



Universidad de la República

Licenciatura en Biología Humana

Orientación Genética

Tesina de Grado

**Estudio del polimorfismo Pro12Ala del gen *PPARG2* y de su relación
con la insulino resistencia en una muestra de pacientes con
Diabetes Mellitus**

Jorge Souto Silva

Departamento de Genética

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Tutora: Dra. Adriana Mimbacas

Tribunal: Dra. Mónica Sans

Dr. Julio Da Luz

Montevideo, Febrero 2014

INDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Generalidades sobre Diabetes Mellitus e importancia del tema	3
1.2. Criterios clínicos diagnósticos	4
1.3. Clasificación de la DM	5
1.4. Patogenia de la DMT2	6
1.4.1. Insulino resistencia vs. disfunción β	6
1.4.2. Mecanismos vinculados a la generación de insulino resistencia	8
1.4.3. Métodos para valorar la resistencia a la insulina	10
1.5. Los genes vinculados a la DMT2	11
1.5.1. Tipos de genes	11
1.5.2. El gen PPARG2	12
1.6. El abordaje poblacional en el estudio genético de la DM	16
2. HIPÓTESIS	18
3. OBJETIVOS	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS	19
4.1. Población estudiada	19
4.2. Extracción de las muestras de ADN	19

4.3. Medida de la concentración de ADN	19
4.4. Elección de los cebadores para la PCR	20
4.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR a tiempo final)	20
4.6. Digestión del producto de PCR	20
4.7. Electroforesis de los fragmentos de ADN	21
4.8. PCR en Tiempo Real-HRM	21
4.9. Análisis mediante secuenciación	21
4.10. Análisis estadísticos	22
5. RESULTADOS	23
5.1. Población estudiada	23
5.2. Genotipificación mediante RFLP	29
5.3. Genotipificación mediante PCR en Tiempo Real	30
5.4. Análisis mediante secuenciación	32
5.5. Equilibrio de Hardy-Weimberg	33
5.6. Cálculo y comparación de frecuencias	33
6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	37
7. PERSPECTIVAS	42
8. BIBLIOGRAFÍA	43
9. ANEXOS	51
AGRADECIMIENTOS	53

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

AGL: ácidos grasos libres

AGNE: ácidos grasos no esterificados

ARNm: ARN mensajero

DM: diabetes mellitus

DMT1: diabetes mellitus tipo 1

DMT2: diabetes mellitus tipo 2

HDL: *high density lipoproteins* (lipoproteínas de alta densidad)

HOMA: *homeostasis model assessment* (evaluación del modelo homeostático)

HRM: *high resolution melting*

IMC/BMI: índice de masa corporal / *body mass index*

IR: insulino resistencia

ITG: intolerancia a la glucosa

LDL: *low density lipoproteins* (lipoproteínas de baja densidad)

pb: pares de bases

PCR: *polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)

pob.: población

PPARG2/PPAR γ 2: gen/proteína del receptor γ 2 activado por el proliferador de peroxisomas

RFLP: polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción

SM: síndrome metabólico

SNP: *single nucleotide polymorphism* (polimorfismo de nucleótido simple)

TG: triglicéridos

TG/HDL: índice Triglicéridos/HDL

Tm: temperatura de desnaturalización del ADN

TZD: tiazolidinedionas

RESUMEN

La Diabetes Mellitus es una de las enfermedades de mayor prevalencia tanto en el Uruguay como a nivel mundial. Dentro de esta patología, el grupo de mayor proporción está representado por la diabetes tipo 2, la cual se caracteriza por tener una base etiopatogénica a predominio de insulino-resistencia (70%) e hiposecreción de insulina (30%). Entre los varios mecanismos que se vinculan a la insulino-resistencia (IR), la obesidad ocupa un papel clave, siendo reconocido a su vez, el papel del gen del receptor $\gamma 2$ activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR $\gamma 2$) en su desarrollo. El polimorfismo Pro12Ala de dicho gen ha sido uno de los más estudiados en varias poblaciones, encontrándose diversas relaciones de asociación con la diabetes tipo 2 y la insulino-resistencia.

