



---

Universidad de Republica Oriental Del Uruguay.

Facultad de Ciencias.

Pasantía de Grado

Profundización Genética & Evolución.

Laboratorio del Grupo de Investigación en Genética Humana.  
Departamento de Genética, División Biología Molecular y Genética del  
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. IIBCE

“Estudio de la prevalencia del SNP Arg972  
del gen Sustrato-1 del receptor de insulina  
(IRS-1) en una muestra de pacientes  
diabéticos.”

Marzo 2010

Tutora: *Dra. Adriana Mimbacas*

*Br. Ana Laura Reyes Abalos*

C.I: 3.989.815-5

## Índice General.

---

<i>Temario</i>	<i>Pág</i>
<b>1.</b> Índice General	1
<b>2.</b> Índice de Tablas y Figuras	2
<b>3.</b> Prólogo	3
<b>4.</b> Resumen	4
<b>5.</b> Introducción	5
I.    Antecedentes: Resistencia a la insulina	5
II.   Mecanismos de Acción de la insulina	6
III.  Gen IRS-1: Estructura y función	8
IV.  Justificación	12
V.   Hipótesis	13
VI.  Objetivos generales	13
VII. Objetivos específicos	13
<b>6.</b> Materiales y métodos:	14
I.    Selección de pacientes y extracción de ADN	14
II.   Análisis por PCR	14
III.  Análisis de la secuencia de ADN	16
IV.  Análisis estadístico	16
<b>7.</b> Resultados:	17
I.    Análisis de Biología molecular:	
Genotipificación de las muestras mediante PCR-RFLPs	18
a)- Amplificación por técnica de PCR a tiempo final	18
b)- Visualización del Producto de PCR	18
c)- Visualización de las digestiones enzimáticas	19
II.  RT-PCR	22
a)- Análisis se HRM y Melt:	22
III. Análisis de la secuencia de ADN	23
Cromatogramas de Secuencia	23
<b>8.</b> Discusión:	24
I.  Conclusiones	26
II. Perspectivas	27
<b>9.</b> Bibliografía	29
<b>10.</b> Agradecimientos	34
<b>11.</b> Anexo I	35

**12.** Anexo II

36

**Índice de Tablas y Figuras.**

---

	<i>Pág.</i>
<b>Tabla 1.</b> Características clínicas y bioquímicas de la población en estudio.	17
<b>Tabla 2.</b> Equilibrio Hardy-Weinberg, frecuencias genotípicas y génicas para la variante alélica Arg972 del gen IRS-1	20
<b>Figura I1.</b> Control fisiológico de la secreción de insulina	6
<b>Figura I2.</b> (A) Representación esquemática de la estructura molecular de la proteína IRS-1	7
(B) Mecanismo de activación	7
<b>Figura I3.</b> Diagrama de la proteína IRS-1 Humana	8
<b>Figura I4.</b> Diagrama de los efectos funcionales de la variante Arg972 del gen IRS-1 en la secreción de insulina y su mecanismo de acción	10
<b>Figura R1.</b> Gel de agarosa 1X para visualizar el PCR del gen IRS-1	18
<b>Figura R2.</b> Gel de poliacrilamida al 8% (38:2) para analizar las digestiones enzimáticas	19
<b>Figura R3.</b> Análisis de Genotipificación para la variante alélica Arg972por PCR – RFLPs:	
(A)- Frecuencias genotípicas	21
(B)- Frecuencias génicas	21
<b>Figura R4.</b> Genotipificación del SNP (variante alélica Arg972 del gen IRS-1) mediante RT – PCR	22
<b>Figura R5.</b> Cromatogramas de secuencia	23
<b>Figura R6.</b> Alineamiento de las secuencias nucleotídicas	23

---

*“La ciencia es una delicia; la evolución nos ha hecho de modo tal que el hecho de comprender nos da placer porque quien comprende tiene posibilidades mayores de sobrevivir”*

En homenaje al Dr. *Carl Edward Sagan*

Texto citado de su libro *Cosmos*.

## Resumen:

La diabetes mellitus tipo 2 es considerada un paradigma de una enfermedad multifactorial poligénica, donde variaciones comunes en varios genes actúan recíprocamente para causar la enfermedad. Su patogénesis se caracteriza por la combinación de resistencia a la insulina periférica y daño en la capacidad secretora de insulina en las células- $\beta$  pancreáticas. La insulino-resistencia periférica produce, por un mecanismo reflejo, una hipersecreción insulínica con la correspondiente hiperinsulinemia para mantener la normoglucemia durante varios años. En estos procesos la insulina es una hormona clave para el comienzo de una gran variedad de actividades metabólicas mediante su unión al receptor de insulina y la propia activación intrínseca de tirosinquinasa. El gen IRS-1: "Insulin receptor substrate-1" fue el primer sustrato identificado y representa el prototipo de las proteínas de la familia IRS. Uno de los polimorfismos más prevalentes, la sustitución aa Gly972Arg presenta un predominio 3 veces mayor en pacientes con diabetes. Este causa un deterioro de la asociación del IRS-1 con la actividad quinasa del fosfatidilinositol-3. Se ha planteado que este polimorfismo es uno de los responsables de la presencia de insulino-resistencia. El objetivo del presente trabajo es determinar la prevalencia del SNP Arg972 del gen Sustrato-1 del Receptor de Insulina (IRS-1) en una población de pacientes diabéticos de la ciudad de Montevideo, Uruguay mediante 2 tipos de técnicas moleculares: a un abordaje clásico empleando la técnica de PCR-RFLPs y apostando a la incorporación de nuevas tecnologías mediante el análisis por RT-PCR. Los resultados obtenidos mostraron la existencia de una elevada proporción de individuos portadores del alelo mutante. 0,62 (86/139) (Gly/Arg), mientras que un 0,38 (53/139) presentaron el alelo salvaje en su forma homocigota Gly/Gly. Se destaca una total ausencia de homocigotas mutantes (Arg/Arg).

*En conclusión:* el análisis molecular del gen IRS-1 en pacientes diabéticos de la ciudad de Montevideo, Uruguay ha revelado una elevada prevalencia de la variante alélica Arg972 del gen IRS-1 lo que explicaría en parte la presencia de insulino-resistencia en estos pacientes. Además la técnica de RT – PCR es una nueva herramienta efectiva que disponemos para el diagnóstico o genotipificación de SNPs.

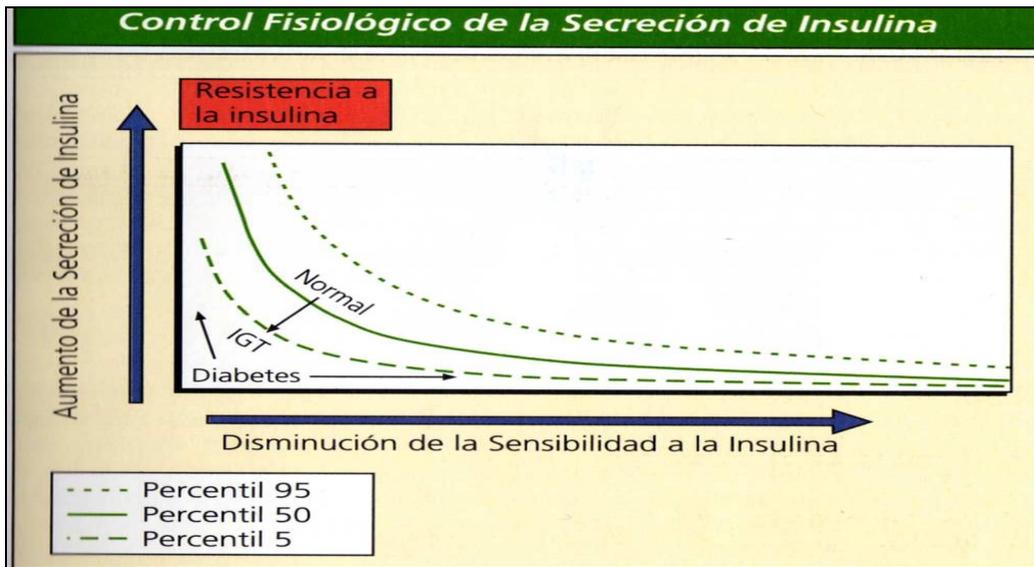
## Introducción

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) es considerada un paradigma de una enfermedad multifactorial poligénica, donde variaciones comunes en varios genes actúan recíprocamente para causar la enfermedad cuando el individuo es expuesto a un ambiente con abundante comida y poco ejercicio físico.

Es el desorden metabólico humano más común, afectando a más del 5% de la población en países occidentales presentándose en el Uruguay con una prevalencia del 8% (*Ferrero y García, 2004*). La patogénesis de la DMT2 se caracteriza por la combinación de resistencia de insulina periférica y daño en la capacidad secretora de insulina en las células- $\beta$  pancreáticas. La predisposición genética actúa recíprocamente junto con factores medioambientales incluyendo la dieta, actividad física y edad que lleva al desarrollo de diabetes. La susceptibilidad a la resistencia de insulina y deficiencia de insulina parecen ser determinados genéticamente (*De Fronzo, 1997*). En la mayoría de la población pre-diabética (aquella que si bien no ha desarrollado la patología ya presenta alteraciones en las glicemias de ayunas), una de las anomalías más tempranas que pueden observarse es la resistencia a la insulina. Este fenómeno precede al desarrollo de intolerancia a la glucosa. Inicialmente, el páncreas intenta esforzarse por compensar la resistencia a la insulina mediante un aumento de la producción y secreción de insulina. Cuando es incapaz de mantener la respuesta adecuada a la hiperinsulinemia se surge la Diabetes (*Sesti et al. 2001*).

### **Resistencia a la Insulina:**

La Resistencia a la Insulina (IR) se define clínicamente como el estado en el cual un incremento dado en la insulina plasmática en un individuo ocasiona un efecto menor de reducción de la glucosa plasmática que en la población normal (*Lebovitz, 2003*). La resistencia a la insulina es el primer paso en la patogenia de la DMT2. La insulino-resistencia periférica produce, por un mecanismo reflejo, una hipersecreción insulínica con la correspondiente hiperinsulinemia para mantener la normoglucemia durante varios años (fig. I1) Si bien la hiperinsulinemia es un mecanismo fisiológico destinado a controlar y mantener la normoglucemia antes que claudique la célula  $\beta$  su presencia no es inocua (*Ruiz, 2004*).

