y el contenido de GLUT-4, disminuye la síntesis de glucógeno y la fosforilación de GSK-3beta.

Ante estas observaciones ellos sugieren que resistina regula la función de IRS-1 y Akt, también disminuye la translocación de GLUT4 y la captación de glucosa en respuesta a la insulina, por lo tanto resistina tiene un papel potencial en la patofisiología de diabetes tipo 2 en obesidad.³³

Al relacionar lo anterior con el SNP +62G/A, podemos sugerir, que el genotipo AA presente en la región 3'UTR, podría estabilizar el mensajero y de esta manera, incrementar la concentración de resistina lo que conlleva a la desestabilización de la vía de señalización en respuesta a la insulina, favoreciendo la falta de translocación del transportador GLUT4 a la membrana y por ende la resistencia a insulina.

Los límites de éste estudio es que no se contó con un tamaño de muestra más extenso con respecto a los otros estudios hechos en población china y alemanes caucásicos, y tampoco se midieron las concentraciones séricas de la resistina.

V.- REFERENCIAS

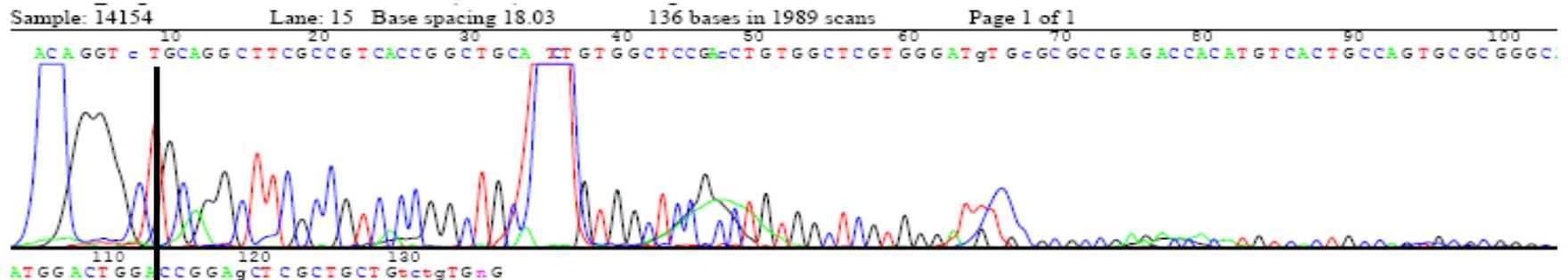
- 1.- Martínez BE, Rodríguez MC, Martínez JA, Síndrome metabólico, resistencia a la insulina y metabolismo tisular, *Endocrinol Nutr* 2003; 50(8):324-33.
- 2.- Zimmet P, Boyko EJ, Collier GR, Courten de M. Etiology of the Metabolic Syndrome: Potential Role of Insulin Resistance, Leptin Resistance, and Other Players. *Annals New Yorks Academy of Sciences* 25-41
- 3.- González C. A. Consenso Mexicano sobre el Tratamiento Integral del Síndrome Metabólico, *Rev Mex Cardiol* 2002; 13 (1): 4-30
- 4.- Moreno MJ, Martínez JA. El tejido Adiposo: órgano de almacenamiento y órgano secretor, *Anales del Sist San Nav* 2002;25:29-39.
- 5.- Abel ED, Peroni O, Kim JA, Kim YB, Boss O, Hadro E, et al. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 2001;409:729-33
- 6.- Shuldiner A. R., Yang R., Gong D-W, Resistin, Obesity, and Insulin Resistance- The emerging Role of the adipocyte as an Endocrine Organ., *The New England Journal of Medicine*, November 2001 vol. 345,(18, pp.1345-1346
- 7.-Kahn BB, and Flier JS, Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*, 2000; 106473-481.
- 8.- Stepan CM, Balley ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, et al. The Hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, 2001;409(18):207-212.
- 9.- Rajala MW, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Adipose derived resistin and gut-derived resistin-like molecule- β selectively impair insulin action on glucose production. *J Clin Investigation*, 2003;111(2):225-230.
- 10.-Yamauchi MD, Bovenkerk JE, Juliar BE, Watson W, Kerr K et al, Serum Resistin (FIZZ3) Protein Is Increased in Obese Humans, *J Clin Endocrinol Metab*, November 2003, 88(11):5452–5455
- 11.- Ma X, Warram JH, Trischitta V, Doria A. Genetic Variants at the Resistin Locua and Risk of type 2 Diabetes in Caucasians, *J Clin Endocrinol and Metab* 2002; 87(9):4407-4410
- 12.- Engert JC, Vohl M-C, Williams SM, Lepage P, Loredó-Osti JC, Faith J. et al. 5' Flanking variants of Resistine are Associates with Obesity, Diabetes. 2002; 51: 1629-1634