En el presente trabajo se estudiaron las frecuencias poblacionales de este polimorfismo en 156 muestras de pacientes diabéticos pertenecientes al Banco de ADN del Departamento de Genética del IIBCE, los cuales fueron divididos en relación a la presencia o ausencia de IR. Se tomó como indicador de insulino-resistencia el índice TG/HDL con valor de corte 3 como predictor. Las muestras fueron genotipificadas mediante la técnica de RFLP, implementándose además la genotipificación mediante PCR en tiempo real y secuenciación. Se calcularon las frecuencias del polimorfismo para cada subpoblación y se analizó si presentaban asociación con la insulino-resistencia. Además se estudió si existía asociación entre la IR y otras variables.

Se hallaron diferencias significativas entre las dos subpoblaciones para el índice de masa corporal, colesterol total, HDL y triglicéridos. Para la población total se hallaron frecuencias génicas de 0.923 y 0.077 para los alelos C y G respectivamente. En cuanto a las frecuencias genotípicas se destacó el hallazgo de diferencias significativas con poblaciones africanas y de otros grupos hispanos y la ausencia de genotipos GG. No se encontraron diferencias significativas para el polimorfismo Pro12Ala entre las dos subpoblaciones analizadas. El estudio a nivel individual de este SNP quizás no demuestre su papel en la insulino-resistencia, por lo cual podría ser necesario su análisis junto a otras variantes genéticas vinculadas a la diabetes además de otros factores.

Este trabajo representa un aporte más para el conocimiento del comportamiento del polimorfismo Pro12Ala en la población uruguaya así como también para la comprensión de la diabetes mellitus, una enfermedad de marcada prevalencia en nuestro país. Además, podría servir como guía a nivel farmacogenético orientando a una selección más apropiada de los pacientes que responderían mejor a la terapia con Tiazolinedionas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades sobre Diabetes Mellitus e importancia del tema

La Diabetes Mellitus (DM) es una compleja enfermedad crónica caracterizada por la alteración en el metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos y proteínas. En la etiopatogenia de dichas alteraciones subyacen como defectos primarios una falla en la producción y/o liberación de la hormona insulina, la aparición de resistencia a nivel periférico a la acción de ésta, o la combinación en distintos grados de ambos mecanismos (Sanghera & Blackett, 2012). La disminución en la acción de la insulina conduce luego a importantes alteraciones tanto bioquímicas como fisiológicas de las cuales la hiperglicemia es la más notoria y vía final común. También los cambios anatomofisiológicos causados por la glucotoxicidad provocan (tanto por efecto directo como por el daño macro y microvascular) la alteración y falla de varios órganos como son el cerebro, el corazón, los vasos sanguíneos, ojos y riñones. Estas complicaciones se destacan dentro del perfil de la enfermedad debido a las repercusiones sobre la calidad de vida que conllevan (Robbins *et al.*, 2010).

En cuanto a la base etiológica es una enfermedad de tipo multifactorial y poligénica que involucra la confluencia de diversos factores ambientales (como son por ejemplo el estilo de vida, tipo de dieta, grado de actividad física, obesidad, tabaquismo, medio uterino) sobre individuos genéticamente predispuestos. La susceptibilidad a este último nivel se encuentra originada a su vez por las variantes de diversos genes que interaccionan ya sea en forma mendeliana, codominante, epistática, aditiva e inclusive con componentes de efecto materno (Taverna, 1997; Sanghera & Blackett, 2012).

La DM es una de las enfermedades de mayor prevalencia tanto en el Uruguay como a nivel mundial, constituyendo una verdadera pandemia. Según la OMS (2011) se estima que de continuar el crecimiento exponencial actualmente observado las cifras en el mundo tenderían a duplicarse de 135 millones a 300 millones en los próximos 25 años. En nuestro país un 8.2% de la población presenta la enfermedad, de los cuales un 20% desconoce que la padece. Se ha estimado también que otro 8% de la población presenta un elevado riesgo de padecerla en el futuro (Ferrero & García, 2005).