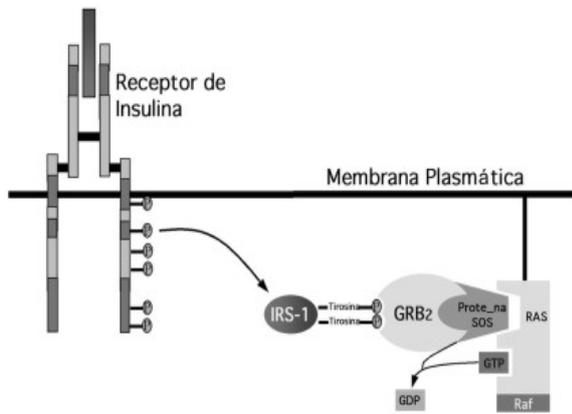


**Figura. I1:** El metabolismo normal de la glucosa está regulado por a un estrecho acoplamiento entre la sensibilidad tisular a la insulina y la secreción de insulina. Cuando la necesidad de insulina es normal se necesita una modesta secreción de insulina para mantener el metabolismo normal de la glucosa. Conforme la acción de la insulina disminuye cada vez se necesita una mayor secreción de insulina para mantener un metabolismo normal de la glucosa. La diabetes se presenta cuando la secreción de insulina se encuentra por debajo del quinto percentil para ese grado particular de resistencia a la insulina (Lebovitz, 2003).

Para comprender mejor el mecanismo de la resistencia a la insulina debemos comenzar por ver cuáles son los mecanismos de acción de la insulina.

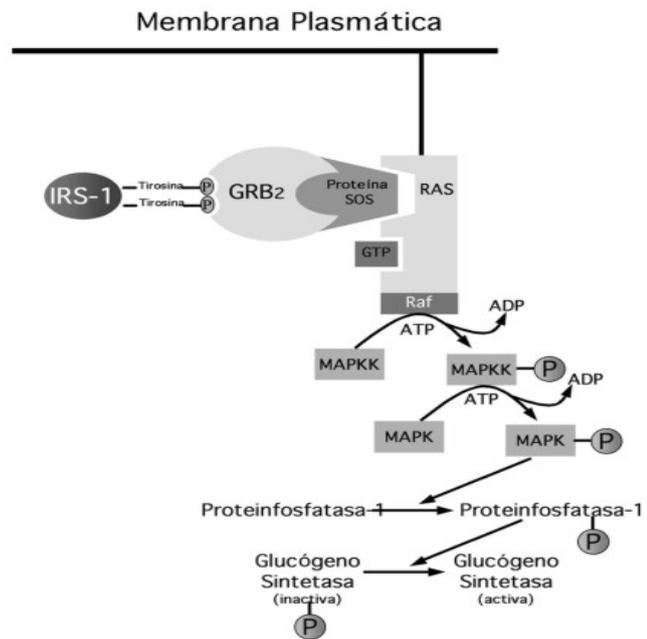
### Mecanismos de acción de la insulina

La insulina es una hormona clave para el comienzo de una gran variedad de actividades metabólicas mediante su unión al receptor de insulina y la propia activación intrínseca de Tirosinquinasa (Fig. I2). Este evento lleva a al fosforilación en residuos de tirosina de una variedad de proteínas de anclaje dentro de las que se encuentran las proteínas del sustrato de receptor de insulina (IRS).



**Figura 1 2. A)-** La estimulación del receptor de insulina mediante la activación de su capacidad enzimática tipo tirosínquinasa y la fosforilación del IRS-1 conduce a la formación del complejo IRS-1 – GRB2-SOS, y por ende a la activación de la proteína RAS.

**Fig. 1 2 B)-** Activación por parte de la proteína RAS de la cascada de fosforilación enzimática tipo quinasas que activan las enzimas reguladoras de las vías metabólicas influenciadas por la Insulina.



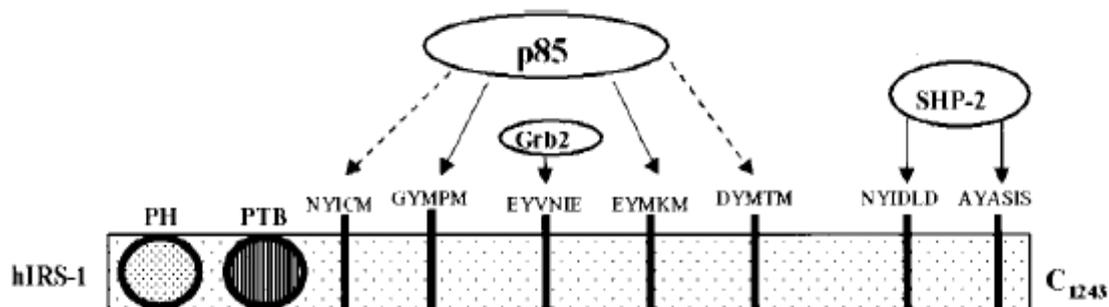
Dentro de la familia de IRS se han identificado cuatro miembros que son muy parecidos en cuanto a su arquitectura general (Sun et al., 1991; 1995; Lavan et al., 1997a, b). Una de ellas es la proteína de anclaje IRS-1 (Muller et al., 2006; Sesti et al., 2001; Ogihara et al., 1997). Esta proteína en particular se une al receptor de insulina cuando éste presenta sus sitios tirosina en estado fosforilado en dirección “río abajo” de la vía de señalización de insulina (Lavan et al., 1991). El sustrato 1 del receptor de insulina (IRS) es el principal sustrato para el receptor de insulina y regula la señalización de la vía de la insulina a lo largo del músculo esquelético, el tejido adiposo y vascular. IRS-1 es a su vez fosforilada en sus múltiples residuos tirosina, haciendo de él un prometedor gen candidato para la resistencia a insulina y DMT2 (McGettrick et al., 2005).

Por tanto, a la luz de su papel de pivote en la señalización de insulina, las proteínas codificadas por los genes IRS, han sido considerados candidatos responsables en desórdenes metabólicos humanos como DMT2 y obesidad. Por tanto tendrían un rol fundamental en el desarrollo de la resistencia a insulina. Si bien no se han podido establecer todos los genes responsables en el desarrollo de esta patología, existen a la fecha algunos genes candidatos (uno de los cuales fue el centro de este trabajo) (Parikh y Leif Groop, 2004).

### GEN IRS-1: “Insulin receptor sustrate-1”. Estructura y Función

IRS-1 fue el primer sustrato identificado y representa el prototipo de las proteínas de la familia IRS (Porzio et al., 1999). El gen de IRS-1 humano se localiza en el cromosoma 2q36-37 (Sesti et al., 2001), conteniendo 21 posibles sitios de fosforilación de tirosinas. Algunos de estos sitios se localizan en motivos con secuencia aminoacídica que se unen a dominios proteicos SH-2, incluso la subunidad reguladora p85 de PI 3-k, Grb-2, Nck, Crk, Fyn, Csk, fosfolipasas Cg, y SHP-2 (Fig. I3) (White, 1997; Sesti 2001).

La relevancia de IRS-1 en la señalización de insulina/IGF-I se sugirió primero por estudios “in vitro” donde IRS-1 fue sobre-expresado o sus niveles disminuyeron por ARNm antisentido (ARNpi). Como consecuencia, esto mostró una sobre-expresión de IRS-1 en las células CHO o 32D (línea celular de un progenitor mieloide con faltante de ambos genes IRS-1 e IRS-2) lo que reforzó los efectos mitogénicos de la insulina (Sawka-Verhelle et al., 1996; Wang et al., 1993; Chen et al., 1995).



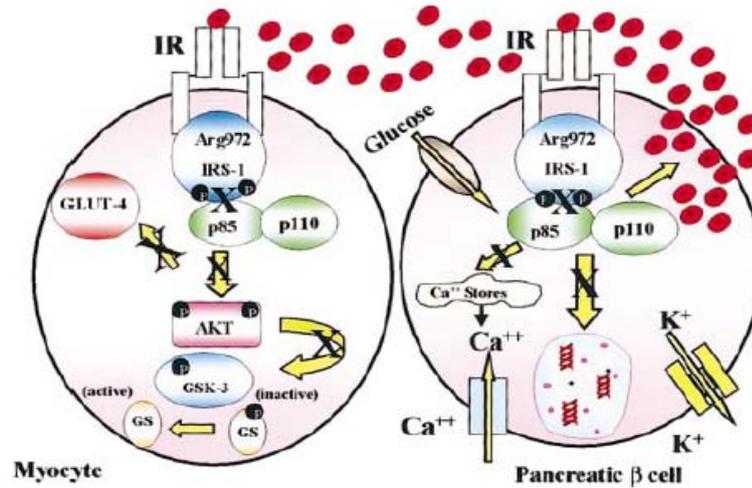
**Figura I3.** Diagrama de la proteína IRS-1 humana, se muestran los dominios PH y PTB. Se indican los sitios putativos de unión para la subunidad reguladora p85 de PI 3-k, Grb2 y SHP-2 (Las flechas enteras indican los sitios de unión fuerte y las flechas punteadas los sitios débiles).

Los estudios más recientes han mostrado que IRS-1 puede también desempeñar un importante papel regulando la secreción de insulina en las células-  $\beta$  pancreáticas. La sobreexpresión de IRS-1 en líneas celulares de insulinoma bTC6-F7 o RIN 1046 - 38 mostraron un incremento en la respuesta secretora de glucosa y la respuesta a glibenclamida (una sulfonilurea de la segunda generación) (Xu et al., 1999; Porzio et al., 1999). Los islotes de Langerhans de ratones knock-out para IRS-1 exhibieron marcados defectos en el contenido de insulina y la respuesta de insulina mediada por glucosa (Kulkarni et al., 1999). Los datos en su conjunto indican que el gen IRS-1 juega un importante papel mediando tanto efectos metabólicos como mitogénicos de la insulina en tejidos periféricos como músculo y tejido adiposo. Esto nos lleva a pensar en un nuevo rol a nivel de la función de la célula-  $\beta$ .

Varios polimorfismos aminoacídicos han sido identificados en el gen IRS-1 (Almind et al., 1993; Laakso et al., 1994; Armstrong et al., 1996; Ura et al., 1996). Almind y colaboradores (1993) fueron quienes describieron por primera vez la mutación Gly-Arg en el codon 972 del IRS-1. La sustitución GGG/AGG la cual implica un cambio del aminoácido glicina por arginina (Gly/Arg) en el codón 972 (Arg972) era el más común de los polimorfismos encontrados en el gen IRS-1, con un predominio 3 veces mayor en pacientes con DMT2 respecto al grupo control (Yamada et al., 1998).