- 13.- Yang R-Z, Huang Q, Xu A, McLenithan JC, Eison JA, Shuldiner AR, et al. Comparative studies of resistin expression and phylogenomics un human and mouse. *Bichemical and Biophysical Research Communications*, 2003;310:927-935.
- 14.- Banerjee RR, Lazar MA. Dimerization of Resistin and Resistin-like Molecules is Determined by a Single Cysteine, *J Biology of Biological Chemistry*, 2001;276 (28): 25970-25973.
- 15.-Mcterman PG. Increased resistin gene and protein expression in human abdominal adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2407-10.
- 16.-Banerjee RR, Lazar MA, Resistin: molecular history and prognosis *J Molecular Med* 2003
- 17.- Cho YM, Youn BS, Chung. SS, Kim KW, Lee HK, Yu K-Y, et al. Common genetic polymorphism in the promoter of resistin gene are major determinants of plasma resistin concentrations in humans, *Diabetología* 2004;47: 559-565.
- 18.-Smith SR, Bai F, Charbonneau C, Janderova L, and Argyropoulos G, 2003. A promoter genotype and oxidative stress potentially link resistin to human insulin resistance. *Diabetes* 52:1611-1618.
- 19.-Wong H, Chu WS, Hemphill C, Elbein S. Human Resistin Gene: Molecular Scanning and Evaluation of Association with Insulin Sensitiviti and Type 2 Diabetes in Caucasians, *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(6) : 2520-2524.
- 20.- Pizzuti A, Argiolas A, Di Paola R, Baratta R, Rauseo A, Bozzali M. et al. An ATG Repeat in the 3'-untranslated Region of the Human Resistin Gene Is Associated with a Decreased Risk of Insulin Resistance, *J. Clin Endocrinol and Metab* 2002;87 (9): 4403-4406
- 21.- Cao H and Hegele. Single nucleotide polymorphisms of the resistin (RSTN) gene, *J Hum Genet*, 2001:46:553-555.
- 22.-Tan M-S, Chang S-Y, Chang D-M, Tsai C-R J, Lee Y-J. Association of Resistin Gene 3'-Untranslated Region +62G ---A Polymorphism with Type 2 Diabetes and Hypertension in a Chinese Population, *Journal of clinical Endocrinol & Metab* 2003;88(3):1258-1263.
- 23.-Berthold G, Giannakidola E, Fausta M, Kratzsch J Berthold HK, and Krone W. Resistin gene 3' untranslated region +62G/A polymorphism is associated with hypertension but not diabetes mellitus type 2 in a German population. *J I Med* 2005 258(6):518

- 24.- Jun AH, Lee D, Lee KH and Bhak J. The association of Alu repeats with the generation of potential AU-rich elements (ARE) AT 3`UTR untranslated regions, BMC Genomics 2004, 5:97
- 25.- Del Arco A, Peralta S, Carrascosa JM, Ros M, Andres A and Arribas C. Alternative splicing generates a novel non-secretable resistin isoform in Wistar rats, FEBS Letters 2003: 555:243-249
- 26.- Nohira T, Nagao K, Kameyama K, Nakai H, Fukumine N et al, Identification of an alternative splicing transcript for the resistin gene and distribution of its mRNA in human tissue, European Journal of Endocrinology 2004 151-154.
- 27.-Youn BS, Yu KY, ParK HJ, Lee NS, Min SS et al. Plasma Resistin Concentrations by Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay Using a Newly Developed Monoclonal Antibody Are Elevated in Individuals with Type 2 Diabetes Mellitus. J Clin endocrinol Metab, 2004;89(1):150-156.
- 28.- Shojima N, Sakoda H, Ogihara T, Fujishiro M, Katagiri H et al. Humoral Regulation of Resistin Expression in 3T3-L1 and Mouse Adipose Cells, Diabetes 2002;51: 1737-1744.
- 29.- Shuldiner AR, Yang R and Gong DW. Resistin, Obesity, and Insulin Resistance – The Emerging Role of the Adipocyte as an endocrine organ. N Engl J Med, 2001;345(18): 1345-1346.
- 30.-Ma X, Warran JH, Trischitta V and Doria A. Genetic Variants at the Resistin Locus and Risk of Type 2 Diabetes in Caucasians, J clin Endocrinol Metab, 2002;87(9):4407-4410.
- 31.-Osawa H, Onuma H, Murakami A, Ochi M, Nishimiya T et al. Systematic Search for Single Nucleotide Polymorphisms in the Resistin Gene. The absence of evidence for the Association of Three Identified Single Nucleotide Polimorphisms with Japanese Type 2 Diabetes. Diabetes, 2002;51: 863-866
- 32.-Tack CJ, Ong MK, Lutterman JA, Smits P. Insulin-induced vasodilatation and endothelial function in obesity/insulin resistance. Effects of troglitazone. 1998 Diabetologia 41:569-576.
- 33.- Palanivel R, Maida A, Liu Y and Sweeney G. Regulation of insulin signaling, glucose uptake and metabolism in rat skeletal muscle cells upon prolonged exposure to resistin. 2006 Diabetologia 49(1):183-90.

VI.-ANEXO

Secuenciación de un fragmento de 249 pb del gen de la resistina, amplificado en este estudio y que corresponde a la secuencia reportada en la literatura.



AG AGTCCACGCT CCTGTGTT
 CCCGCTCCCA CCCTCAGCCT CCCAGCTCAG AGTCCACGCT CCTGTGTTCC
 GGGCTGCAGG CTTCGCCGTC ACCGGCTGCA CTTGTGGCTC CGCCTGTGGC
 TCGTGGGATG TGC GCGCCGA GACCACATGT CACTGCCAGT GCGCGGGCAT
 GGACTGGACC GGAGCGCGCT GCTGTCGTGT GCAGCCCTGA GGTCGCGCGC
 AGCGCGTGCA CAGCGCGGGC GGAGGCGGCT CCAGGTCCGG AGGGGTTGCG
 GGGGAGCTGG AAATAAACCT GGAGATGATG ATGATGATGA TGATGATGAT
 GCTGG AAATAAACCT GGAGATG

*Secuencia reportada en la literatura y en el banco de genes [ref (NM_020415)]

* Iniciadores que delimitan este fragmento de 249 pb: Sentido 5'AGA GTC CAC GCT CCT GTG TT 3' Antisentido 5'CAT CTC CAG GTT TAT TTC CAGC 3'