Además de su elevada prevalencia, la enfermedad motiva gran atención ya que al ser precursora de otras patologías y afectar a varios tejidos y sistemas genera altas tasas de morbimortalidad. Despierta así el interés no sólo de la población general sino también de distintos profesionales que a nivel multidisciplinario se hayan involucrados en su estudio, prevención, diagnóstico, tratamiento y en la derivación de recursos para tales fines.

1.2. Criterios Clínicos Diagnósticos

Las concentraciones de glucosa en sangre se consideran normales en un rango relativamente acotado, entre 70 y 100 mg/dl según los criterios de la *American Diabetes Association* (ADA, 2011). Se establece el diagnóstico de diabetes al demostrar elevación de la glucosa plasmática a través de cualquiera de los criterios clínicos mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1. Criterios diagnósticos para DM y alteración de la tolerancia a la glucosa utilizando plasma o suero venoso (ADA, 2011).

DIAGNÓSTICO	Glucemia ayunas (mg/dl)	Glucemia PTOG (mg/dl)
Regulación Normal	< 100	< 140
Glucemia de Ayuno Alterada	100-125	-----
Intolerancia a la Glucosa	-----	140-199
Diabetes Mellitus	> 125	> 199

1.3. Clasificación de la DM

Al ser fenotípicamente muy heterogénea, la DM está considerada, más que como una enfermedad *per se*, como un gran síndrome, que abarca múltiples enfermedades a su vez derivadas de la combinación de distintos mecanismos fisiopatológicos (Taverna, 1997).

Si bien todas las formas de DM producen hiperglucemia, los procesos patogénicos implicados varían en gran medida en cada caso. Esto se ve reflejado en los esquemas de clasificación actuales, en los que, en contraposición a sus antecesores basados en la edad de inicio y el tipo de tratamiento, se toma en cuenta también la patogénesis de cada variante. La gran mayoría de los casos de diabetes se enmarcan dentro de una de dos categorías generales:

La **Diabetes Tipo 1** (DMT1), en la cual los individuos presentan una deficiencia absoluta de insulina causada por la destrucción inmunomediada de las células β pancreáticas. Constituye aproximadamente un 5-10% de los casos de diabetes y los individuos en riesgo de padecerla pueden ser muchas veces detectados serológicamente mediante evidencia de actividad inmunológica patológica en los islotes pancreáticos (por ejemplo mediante autoanticuerpos anti-células de los islotes y anti-tirosina fosfatasas IA-2); o por medio de marcadores genéticos, como los de los genes clase II del HLA (regiones DQA y B y región DR, o las repeticiones en tándem en la región promotora del gen de la insulina (ADA, 2011; Noble & Erlich, 2012).

La **Diabetes Tipo 2** (DMT2), es la más prevalente ya que comprende entre el 80 y 90% de los diabéticos. Se debe a la combinación de resistencia a la insulina en los tejidos periféricos y una respuesta secretora inadecuada de esta hormona desde los islotes pancreáticos. En los inicios de esta enfermedad los valores de hiperglicemia alterados (pero no lo suficientemente elevados como para dar síntomas clínicos), son ya capaces de causar cambios patológicos en varios tejidos diana. Aunque se desconoce la etiología específica, no se produce la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas. La mayoría de los pacientes son obesos y la obesidad en sí misma causa diferentes grados de insulino-resistencia. En el caso de los pacientes con normopeso éstos pueden tener un aumento de la grasa corporal distribuida principalmente en la región abdominal (ADA, 2011).

Los restantes casos de diabetes mellitus son ocasionados por desórdenes monogénicos y una amplia variedad de causas secundarias a otras enfermedades (Tabla 2).

Tabla 2. Otros tipos de diabetes y causas secundarias (Guías ALAD, 2013).