Los dos principales polimorfismos aminoacídicos, el ya descrito Gly972Arg y Ala513Pro son sustituciones localizadas cerca de sitios de fosforilación de tirosina y han sido ligeramente más frecuentes en pacientes diabéticos tipo 2 (Celi et al., 1995; Imai et al., 1994; Hitman et al., 1995; Lepretre et al., 1998). En sujetos dinamarqueses no obesos, la presencia del polimorfismo en el codón 972 fue asociado con insulino resistencia y a su vez con varios otros rasgos del síndrome metabólico (Clausen et al., 1995; Sesti et al., 2001).

Ensayos de transfección han mostrado que la variante Arg972 daña el estímulo de la insulina en la vía de señalización, a través de la PI 3-k (ver fig.14) (Sesti et al., 2001).



**Figura I4.** Esquema de los efectos funcionales de la variante Arg972 del gen IRS-1 en la secreción de insulina y su mecanismo de acción.

La substitución de Gly972Arg causa un deterioro de la asociación del IRS-1 con la actividad quinasa del fosfatidilinositol-3 (*Almind et al., 1996*). En uno de los estudios hechos por Marini y colaboradores (2003), se muestra que la sensibilidad de insulina (evaluada mediante la técnica de “clamp hiperinsulinémico”) mostró una reducción significativa en los pacientes portadores de la variante de Arg972 comparando con los pacientes de genotipo salvaje. Además, portadores de este polimorfismo presentaban varios rasgos del síndrome metabólico, incluyendo altos niveles de triglicéridos totales, proporción del total/HDL colesterol, el nivel de ácidos grasos, y la presión arterial. Estos resultados se encuentran en línea con estudios previos donde informan la presencia de portadores con la variante Arg972 con un índice de masa corporal significativamente más alto, insulina en ayuno elevada, resistencia de insulina y triglicéridos en plasma (*Yamada et al., 1998; Clausen et al., 1995; Imai et al., 1994; Porzio et al., 1999*).

En estudios “in vitro” se ha mostrado que el alelo de R972 produce una pérdida de función del IRS-1 que daña la vía de señalización de la insulina en varios tejidos diana incluyendo músculo esquelético, adiposo y células  $\beta$  pancreáticas (*Sesti et al., 2001; Almind et al., 1996; Marchetti. et al., 2002*). En los estudios “in vivo” se ha informado sobre una asociación entre la variante R972 IRS-1 y resistencia de

insulina (Sesti *et al.*, 2001; Almind *et al.*, 1996; Marchetti *et al.*, 2002; Clausen *et al.*, 1995) y la secreción reducida de insulina (Sesti *et al.*, 2001; Almind *et al.*, 1996; Marchetti *et al.*, 2002; Clausen *et al.*, 1995; Stumvoll *et al.*, 2001).

El papel deletéreo de la variante de R972 en la acción de insulina “in vivo” y la homeostasis de la glucosa ha sido recientemente confirmada por estudios en ratones transgénicos (Hribal *et al.*, 2008). A pesar de tan fuerte evidencia para un papel funcional, los datos acerca de la asociación de esta variante con DMT2 han sido conflictivos. Pese a ello se han realizado estudios de meta – análisis donde se incluyó una importante evidencia disponible de artículos ya publicados referentes a la variante IRS-1, DMT2, RI, que finalmente indican que portadores de la variante alélica Arg 972 del gen IRS-1 presenta un riesgo incrementado en un 25% de padecer DMT2 comparado con no portadores (Jellema *et al.*, 2003). Los resultados entonces sugieren que el gen IRS-1 que presenta el genotipo de Arg927 está asociado con un fenotipo de diabetes particular que ocurre a edades avanzadas.

La variante Arg972 de IRS-1 tiene mayor prevalencia en sujetos con DMT2 que tienen resistencia a insulina asociado o no con dislipidemia (Porzio *et al.*, 1999). En sujetos no diabéticos obesos, la variante Arg972 en su forma heterocigota está asociada con una reducción en el 50% de sensibilidad a la insulina comparado con sujetos obesos sin el polimorfismo (Valverde *et al.*, 1999). Se ha observado la expresión de la variante Arg972 en células L6 de músculo esquelético que causa un deterioro en el transporte de glucosa debido a un defecto en el translocación de transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4 a la membrana plasmática (Hribal *et al.*, 1998).

La sustitución del aminoácido Arg en el codón 972 del IRS-1 es el primero identificado que puede generar defectos en un solo gen involucrado en la señalización de insulina, produciendo resistencia de insulina periférica y daño en la secreción de insulina, dos de los componentes importantes en la patogénesis de DMT2 (Porzio *et al.*, 1999).

En un esfuerzo por elucidar si la variante Arg972 daña la secreción de insulina inducida por secretagogos, se examinó el efecto de Glybenclamide (sulfonilurea de segunda generación). En líneas celulares de Insulinoma de rata (células RIN) que expresan el tipo salvaje mostraron un marcado aumento en la secreción de

insulina estimulada por sulfonilurea comparado con las células RIN control. Las células RIN que expresan Arg972 exhibieron una disminución significativa en la secreción de insulina estimulada por sulfonilurea (comparadas con el control). Datos similares se obtuvieron usando glucosa. Estos datos sugieren que los portadores de esta variante Arg972 pueden presentar respuestas alteradas frente a estas drogas.

## **Justificación**

El estudio de la variante alélica A972 en el sustrato 1 del receptor de insulina, se centra en la heterogeneidad de respuestas que se han observado a lo largo de los pocos estudios realizados respecto al mismo. Dentro de lo que denominamos heterogeneidad de respuesta se encuentran puntos relevantes tales como las fluctuaciones en la prevalencia del polimorfismo, la exhibición de diversos perfiles de comportamiento del SNP en función de las características de los grupos étnicos que participan en las investigaciones así como las condiciones medioambientales particulares a esos mismos grupos de pacientes. Se disponen de resultados que ilustran las dificultades de determinar las contribuciones de la mutación a la susceptibilidad de desarrollar DMT2. A pesar de este hecho, mejorando la definición de los datos obtenidos y disminuyendo la heterogeneidad de las muestras de trabajo sería posible mejorar la habilidad para identificar los efectos genéticos que esta mutación estaría aportando (*Morin. et al., 2009*).

Por otro lado, ha sido demostrada la asociación de este polimorfismo con la resistencia a insulina. Por tal razón planteamos el estudio de la prevalencia de este gen en pacientes diabéticos con un índice de masa corporal mayor a 25 kg/m<sup>2</sup> como punto de partida para luego, poder relacionar estudios de farmacogenética.

## Hipótesis

Ho)- Dadas las características de la población en estudio (BMI > 25 kg/m<sup>2</sup> y RI), la variante Arg972 del gen IRS-1 presentaría una alta prevalencia (≥ 50%).

H1)- La variante Arg972 no se encontraría en alta prevalencia (< 50%).

## Objetivo general:

El objetivo del presente trabajo es determinar la prevalencia del SNP Arg972 del gen Sustrato-1 del Receptor de Insulina (IRS-1) en una población de pacientes diabéticos de la ciudad de Montevideo.

## Objetivos específicos:

- I. Amplificar el fragmento del gen IRS-1 que porta la variante alélica Arg972.
- II. Análisis genético del SNP.
- III. Puesta a punto de la nueva técnica PCR-RT como herramienta de genotipificación de SNPs.

---

## Materiales y Métodos

El estudio de Prevalencia del polimorfismo de nucleótido simple Arg972 del gene IRS-1, se realizó empleando 2 tipos de técnicas moleculares. Con un abordaje de tipo clásico se empleó la técnica de PCR-RFLPs. Finalmente como nueva tecnología de avanzada se implementó la técnica de PCR-RT.

### 1) Selección de pacientes y extracción de ADN

Se seleccionaron para este estudio individuos diabéticos que cumplieran con los siguientes criterios de inclusión:

- a) Diagnóstico certero de diabetes mellitus según criterios de la “American Diabetes Association” (ADA, 2006)
- b) Índice de masa corporal superior a 25 Kg/m<sup>2</sup> Lo que evidencia clínicamente la presencia de insulino-resistencia.

A estos pacientes se les realizó extracción de ADN geonómico con el método de Fenol-cloroformo (ver Anexo I). De las soluciones madres de ADN se realizaron alícuotas de trabajo preparando diluciones a concentraciones fijas de 50 ng/μl o 100ng/μl midiendo concentración y pureza utilizando espectrofotómetro UV/visible (Nanodrop™ 2000).

### 2)- Análisis mediante técnicas de PCR:

Para la genotipificación de las muestras en estudio, se emplearon: una técnica clásica en biología molecular como es PCR-RFLPs y una técnica de última generación como es RT- PCR.

2.1)- PCR a Tiempo Final: Para realizar la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se diseñaron cebadores para amplificar la región de interés utilizando el programa Primer3Plus. Los cebadores utilizados fueron: a)-Forward 5'-GAGAGACTGGCACTGAGG-3' y b)-Reverse 5'-CTGACGGGGACAATC ATCT-3' a una concentración de 10pmol/μl de concentración inicial. La amplificación del SNP se realizó en un volumen final de reacción de 25 μl de master mix (juego de primers, dNTPs a 25mM, enzima Taq polimerasa termoestable a 5U/μl con sus correspondientes buffers KCl 10X y Buffer MgCl<sub>2</sub> a 25mM) y 100 ng de ADN geonómico (ver Anexo II). El programa de ciclado

incluyó: la fase de desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, continuando con 30 ciclos de 95°C por 1min, 56°C por 1min, 72°C por 1 min y luego una elongación final a 72°C por 3 min. Para la técnica de PCR se utilizó un termociclador Biometra. Los productos de PCRs fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio [5mg/ml]. Las corridas electroforéticas se realizaron en buffer TBE 1X utilizando una minicuba submarina horizontal. Se tomaron registros fotográficos digitales de los geles con una cámara Digital Kodak DC 290 EDAS empleando el programa de Kodak 1D V3.5.4.