Defectos genéticos de la función de la célula beta	Defectos del crom. 20, HNF-4alfa (antes MODY 1), del crom. 7, glucoquinasa (antes MODY 2), del crom. 12, HNF-1alfa (antes MODY 3), del DNA mitocondrial y otros
Defectos genéticos en la acción de la insulina	Resistencia a la insulina tipo A, leprechaunismo, síndrome de Rabson-Mendenhall, diabetes lipoatrófica y otros
Enfermedades del páncreas exocrino	Pancreatitis, trauma del páncreas, pancreatectomía, neoplasia del páncreas, fibrosis quística, hemocromatosis, pancreatopatía fibrocalculosa y otros
Endocrinopatías	Acromegalia, síndrome de Cushing, glucagonoma, feocromocitoma, hipertiroidismo, somatostinoma, aldosteronoma y otros
Inducida por drogas o químicos	Vacor, pentamidina, ácido nicotínico, glucocorticoides, hormonas tiroideas, diazóxido, agonistas betaadrenérgicos, tiazidas, fenitoína, alfa-interferón y otros
Infecciones	Rubéola congénita, citomegalovirus y otros
Formas poco comunes de diabetes mediada inmunológicamente	Síndrome del "hombre rígido" ("stiff-man syndrome"), anticuerpos contra el receptor de la insulina y otros
Otros síndromes genéticos a veces asociados con diabetes	Síndromes de Down, Klinefelter, Turner, Wolfram; ataxia de Friedreich, corea de Huntington, distrofia miotónica, porfiria, síndrome de Prader Willi y otros

En la actualidad, está reconocida la estrecha relación entre la IR y la DMT2, por lo tanto, en la sección siguiente se profundiza sobre su patogenia y en adelante se pondrá énfasis en los aspectos relacionados con este subtipo dentro del amplio espectro de la Diabetes Mellitus.

1.4. Patogenia de la DMT2

1.4.1. Insulino-resistencia vs. disfunción β

Actualmente, tanto el descenso en la capacidad de los tejidos periféricos para responder a la insulina (insulino-resistencia) como el defecto en la secreción de esta hormona por la célula β pancreática, se yerguen indiscutiblemente como los pilares

básicos en la patogenia de la DMT2. Aunque aún es tema de controversia cuál de los dos sería el defecto metabólico primario en algunos subtipos de la enfermedad, es reconocido que en la mayor parte de los casos, la insulino-resistencia es el primer evento objetivable, seguida por grados crecientes de disfunción de las células β . De cualquier forma, en la mayoría de los pacientes con DMT2 la resistencia a la insulina se ha constituido como un hallazgo característico y en los diabéticos obesos como un hecho casi universal (Robbins *et al.*, 2010).

La insulino-resistencia (IR), se define como la resistencia a la acción de la insulina sobre la captación, almacenamiento o metabolismo de la glucosa. Se caracteriza por una desviación de la curva dosis-respuesta, de manera tal que tanto a niveles bajos, medios o elevados de insulinemia, el grado de respuesta biológica a la hormona se halla disminuido. Esta resistencia periférica se manifiesta en una amplia variedad de tejidos; por ejemplo, a nivel del músculo esquelético ocurre una menor capacidad de utilización de glucosa como fuente de energía, en el tejido adiposo se ve afectada la vía de inhibición de la lipólisis y a nivel hepático se ve comprometido el mecanismo de inhibición de la neoglucoénesis hepática (Taverna, 1997; Robbins *et al.*, 2010).

Además de la IR, la disfunción de las células β con el concomitante defecto en la secreción de insulina, representa la otra cara de la misma moneda ya que refleja la incapacidad de estas células para adaptarse al incremento de la secreción de hormona y así satisfacer a largo plazo las demandas creadas por la resistencia a la insulina. Esta disfunción explicaría entre un 30 y 40% de los casos de DMT2 y se ha definido como un inapropiado descenso en el ritmo de secreción de la insulina por las células β . En las fases iniciales de la enfermedad existe un estado de hiperinsulinismo (tanto de ayuno como postprandial) como compensación de la IR, que a menudo puede mantener la glucosa plasmática en valores normales inclusive durante años. Sin embargo, finalmente y por causas aún desconocidas, ocurre un declinar de esta compensación comenzando la progresión hacia el estado de intolerancia a la glucosa (ITG) y posteriormente a una diabetes manifiesta (Taverna, 1997; Robbins *et al.*, 2010).

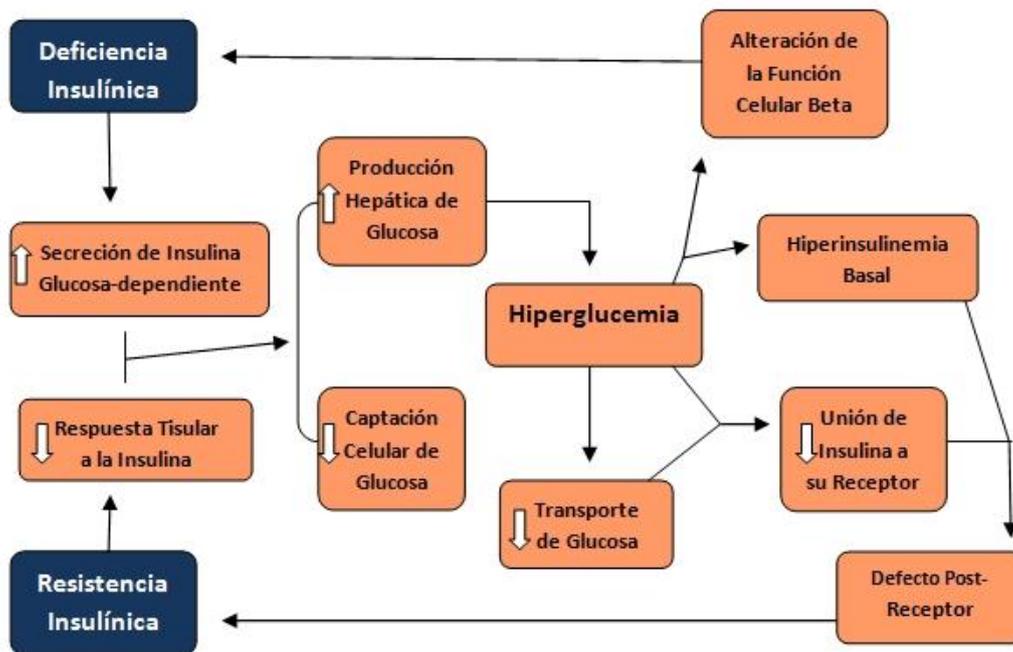


Figura 1. Fisiopatología de la DMT2 (modificado de Taverna, 1997).

Como se ve en la Figura 1 se puede concluir entonces que tanto la IR como el defecto en su secreción contribuyen en la patogénesis de la DMT2, teniendo como vía final común la hiperglucemia sostenida. La cual a su vez, mediante efectos glucotóxicos acentúa los mecanismos primarios que le dieron origen.

1.4.2. Mecanismos vinculados a la generación de insulino-resistencia

Si bien los mecanismos a través de los cuales puede generarse IR son diversos (alteraciones genéticas del receptor de insulina, aumento de secreción de hormonas contrarreguladoras, uso de determinados fármacos, desnutrición fetal, entre otros) (Figura 2), en la gran mayoría de los casos la obesidad aparece como la principal causa de la IR (Lebovitz, 2003; Farreras, 2008; Robbins *et al.*, 2010; Smushkin & Vella, 2010). Esto la convierte además en uno de los principales predictores de DM, ya que a mayor índice de masa corporal (IMC) aumenta el riesgo de padecerla (Eckel *et al.*, 2011). Sin embargo, no debe sólo tomarse en cuenta la cantidad de grasa corporal sino también su distribución. La obesidad de tipo central o visceral (abdominal) está más relacionada