RFLP: Digestión enzimática: Para la tipificación de los genotipos se realizó la digestión de los productos de PCR con la enzima de restricción Sma-I a 10u/μl (Fermentas), bajos las condiciones de reacción particulares para la enzima recomendados por los fabricantes. Los productos de las digestiones se visualizaron en función de los tamaños de los fragmentos de restricción generados por la enzima empleada, en geles de poliacrilamida al 8% con tinción de nitrato de plata 2% (Ag NO<sub>3</sub>). Las corridas electroforéticas se realizaron en buffer TBE 1X. El patrón de corte con la enzima Sma-I (con sitio de restricción CCC/GGG) para el gen IRS-1 ocasiona con el cambio del aminoácido Gly por Arg la pérdida de un sitio de restricción para la enzima.

2.2)- PCR-en tiempo real (RT-PCR): Es una variante del PCR que se basa en la medición continua de la señal de fluorescencia de la reacción en cadena de la polimerasa a lo largo del ciclado a tiempo real.

El protocolo empleado para la técnica de PCR-RT fue previamente ajustado para el marcador molecular en estudio. El alto grado de sensibilidad del equipo requiere de condiciones específicas, en cuanto a una adecuada manipulación de los reactivos y de la calidad del material de partida. Este último es un punto clave para la obtención de datos robustos. Así como también características particulares del fragmento de ADN en estudio (pureza del ADN, la secuencia de los cebadores), definir las normas o controles adecuados para discriminar entre genotipos y realizar duplicados de las muestras. La precisión de los volúmenes es crucial en la detección de la señal por el equipo, que repercute a la hora de interpretar los análisis mediante High resolution melting (HRM) o curvas de melting (melt). En nuestro estudio para los análisis de HRM y Curvas de melting: se utilizo un Kit comercial de Qiagen, en un volumen final de reacción de 25 μl, así

como el protocolo de ciclado especificado en el mismo. Se empleó un equipo Rotor-Gene 6000 con un Software de análisis de la series 1.7 (Corbett Research, Division de Corbett Life Science).

3)- Análisis de Secuenciación ADN:

Para confirmar que el fragmento amplificado fuese el correcto se analizaron mediante secuenciación un total de 7 muestras tomadas al azar en base a los diferentes patrones obtenidos por RFLPs

4)- Análisis Estadísticos:

El análisis de los resultados fue realizado utilizando paquetes estadísticos como el EpiInfo 6.0, SSCP y Statistic. Se calcularon las frecuencias génicas y genotípicas y se analizó el equilibrio Hardy-Weinberg de los genotipos hallados en la población de estudio. El mismo fue evaluado por el Test de chi cuadrado.

Para todos los análisis se consideró un nivel de significado estadístico de  $p < 0,05$ .

Los datos son mostrados bajo el formato: medida  $\pm$  DS.

Programa de tratamiento de datos del Paquete Microsoft Office, Excel 2003 para la generación de graficas.

## Resultados

Se analizaron un total de 139 individuos (53 hombres, 64 mujeres) con diagnóstico de diabetes mellitus y un índice de masa corporal superior a 25 kg/m<sup>2</sup>. En todos los pacientes se realizó extracción de ADN y análisis del SNP Gly972Arg del gen IRS-1 mediante las técnicas de PCR-RFLP y RT-PCR. Las características clínicas de los pacientes estudiados se detallan en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Características clínicas y bioquímicas de la población estudiada.

<b>Variables</b>	<b><math>\bar{X} \pm DS</math></b>
Edad	51,01 $\pm$ 14.75
Edad de Diag	39.11 $\pm$ 15.56
BMI	28.65 $\pm$ 6,04
HbA1c	8.78 $\pm$ 2.06
Colesterol	199.63 $\pm$ 45.02
HDL	52,60 $\pm$ 16.82
LDL	119, 91 $\pm$ 61.63
Triglicéridos	174,73 $\pm$ 126.15

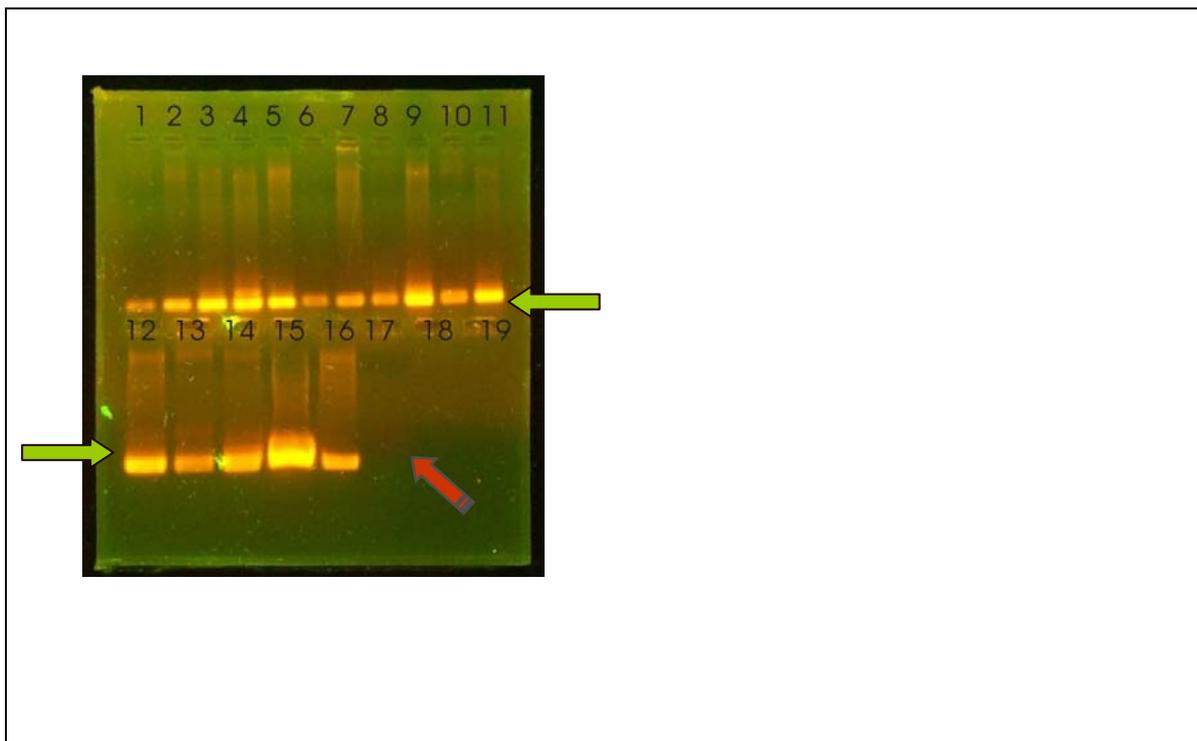
$\bar{X}$  = media; DS = desvío estandard

## 2)- Genotipificación de las muestras mediante:

### 2.1)- PCR-RFLPs:

#### a)- PCR a tiempo final:

El ADN extraído a partir de sangre periférica presentó buena calidad en el total de las muestras seleccionadas. Se procedió luego a la amplificación por PCR con los primers seleccionados obteniéndose un único fragmento de 199pb (identificado por las flechas de color verde claro en ambos carriles superior e inferior del gel de agarosa) (fig R1) que concuerda con el resultado esperado en base a un previo análisis "in silico". En todas las reacciones se incluyó un control negativo sin ADN (señalado por una flecha de color naranja).

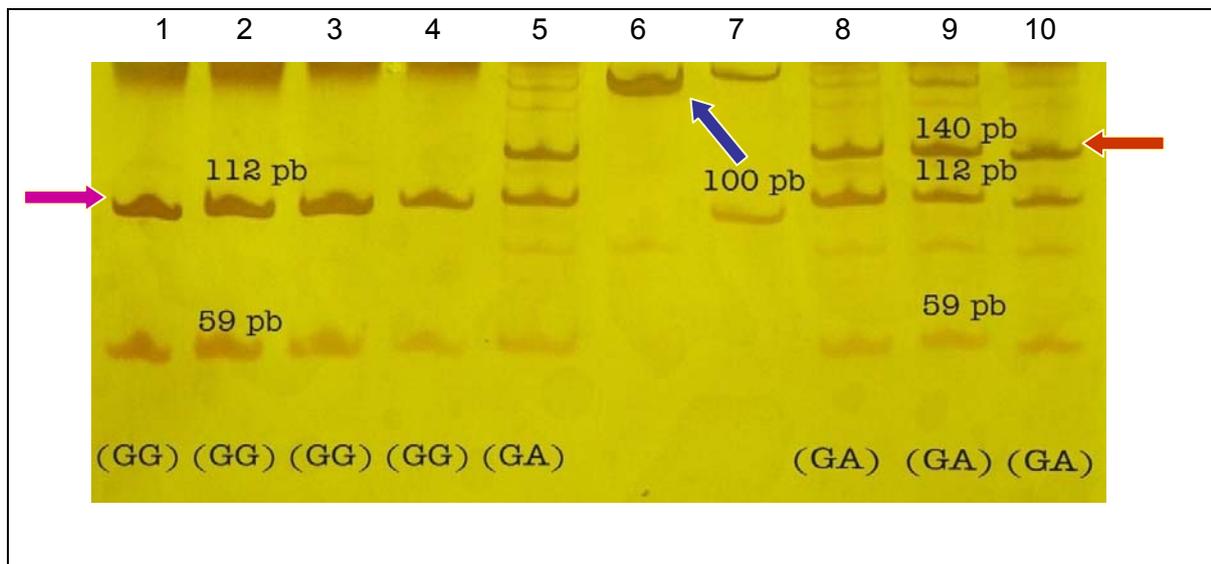


**Figura R1:** Fragmento de 199pb obtenido mediante la reacción de PCR que contiene el polimorfismo en estudio (Arg972). Carriles 1 - 5 y 6 - 15. Productos amplificados, Carril 17: Control negativo [C (-)].

b)- Digestión con Enzima de Restricción Sma-I:

La digestión realizada con Sma-I generó dos patrones de bandeos diferentes según el genotipo homo o heterocigota. Para el homocigota salvaje Gly/Gly se obtuvieron 3 fragmentos de 112 pb, 59 pb y 28 pb y para el genotipo heterocigota Gly/Arg portador de la variante Arg972 presentó un conjunto diferente conformado por 4 fragmentos de 140 pb, 112 pb, 59 pb y 28 pb. (fig. R2). En los individuos heterocigotas para la variante Arg972 la mutación propicia una sustitución aminoacídica en la secuencia nucleotídica CCC/GGG en el codón 972 pasando a ser CCC/AGG. La sustitución de Gly por Arg promueve a su vez la pérdida de un sitio de restricción, al modificarse la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción Sma-I utilizada en el ensayo.

No se identificaron individuos homocigotas mutantes Arg/Arg en la población de estudio. El perfil que describiría este genotipo estaría evidenciando la pérdida de un sitio de restricción para la nucleasa Sma-I, generando así un patrón de sólo 2 fragmentos de restricción de 140 y 59 pb respectivamente.



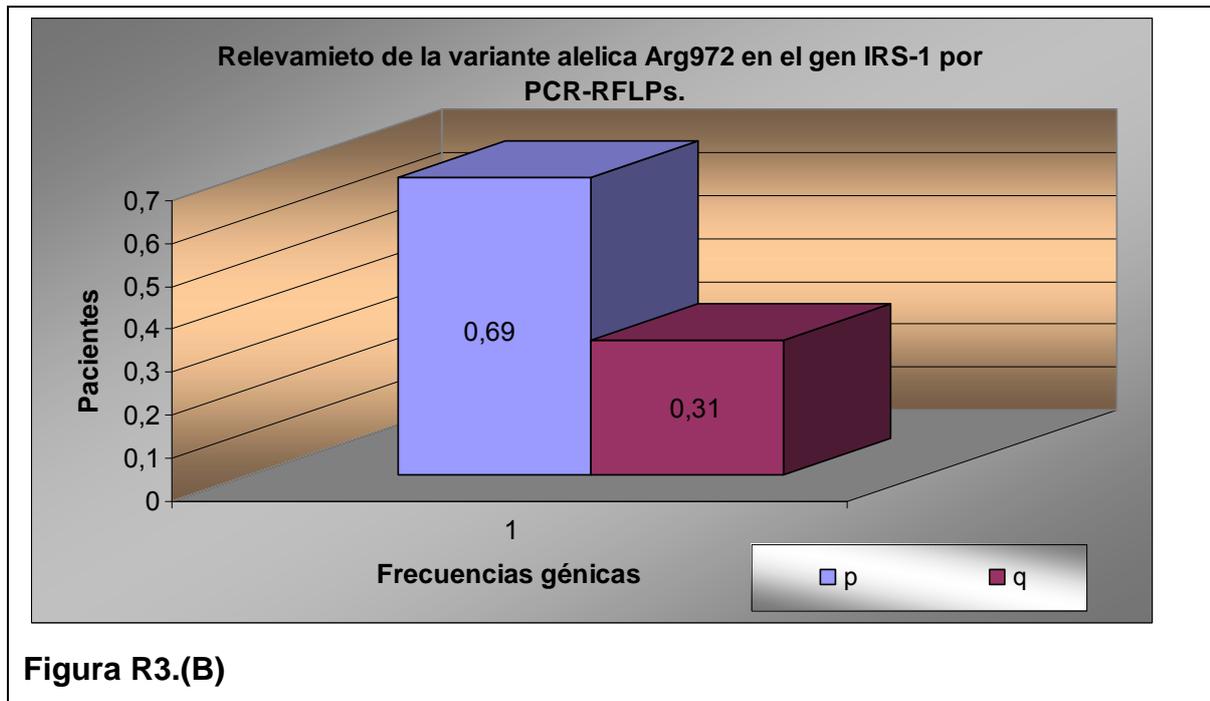
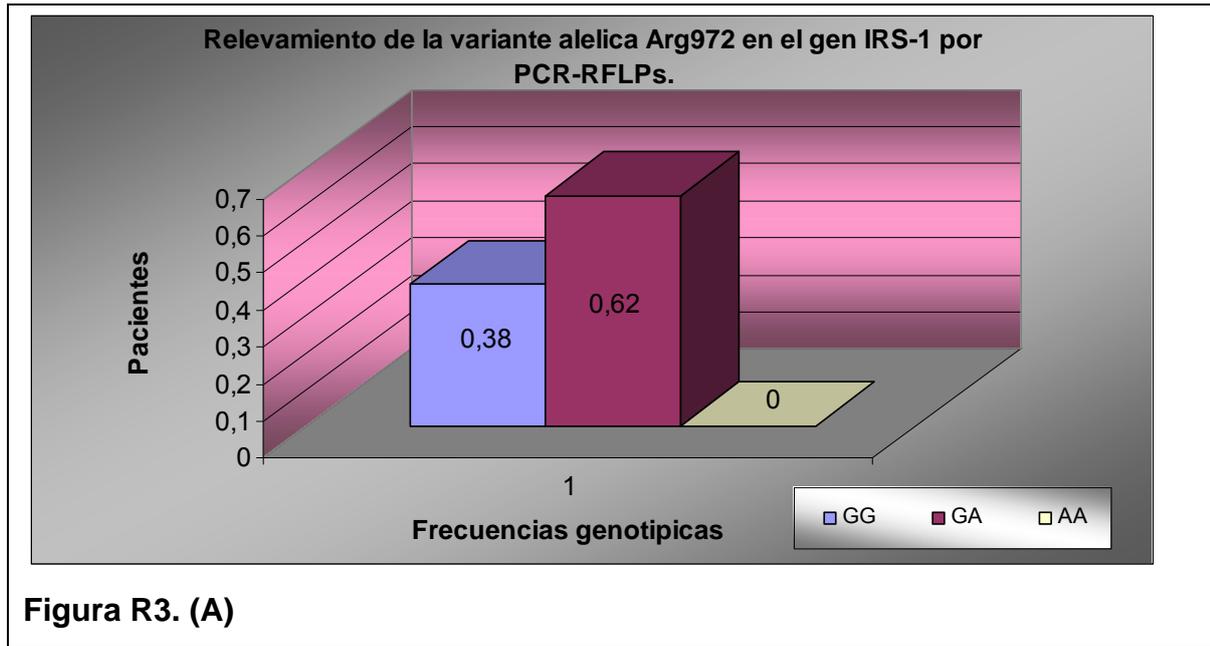
**Figura R2-** Patrones de bandas obtenidas luego de la digestión con la enzima de restricción Sma-I, que reconoce la presencia de la secuencia CCC/GGG. Carriles 1 - 4 homocigotas GG (indicado con flecha de color lila), Carril 5, 8 -10 heterocigota (marcado con una flecha de color marrón), Carril 6: producto de PCR sin digerir como control (señalado con una flecha azul), Carril 7: marcador de peso molecular Ladder 100pb.

Para un total de 139 pacientes diabéticos analizados la proporción de individuos homocigotas Gly/Gly esta representada por un 0,38% respecto a un 0,62% de individuos heterocigotas Gly/Arg portadores del SNP. No se encontraron individuos con el genotipo homocigota mutante Arg/Arg. En la tabla 2. y en la figura R3 se detallan las frecuencias génicas y genotípicas obtenidas para el total muestral de pacientes diabéticos analizados. Las frecuencias halladas no se encuentran en equilibrio de Hardy Weinberg.

**Tabla 2.** Equilibrio Hardy-Weinberg, frecuencias genotípicas y génicas para la variante alélica Arg972 del gen IRS-1. Técnica de PCR-RFLPs.

<b>Gen IRS-1: variante alélica Arg972</b>				
<b>PCR-RFLPs</b>				
<b>Frecuencias genotípicas</b>			<b>T. de P. A. G.</b>	<b>Eq. H-W</b>
GG	GA	AA	N° de individuos GG = 53	No
0,38	0,62	0,00	N° de individuos GA = 86	Equilibrio
<b>Frecuencias génicas</b>				Con
p (Gly)	q (Arg)			P<0,05
0,69	0,31		<b>T. de P. A.</b>	139

*T. de P. A. G. (Total de pacientes analizados para cada genotipo); T. de P. A. (Total de pacientes analizados); Eq. H-W (Equilibrio Hardy-Weinberg). Técnica de PCR-RFLPs*



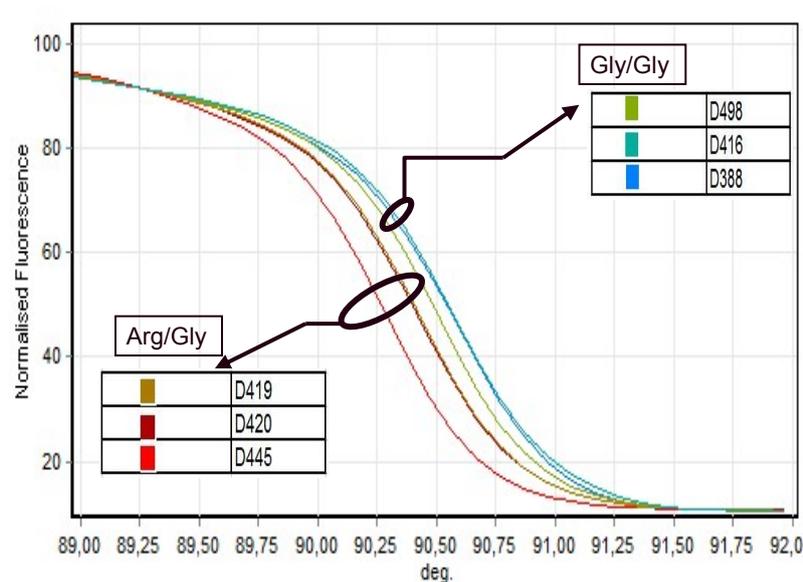
**Figura R3.** Análisis de genotipificación para la variante alélica Arg972 del gen IRS-1 por PCR – RFLPs, en la muestra analizada (n= 139 individuos); **(A)** – Frecuencias genotípicas 0,38 GG (Homocigoto Gly/Gly); 0,62 GA (Heterocigota Gly/Arg); 0,00 AA (Homocigota Arg/Arg). **(B)** - Frecuencias génicas (p = (Gly) 0,69) y q = (Arg) 0,31).