con la IR que su contraparte, la obesidad periférica (glútea y subcutánea) (McLaughlin *et al.*, 2011). Esto se debe a que la regulación y función metabólicas del tejido adiposo en ambos compartimientos son muy diferentes (Oh, 2012). El tejido adiposo central tiene un mayor papel en la esterificación del exceso de ácidos grasos libres (AGL) hacia triglicéridos (TG) para su almacenamiento y en la hidrólisis de estos últimos frente al estrés o el aporte calórico deficiente. Además, libera proteínas como la leptina y la adiponectina vinculadas a la regulación del apetito y del metabolismo intermediario en el músculo esquelético (Lebovitz, 2003). Si bien muchos detalles sobre el “eje adipo-insulínico” se encuentran aún en estudio, se conocen varios factores que explican la aparición de IR a partir del tejido adiposo como son: a) papel de los ácidos grasos libres (AGL) o no esterificados (AGNE), b) desregulación en los niveles circulantes de adiponectinas, c) inflamación, y d) la activación del receptor γ y por el proliferador de peroxisomas (PPAR γ) (Choi & Kim, 2010; Robbins *et al.*, 2010; Saini, 2010; Samuel *et al.*, 2010; Belkina & Denis, 2010; Weijers, 2012). Se detallará sobre este receptor en la sección 1.5.2.



Figura 2. Principales causas y consecuencias de la resistencia a la insulina (Lebovitz, 2003).

Una enfermedad que en este punto debe ser mencionada es el Síndrome Metabólico (SM), o también llamado Síndrome de Resistencia a la Insulina debido a su estrecha relación con la obesidad y la IR. Estas dos últimas participan en la

etiopatogenia del SM como factores predisponentes, pero también pueden aparecer luego como consecuencia de éste (Després *et al.*, 2008). Esto denota la interrelación que existe entre las distintas alteraciones metabólicas que componen el SM. Según criterios de la Asociación Latinoamericana de Diabetes éste se caracteriza por la aparición en forma simultánea o secuencial de diversas anomalías metabólicas e inflamatorias, a nivel molecular, celular y hemodinámico; y se compone de una serie de parámetros clínicos como son la obesidad, la dislipemia, la hipertensión arterial y alteraciones en la regulación de la glucosa (Guías ALAD, 2013). El SM es entonces un conglomerado de factores de riesgo cardiometabólico dentro del cual la obesidad, la IR y la DM representan un componente activo tanto en su etiología como dentro de sus manifestaciones principales.

1.4.3. Métodos para valorar la resistencia a la insulina

Para la medición de la IR existen actualmente varios métodos que proporcionan una estimación de la relación entre la glucosa y la insulina plasmáticas de forma eficaz en pacientes diabéticos (Singh *et al.*, 2010). No obstante, una medición de la sensibilidad a la insulina no está incluida en los criterios diagnósticos más recientes por razones prácticas. De hecho, la “pinza euglicémica”, el método considerado como estándar de oro, sólo puede llevarse a cabo en centros especializados y no es usado de rutina. Incluso los métodos más simples, como la evaluación del modelo homeostático (HOMA) y los varios índices de sensibilidad insulina-glucosa propuestos hasta la fecha presentan limitaciones importantes relacionadas con el costo y su reproducibilidad en diferentes condiciones metabólicas (Anderwald *et al.*, 2007). Por todo ello se ha propuesto un método más fácil y reproducible para evaluar la sensibilidad a la insulina, adecuado para ser utilizado a nivel de la población: la relación entre triglicéridos y lipoproteínas de alta densidad (TG/HDL). Este índice ha sido identificado como un marcador fiable de la resistencia a la insulina en pacientes con sobrepeso. El valor de corte de 3 mg/dl tiene las mejores especificidad y sensibilidad, teniendo el método de la glucosa en plasma en estado estacionario como referencia (McLaughlin *et al.*, 2005; Hannon *et al.*, 2006; Quijada *et al.*, 2008; Marotta *et al.*, 2010). Por lo anteriormente

mencionado en el presente trabajo será tomada esta relación como criterio para la determinación de la IR.