## 2.2)- Resultados de RT-PCR:

### i)- Análisis por HRM:

Se realizaron las tipificaciones utilizando un fluoróforo de tercera generación (Eva Green). Luego de los ajustes correspondientes de la técnica se analizaron al azar algunos de los individuos de la muestra de diabéticos con resultados por PCR a tiempo final y secuenciación. Todas las muestras analizadas mediante HRM y curvas de melting coincidieron con las realizadas con la otra técnica. A continuación se muestran algunas de las gráficas obtenidos por el Rotor Gene 6000 (fig.R4). Son notorias las diferencias expuestas en las trayectorias de las curvas descritas para los dos genotipos que han sido caracterizados en el presente análisis. Es posible definir dos grupos de curvas llamadas regiones de normalización 1 y 2. Las curvas de fluorescencia normalizada para el genotipo salvaje (GG) se agrupan en el cuadrante superior del gráfico (muestras D498, D416 y D388). Las curvas de fluorescencia normalizada que identifican al genotipo heterocigota para la mutación (AG) se agrupan en sentido opuesto al primer grupo, sobre el cuadrante inferior o región 2 (muestras D419, D445 y D420)

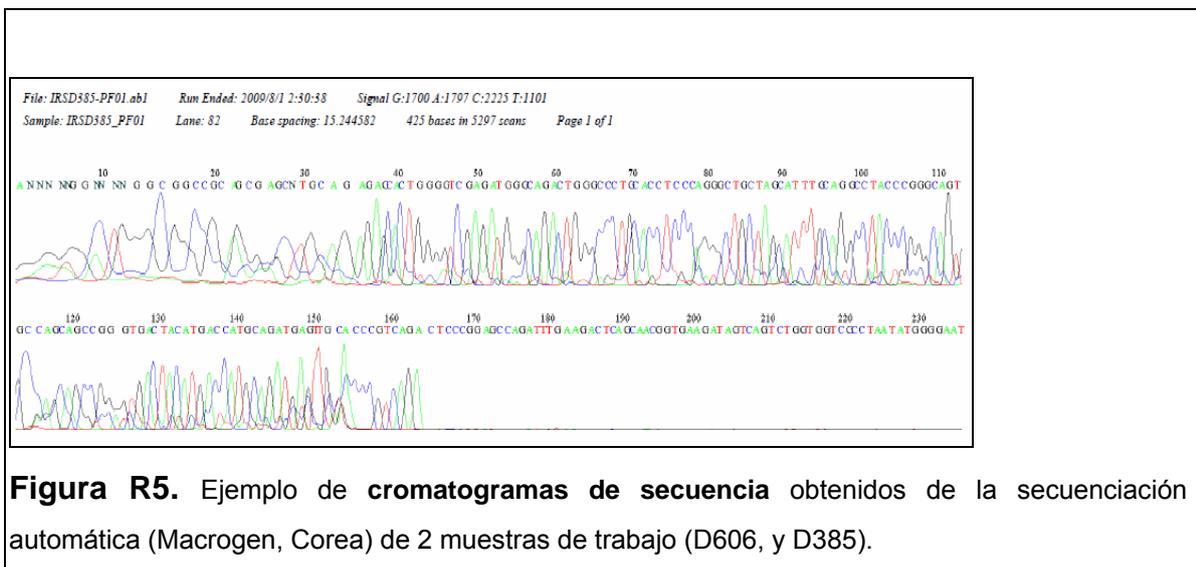
### Normalised Graph for HRM A.HRM



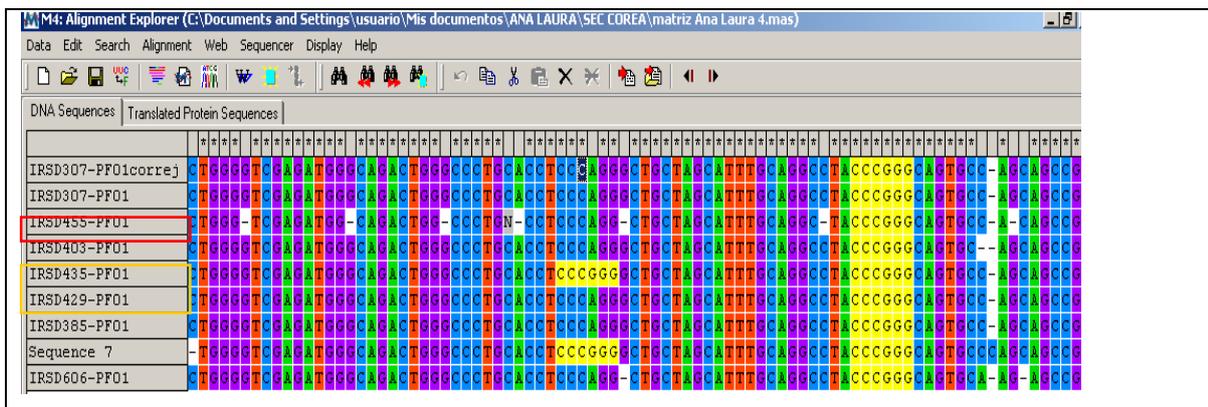
**Figura R4. Genotipificación del SNP (variante alélica Arg972 del gen IRS-1) mediante RT – PCR de una sub-muestra (n= 54 pacientes); GG (Homocigoto Gly/Gly); GA (Heterocigota Arg/Gly).**

### 3)- Resultados de la secuenciación:

Se secuenciaron un total de siete muestras de las cuales seis (IRSD307, IRSD455, IRSD403, IRSD429, IRSD385 e IRSD606) mostraron la presencia de la variante alélica Arg en el codón 972 para el gen IRS-I. La muestra restante presentó el alelo salvaje (IRSD435) (Fig. R5 y 6). Los resultados de la secuenciación confirmaron los resultados obtenidos tanto por PCR a tiempo final como a tiempo real.



Se procedió luego al alineamiento de las secuencias mediante el programa Mega donde se observa claramente la presencia del SNP (fig R6).



## **Discusión:**

La Diabetes mellitus es considerada un paradigma de una enfermedad multifactorial poligénica, donde variaciones comunes en varios genes actúan recíprocamente en un mecanismo de epistasis para generar el estado patológico a su vez asociado a condiciones ambientales propicias como por ejemplo cuando el individuo está expuesto a un entorno de malos hábitos alimenticios y escaso o nulo ejercicio físico (*Parikh and Groop, 2004*).

Dentro de los potenciales genes candidatos que podrían contribuir en la predisposición genética en el desarrollo de diabetes se encuentra el gen IRS-1, uno de los 4 miembros identificados perteneciente a la familia de sustratos receptores de insulina (*Sesti, et al., 2001*). Varios son los polimorfismos aminoacídicos que han sido identificados en este gen (*Almind et al., 1993; Laakso et al., 1994; Armstrong et al., 1996; Ura et al., 1996*). Dentro de éstos el más prevalente corresponde al descrito por Almind y colaboradores (1993) que consiste en una sustitución (GGG/AGG) Gly/Arg en el codón 972. Dicha variante Arg972 es causante de un deterioro en la asociación entre la proteína IRS-1 y la actividad quinasa de la fosfoinositol-3 quinasa (*Almind et al., 1996*).

Enfocados a los roles funcionales de la proteína de anclaje IRS-1 se sabe que la misma se une al receptor de insulina cuando éste presenta sus sitios tirosina en estado fosforilado en dirección río abajo de la vía de señalización de insulina (*Sun et al., 1991*). IRS-1 es a su vez fosforilada en forma concomitante en sus múltiples residuos tirosina, particularidad que le otorga mayores probabilidades de ser considerado un buen candidato en potenciar la susceptibilidad a la resistencia de insulina de origen genético.

La resistencia a la insulina es el primer paso en la patogenia de la Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2). La insulino-resistencia periférica produce, por un mecanismo reflejo, una hipersecreción insulínica con la correspondiente hiperinsulinemia para mantener la normo glucemia durante varios años. Si bien la hiperinsulinemia es un mecanismo fisiológico destinado a controlar y mantener la

normoglucemia antes que claudique la célula  $\beta$  su presencia no es inocua (*Ruiz M. 2004*).

Según datos disponibles, el polimorfismo Arg972 es de dos a tres veces más prevalente en pacientes con DMT2 y resistencia a insulina respecto al grupo control (*Porzio et al., 1999; Yamada et al., 1998; Florez et al., 2007*).

Los resultados obtenidos en el estudio de prevalencia para el polimorfismo Arg972 del gen IRS-1 son congruentes para ambas técnicas de biología moleculares empleadas y probaron nuestra hipótesis. Nuestros resultados indican la existencia de una elevada proporción de individuos portadores del alelo mutante. El 0,62 (86/139) de los pacientes diabéticos pertenecientes al grupo de estudio son portadores del polimorfismo para el gen IRS-1 (Gly/Arg). Mientras que un 0,38 (53/139) de los restantes pacientes presentan el alelo salvaje en su forma homocigota Gly/Gly. Esto es coincidente con muchos de los trabajos publicados para distintas poblaciones, si bien existen diferencias en las frecuencias génicas y genotípicas. (*Yumi et al., 1994; Yamada et al., 1998; Hart et al., 1999; Mori et al., 1995; Federico et al., 2003; Burguete-García et al., 2009*). Estas fluctuaciones en las frecuencias de este SNP puede deberse simplemente a las diferencias en el origen étnico de las poblaciones estudiadas donde las relaciones genotipo-fenotipo serían étnico específicas (*Sweeney et al., 2005*).

En todas las poblaciones analizadas por otros autores existen diferencias en las frecuencias génicas de este SNP. Nuestra población incluso presenta mayor frecuencia del alelo Arg972 que el resto de las poblaciones.

Una particularidad a destacar en los resultados obtenidos en nuestro estudio de prevalencia como sucede en otros trabajos en los cuales se observan muy bajas frecuencias (*Yamada et al., 1998; Marini et al., 2003, Sweeney et al., 2005*) es la ausencia de homocigotas mutantes (Arg/Arg) 0,00 (0/139), dato no menor a la hora de interpretar las condiciones genético poblacionales bajo las cuales se encuentra este polimorfismo. La población diabética analizada en este estudio no se encuentra en equilibrio génico sugiriendo que alguno de los supuestos establecidos para el principio Hardy-Weinberg no se estarían cumpliendo. Esto podría ser explicado por la presencia de una presión evolutiva ya sea a favor del heterocigoto o en contra del homocigoto mutante. Es una realidad que en el

presente estudio no es posible determinar los mecanismos actuantes en el desequilibrio génico pero sería importante realizar un estudio a futuro.

Con el fin de poner en práctica una nueva técnica de análisis molecular de última generación como es RT - PCR se tomó una sub-muestra de la población de estudio. Los resultados obtenidos se ajustan de forma satisfactoria a los perfiles descritos por RFLPs - PCR técnicas sobre la que se basó este estudio de prevalencia.

La implementación de la técnica de RT – PCR en el análisis de polimorfismos genéticos ha demostrado ser de gran utilidad, en particular centrándonos en su capacidad como herramienta de genotipificación de SNPs.

Los resultados obtenidos en el análisis de genotipificación del SNP Arg972 del gen IRS-1 humano mediante la aplicación de RT- PCR fueron corroborados por PCR – RFLPs y presentaron un alto grado de reproducibilidad en distintos ensayo realizados con réplicas. Esto nos sugiere que la técnica de RT – PCR es una nueva herramienta efectiva que disponemos a la hora de realizar un análisis genético molecular para el diagnóstico o genotipificación de SNPs. Con los ajustes adecuados esta técnica de vanguardia nos brinda la apertura de una nueva dimensión en la caracterización genético- molecular rápida, robusta y sencilla.

Los resultados obtenidos por RFLPs - PCR y la secuenciación nucleotídica de las muestras analizadas contribuyen a confirmar los datos observados.

En conclusión, el análisis molecular del gen IRS-1 en pacientes diabéticos de la ciudad de Montevideo, Uruguay ha revelado una elevada presencia de la variante alélica Arg972 del gen IRS-1 lo que explicaría en parte la presencia de insulino-resistencia en estos pacientes. A la luz de los datos obtenidos es posible confirmar que la hipótesis nula planteada en este trabajo es aceptada. La población montevideana caracterizada por presentar BMI > 25 kg/m<sup>2</sup> y RI mostró una elevada prevalencia (0,62 % (86/139)) respecto a la variante alélica Arg972 del gen IRS-1. La presencia de insulino resistencia en el resto de la muestra analizada podría deberse a mutaciones en otro gen que debería ser posteriormente analizada.

## Perspectivas:

Estudios “in vivo” como “in Vitro” han revelado líneas que tienden a una asociación entre la variante alélica Arg972 del gen IRS-1 y la predisposición genética de IR. No se ha identificado un único gen con susceptibilidad mayor para DMT2. La explicación más probable para estos resultados es que la diabetes consiste en varios subtipos de enfermedades dentro de una misma patología y donde la combinación de diferentes mecanismos (incluyendo genéticos y factores medioambientales) actúan sinérgicamente para dañar la secreción de insulina y su acción (*Bruning et al., 1997*).

La naturaleza multifactorial de la diabetes combinada con las múltiples mutaciones descritas en diferentes genes asociados con la vía de señalización de la insulina, las respuestas biológicas de la insulina y la funcionalidad de las células  $\beta$  pancreáticas conducen a una patogenia compleja tanto para su diagnóstico como de diseñar una estrategia terapéutica certera. Un avance importante sin duda abarca estos dos centros clave. Disponer desde un inicio de los perfiles genéticos de los pacientes (*Pearson et al., 2009*), en este caso específico contar con la caracterización molecular de los pacientes portadores de la variante alelica Arg972 del gen IRS-1 (*Sesti et al., 2004*) permitirá determinar el grado de respuesta y tolerancia a drogas hipoglucemiantes (metformina y sulfonilureas) disponibles en el mercado y diseñar de forma individual la estrategia terapéutica óptima.

La caracterización de perfiles genéticos de los genes considerados candidatos para la susceptibilidad de IR, DMT2 y sus complicaciones asociadas tales como bajo peso de recién nacidos, síndrome de ovario poliquístico, enfermedad coronaria y obesidad (*Marini et al., 2003; Ehrmann et al., 2002; Marchetti et al., 2002*) como el gen IRS-1 humano, en particular para el SNP Arg972, abre una nueva perspectiva para mejorar las reapiestas frente a tratamientos farmacológicos. Este tipo de estudio apunta a una visión enfocada a la farmacología del futuro denominada “farmacogenética” que no es más que el estudio de cómo las variaciones genéticas afectan la respuesta a drogas (*Pearson*

*et al.*, 2009). En el contexto específico de la variante alélica Arg972 se disponen de información que hace notar la existencia de respuestas diferenciales frente a drogas hipoglucemiantes empleadas en tratamientos de diabetes en pacientes portadores de esta variante alélica.

Así, la modesta asociación entre el polimorfismo de Arg972 de IRS-1 humano y el riesgo de IR sugiere que esta mutación relativamente común pudiera estar contribuyendo a la patogénesis de la DMT2 en un pequeño subgrupo de casos. Además, es posible que la variante Arg972 de IRS-1 no sea causa suficiente de diabetes, pero actúa recíprocamente con factores medioambientales para dañar la sensibilidad de la insulina (*Bruning et al.*, 1997).

La identificación de los efectos genéticos que estaría aportando esta mutación requieren de un estudio específico el cual no fue adoptado en este trabajo, pero sería de gran relevancia llevarlo a cabo a futuro.

La disposición del perfil genético para genes clave asociados a enfermedades como DM no sólo es de suma importancia para diseñar un tratamiento terapéutico paliativo, sino que marcará la diferencia en la capacidad de diagnóstico preventivo a tiempo real. Esto permitirá abordar el problema en su estado inicial en poblaciones consideradas de riesgo (pre-diabéticos, casos dudosos y diabéticos diagnosticados), antes que surjan complicaciones (*Giaccari et al.*, 2009) relacionadas con la falta de tratamiento o un tratamiento inadecuado. El mejor conocimiento y diagnóstico de esta patología mejorará la calidad de vida de la población afectada y redundará en un adecuado uso de los escasos recursos con que el estado dispone generando un sistema sanitario más efectivo y abocado a la prevención.

## Bibliografía:

Almind K, Bjørbaek C, Vestergaard H, Hansen T, Echwald S, Pedersen O, (1993) Amino acid polymorphisms of insulin receptor substrate-1 in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 342: 828–832.

Almind K, Inoue G, Pedersen O, Kahn CR (1996) A common amino acid polymorphism in insulin receptor substrate-1 causes impaired insulin signaling. Evidence from transfection studies. *J Clin Invest* 97: 2569–2575.

American Diabetes Association (ADA, 2006) Standards of Medical Care in Diabetes-2006, *Diabetes Care* 29: S4-S42.

Armstrong M, Haldane F, Taylor RW, Alberti KGMM, Turnbull DM, Walker M, (1996) Human insulin receptor substrate-1 variant sequences in familial non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet Med* 13: 133–138.

Bruning JC, Winnay J, Bonner-Wier S, Taylor SI, Accili D, Kahn CR, (1997) Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles. *Cell*. 88:561–572.

Burguete-Garciaa AI, Cruz-Lopezb M, Madrid-Marinac V, Lopez-Ridaurac R, Hernández-Ávilac M, Cortinac B, Gómez RE, Velasco-Mondragón E, (2009), Association of Gly972Arg polymorphism of IRS1 gene with type 2 diabetes mellitus in lean participants of a national health survey in Mexico: a candidate gene study. *Metabol Clin Exp* 59: 38–45.

Celi FS, Silver K, Walston J, Knowler WC, Bogardus C, Shuldiner AR. Lack (1995), of IRS-1 codon 513 and 972 polymorphism in Pima Indians. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2827–2879.

Chen D, Van Horn DJ, White MF, Backer J M (1995), Insulin receptor substrate 1 rescues insulin action in CHO cells expressing mutant insulin receptors that lack a juxtamembrane NPXY motif. *Mol. Cell. Biol* 15:4711–4717.

Clausen J, Hansen T, Bjoerbaek C, Echwald S, Urhammer S, Rasmussen S, Andersen C, Hansen L, Almind K, Winther K, Haraldsdottir J, Borch-Johnsen K, Pedersen O.(1995) Insulin resistance: Interactions between obesity and a common variant of the insulin receptor substrate-1. *Lancet* 346: 397–402.

De Fronzo RA, (1997) Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Rev* 5: 177–269.

Ehrmann DA, Tang X, Yoshiuchi I, Cox NJ, Bell GI (2002) Relationship of insulin receptor substrate-1 and -2 genotypes to phenotypic features of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4297–4300.

Federici M, Pertrone A, Porzio O, Bizzarri C, Lauro D, Alfonso R, Patera I, Cappa M, Nistico L, Baroni M, Sesti G, Di Mario U, Lauro R, Buzzetti R, (2003) The Gly9723Arg IRS-1 Variant Is Associated with Type 1 Diabetes in Continental Italy. *Diabetes* 52:887–890.

Fererro R, Garcia V (2005) Encuesta de prevalencia de la diabetes en Uruguay. Primera Fase Montevideo. *Arch Med Int* 27: 1-12.

Florez JC, Sjögren M, Agapakis CM, Burt NP, Almgren P, Lindblad U, Berglund G, Tuomi T, Gaudet D, Daly MJ, Ardlie KG, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop L (2007) Association testing of common variants in the insulin receptor substrate-1 gene (IRS1) with type 2 diabetes. *Diabetologia* 50: 1209-17.

Giacconi A, Sorice G, Muscogiuri G (2009) Glucose toxicity: The leading actor in the pathogenesis and clinical history of type 2 diabetes e mechanisms and potentials for treatment. *Nut Metabol Cardiovasc Diseases* 19: 365 – 377.

Hart LM, Stolk RP, Dekker JM, Niljpes G., Grobbee DE, Heine RJ, Maassen JA (1999), Prevalence of Variants in Candidate Genes for Type 2 Diabetes Mellitus in The Netherlands: The Rotterdam Study and the Hoorn Study, *JCE & M2* 84: 1002- 1006.

Hitman GA, Hawrami K, McCarthy MI, Viswanathan M, Snehalatha C, Ramachandran A, Tuomilehto J, Tuomilehto-Wolf E, Nissinen A, Pedersen O (1995), Insulin receptor substrate-1 gene mutations in NIDDM; implications for the study of polygenic disease. *Diabetologia* 38: 481–486.

Hribal M, Porzio O, Federici M, Lauro D, y Sesti G, (1998) A common amino acid polymorphism at codon 972 in IRS-1 impairs glucose metabolism in L6 muscle cells. *Diabetes* 47(S.1) 247a.

Hribal ML, Tornei F, Pujol A Menghini R, Barcaroli D, Lauro D, Amoruso R, Lauro R, Bosch F, Sesti G, Federici M. (2008) Transgenic mice overexpressing human G972R IRS-1 show impaired insulin action and insulin secretion. *J Cell Mol Med*12: 2096–2106.

Imai Y, Fusco A, Suzuki Y, Lesniak MA, D'Alfonso R, Sesti G, Bertoli A, Lauro R, Accili D, Taylor SI. (1994) Variant sequences of insulin receptor substrate-1 in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 1655–1658.