1.5. Los genes vinculados a la DMT2

1.5.1. Tipos de genes

El gran peso del componente genético en la DMT2 ha sido comprobado mediante estudios en gemelos monocigóticos arrojando éstos altas tasas de concordancia (96%). Además, su naturaleza poligénica ha sido determinada mediante diversos análisis de segregación. La heredabilidad se ha estimado en 0.49, siendo el riesgo de padecer la enfermedad de un 40% si se posee un progenitor afectado y del 70% si la poseen ambos padres (Ahlqvist *et al.*, 2011; Sanghera & Blackett, 2012).

Los genes de la DMT2 han sido clasificados en dos grupos teniendo en cuenta su rol en la generación de la enfermedad. Los “**genes diabetogénicos**” son definidos como esenciales y relativamente específicos en la generación de DM ya que sin su alteración ésta no ocurriría; aunque si bien, debido a la naturaleza poligénica de la enfermedad, puedan no ser suficientes para ello. Los “**genes relacionados con la DM**” por el contrario, no son específicos (sus variaciones pueden encontrarse también en personas sin DM), ni suficientes en determinar la aparición de DMT2; pero debido a su papel en la regulación del apetito, del gasto de energía, o la acumulación de grasa intra-abdominal suman su efecto al de las alteraciones en otros genes y las condiciones del ambiente (Gerich, 1998).

A semejanza de su patogenia, estos genes pueden ser agrupados también en dos grandes categorías: 1) **los que afectan la secreción de insulina** y 2) **los que comprometen su acción periférica** (Ahlqvist *et al.*, 2011) (Figura 3).

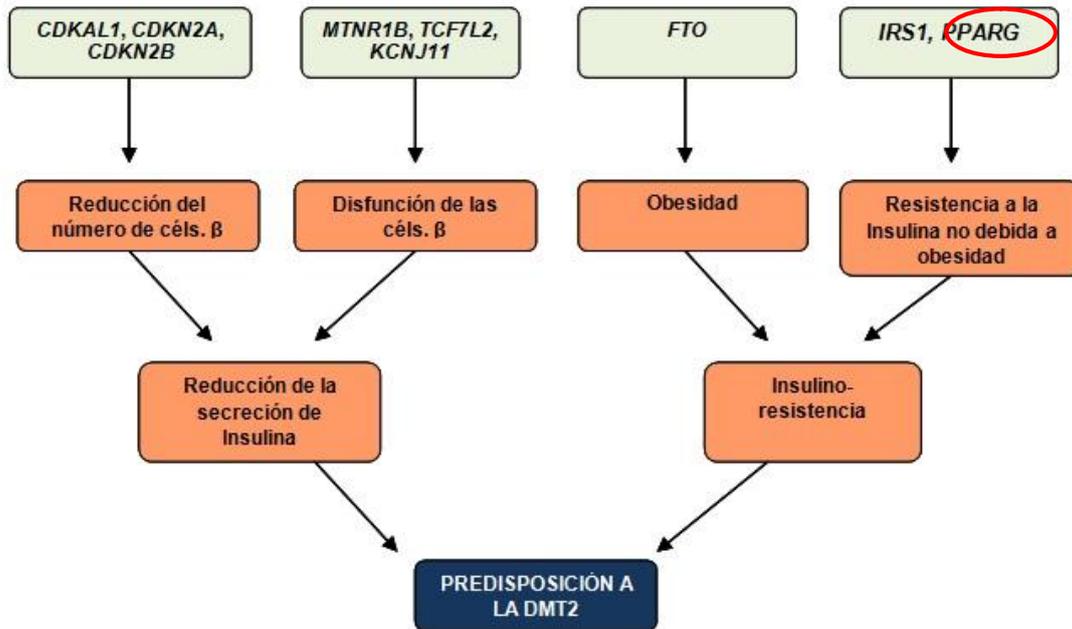


Figura 3. Vías implicadas en la DMT2 (McCarthy, 2010).