Jellema A, Zeegers MPA, Feskens EJM, Dagnelie PC, Mensink RP (2003) Gly972Arg variant in the insulin receptor substrate-1 gene and association with Type 2 diabetes: a meta-analysis of 27 studies. *Diabetologia*.46:990–995.

Kulkarni RN, Winnay JN, Daniels M, Bruning JC, Flier SN, Hanahan D, Kahn CR (1999) Altered function of insulin receptor substrate-1-deficient mouse islets and cultured b-cell lines. *J. Clin. Invest*104, R69 – R75

Laakso M, Malkki M, Kekäläinen P, Kuusisto J y Deeb SS,(1994) Insulin receptor substrate-1 in non-insulin- dependent diabetes. *J Clin Invest* 94: 1141–1146.

Lavan BE, Rothenberg P, Kahn R, Backer J, Arakai E, Wilden P, Cahill D, Goldhill B, White M. (1991), Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352: 73–77.

Lavan BE, Lane WS, Lienhard GE, (1997a) The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem* 272: 11439-11443.

Lavan BE, Fantin VR, Chang ET, Lane WS, Keller SR, Lienhard GE, (1997b) A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem* 272: 21403–21407.

Lebovitz HE, (2003). *Resistencia a la insulina*, SP Science Press, Brasil, pp78

Lepretre F, Vionnet N, Budhan S, Dina C, Powell KL, Genin E, Das AK, Nallam V, Passa P, Froguel P, (1998) Genetic studies of polymorphisms in ten non-insulin-dependent diabetes mellitus candidate genes in Tamil Indians from Pondichery. *Diabetes Metab* 24: 244–250.

Marchetti P, Lupi R, Federici M Marselli L, Masini M, Boggi U, Del Guerra S, Patanè G, Piro S, Anello M, Bergamini E, Purrello F, Lauro R, Mosca F (2002) Insulin secretory function is impaired in isolated human islets carrying the Gly972Arg IRS-1 polymorphism. *Diabetes* 51: 1419–1424.

Marini MA, Frontoni S, Mineo D, Bracaglia D, Cardellini M, De Nicolais P, Baroni A, D'Alfonso R, Perna M, Lauro D, Federico M, Gambardella S, Lauro R, Sesti G (2003) The Arg972 variant in

insulin receptor substrate-1 is associated with an atherogenic profile in offspring of type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 3368–3371.

McGettrick AJ, Feener EP, Kahn CR (2005), Human insulin receptor substrate-1 (IRS-1) polymorphism G972R causes IRS-1 to associate with the insulin receptor and inhibit receptor autophosphorylation. *J Biol Chem* 280: 6441–6446.

Mori H, Hashiramoto M, Kishimoto M, Kasuga M, (1995) Aminoacid polymorphism of the insulin receptor substrate-1 in Japanese non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2822–2826.

Morini E, Prudente S, Succurro E, Chandalia M, Zhang Y Y, Mammarella S, Pellegrini P, Powers C, Proto V, Dallapiccola B, Cama A, Sesti S, Abate N, Doria A, Trischitta V, (2009), IRS1 G972R polymorphism and type 2 diabetes: a paradigm for the difficult ascertainment of the contribution to disease susceptibility of 'low frequency–low-risk' variants. *Diabetologia* 52: 1852- 1857.

Muller D, Huang GC, Amiel S, Jones PM y Persaud SJ, (2006) Identification of Insulin Signaling Elements in Human  $\beta$ -Cells - Autocrine Regulation of Insulin Gene Expression. *Diabetes* 55: 2835-2842.

Ogihara T, Isobe T, Ichimura T, Taoka M, Funaki M, Sakoda H, Onishi Y, Inukai K, Anai M, Fukushima Y, Kikuchi M, Yazaki Y, Okay Y, Asano T (1997) 14-3-3 Protein Binds to Insulin Receptor Substrate-1, One of the Binding Sites of Which Is in the Phosphotyrosine Binding Domain. *J Biol Chem* 272: 25267–25274.

Parikh H, Leif Groop, (2004), Candidate Genes for Type 2 Diabetes. *Reviews in Endoc Metabol Dis* 5: 151–176.

Pearson ER, (2009) Pharmacogenetica in diabetes. *Current Diabetes Reports* 9, 172 – 181

Porzio O, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Accili D, Lauro R, Borboni P Sesti G, (1999) The Gly972Arg amino acid polymorphism in IRS-1 impairs insulin secretion in pancreatic  $\beta$  cells. *J Clin Invest* 104: 357–364.

Ruiz M, Etioplogenia de la Diabetes Mellitus, Akadia ed. 2004, cap 5, pp 57.

Sawka-Verhelle D, Tartare-Deckert S, White MF, Van Obberghen E, (1996) Insulin receptor substrate-2 binds to the insulin receptor through its phosphotyrosine-binding domain and through a newly identified domain comprising amino acid 591–786. *J Biol Chem* 271: 5980 –5983.

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

Stumvoll M, Fritsche A, Volk A, Stefan N; Madaus A; Maerker E; Teigeler A; Koch M; Machicao F; Häring H (2001) The Gly972Arg polymorphism in the insulin receptor substrate-1 gene contributes to the variation in insulin secretion in normal glucose-tolerant humans. *Diabetes* 50: 882–885.

Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, y White MF, (1991) Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature (London)* 352: 73-77.

Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Myers, MG, Glasheen E, Lane WS, Pierce JH, y White MF, (1995) Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature (London)* 377: 173–177.

Sweeney C, Murtaugh MA, Baumgartner K, Byers T, Giuliano AR, Herrick JS, Wolff R, Bette JC, Slattery ML, (2005), Insulin-Like Growth Factor Pathway Polymorphisms Associated with Body Size in Hispanic and Non-Hispanic White Women, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 1892-1809.

Ura S, Araki E, Kishikawa H, Shirotani T, Todaka M, Isami M, Shimoda S, Yoshimura R, Matsuda K, Motoyoshi S, Miyamura N, Kahn CR, Shichiri M, (1996) Molecular scanning of the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) gene in Japanese patients with NIDDM: identification of five novel polymorphisms. *Diabetologia* 39:600–608

Valverde AM, Kahn CR, Benito M (1999) Insulin signaling in Insulin Receptor Substrate (IRS)-1-deficient brown adipocytes. *Diabetes* 48: 2122–2131

Wang LM, Myers MG, Jr. Sun X, Aaronson SA, White MF, Pierce JH (1993) IRS-1: essential for insulin and IL-4-stimulated mitogenesis in hematopoietic cells. *Science* 261: 1591–1594.

White M F (1997) The insulin signaling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 40: S2–S17.

Xu GG, Gao Z, Borge PD, y Wolf BA (1999) Insulin receptor substrate 1-induced inhibition of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> uptake in beta-cells. Autocrine regulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis and insulin secretion. *J Biol Chem* 274: 18067–18074.

Yamada K, Yuan X, Ishiyama S, Shoji S, Kohono S, Koyama K-I, Koyanagi A, Koyama W, Nonaka K, (1998) Codon 972 Polymorphism of the Insulin Receptor Substrate-1 Gene in Impaired Glucose Tolerance and Late-Onset NIDDM. *Diabetes Care* 21: 753- 756.

Agradecimientos:

- Dra. Adriana Mimbacas que se encuentra a cargo del Laboratorio del Grupo de Investigación en Genética Humana. Departamento de Genética, División Biología Molecular y Genética del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. IIBCE. Por aceptarme como su pasante y brindarme todas las herramientas necesarias para culminar mi formación de grado.
- A mis compañeros de laboratorio por compartir incansables horas de trabajo.
- A mis Padres por aceptar mi vocación y apoyarme de forma incondicional.

**Protocolo de extracción de ADN de sangre periférica.**

**Técnica adaptada de fenol-cloroformo.**

**Día 1:**

- I. Para una muestra de 10  $\mu$ l de sangre periférica con EDTA como anticoagulante.
- II. Lisado celular: agregar 3V de Buffer de lisis (155 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM de  $\text{KHCO}_3$  con Ph 7.4, 1 mM de EDTA).
- III. Centrifugan durante 10 min a 1000 rpm.
- IV. Eliminar el sobrenadante.
- V. Lavar el pellet con SSC 1X (solución madre de 20X: 175,3 g de NaCl, y 88,2 g de citrato de sodio).
- VI. A)- Resuspensión del pellet: en 5 ml de SE (75 mM de NaCl y 24 mM de EDTA).  
B)- Agregar 100  $\mu$ l de proteinasa K (10 mg/ml) y 500  $\mu$ l de SDS 10%.

**Día 2:**

- VII. Incubar a 50 °C toda la noche en baño con agitación.
- VIII. Agregar 1v de fenol y agitar 15 min.
- IX. Centrifugar a 200 rpm por 5 min.
- X. Extraer el sobrenadante.
- XI. Precipitar el ADN CON 0,3V de Acetato de sodio y 2V de etanol.
- XII. Lavar el ADN con alcohol 70%.
- XIII. Disolver el ADN en 1 ml de TE (10 mM de Tris, 1mM de EDTA).

Anexo II

**Protocolo de PCR a tiempo final para el gen IRS-1.**

Para un volumen final de 25  $\mu$ l.

Materiales para el Master mixs	Concentración final	Concentración inicial	<i>Volumen inicial</i>
<i>Primers</i>	<i>0,2 pmol/<math>\mu</math>l</i>	<i>10 pmol/<math>\mu</math>l</i>	<i>1 <math>\mu</math>l</i>
<i>Buffer KCl</i>	<i>1X</i>	<i>10 X</i>	<i>2.5 <math>\mu</math>l</i>
<i>Buffer MgCl<sub>2</sub></i>	<i>3 mM</i>	<i>50 mM o 25mM</i>	<i>1.5 <math>\mu</math>l o 3 <math>\mu</math>l</i>
<i>dNTPs</i>	<i>0,5 mM</i>	<i>25 mM</i>	<i>0,5 <math>\mu</math>l</i>
<i>Taq polimerasa</i>	<i>1 U/<math>\mu</math>l</i>	<i>5 U/<math>\mu</math>l</i>	<i>0,2 <math>\mu</math>l</i>
<i>ADN</i>	<i>100 ng</i>		<i>1 <math>\mu</math>l</i>
<i>H<sub>2</sub>O mQ</i>	<i>Cantidad necesaria</i>		