1.5.2. El gen *PPARG2*

El gen del receptor γ 2 activado por el proliferador de peroxisomas (*PPARG2*) ha sido uno de los genes más estudiados y mejor caracterizados a través de los años debido a su vinculación con la generación de IR, DMT2 y Síndrome Metabólico. Codifica para un factor de transcripción ligando-inducible perteneciente a la familia de receptores nucleares activados por peroxisomas (PPARs) a su vez comprendidos dentro de la superfamilia de receptores hormonales nucleares. Al activarse las proteínas PPAR, juegan un importante papel en la regulación del desarrollo y la diferenciación celulares, el transporte de ácidos grasos, y en el metabolismo de lípidos, carbohidratos y proteínas; además intervienen en mecanismos de la inflamación y carcinogénesis. Los PPARs deben su nombre a que en los primeros trabajos destinados a su caracterización, se comprobó su capacidad para estimular la proliferación de peroxisomas en los hepatocitos de sapo y ratón (Gurnell *et al.*, 2003; Adeghate *et al.*, 2011). Estos receptores forman heterodímeros con los receptores de retinoide X (RXR) y se unen a regiones específicas (los Elementos de Respuesta a PPAR) en sus genes diana. Comparten características estructurales comunes como son: un dominio N-terminal poco conservado (Dominio A/B), un dominio de unión al ADN altamente

conservado (DBD), y una región C-terminal que contiene el dominio de unión a ligando (LBD). Los efectos biológicos dependerán de las interacciones sobre el LBD entre sus ligandos exógenos o endógenos (AGL, eicosanoides, prostaglandinas, leucotrienos) y sus polipéptidos co-activadores y co-represores (Costa *et al.*, 2010) (Figura 4).

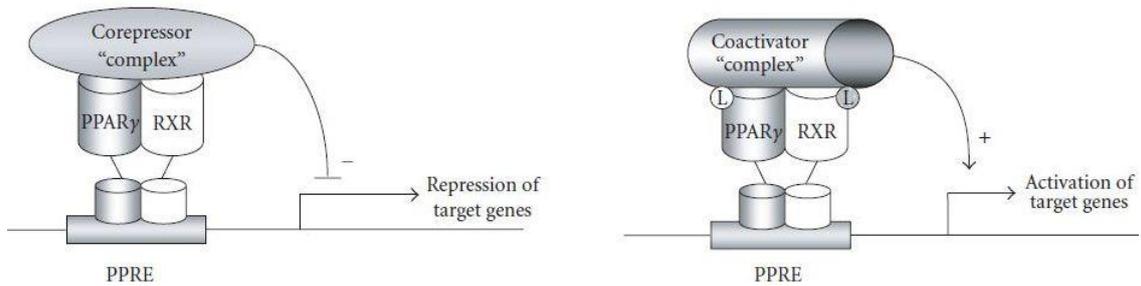


Figura 4. Función del PPAR γ en ausencia y presencia de ligando (Gurnell, 2007).

La familia PPAR consta de tres isotipos diferentes llamados α (o NR1C1), β/δ (o NR1C2) y γ (o NR1C3). Son codificados por tres genes separados ubicados en los cromosomas 22q12-q13.1, 6p21.2-p21.1, y 3p25.2, respectivamente, y expresados de manera tejido-específica. El PPAR α se observa en hígado, riñón, músculo esquelético y adipocitos. Además de su rol en la regulación del crecimiento y metabolismo celulares su importancia se debe a que es la diana de los Fibratos, fármacos ampliamente usados en el control de la hipertrigliceridemia. El PPAR β/δ se expresa en cerebro, tejido adiposo y piel. En los últimos años ha centrado la atención su capacidad de promover el uso de lípidos en lugar de glucosa como fuente de energía (Adeghate *et al.*, 2011).

El PPAR γ se encuentra mayormente en adipocitos, riñón, macrófagos y mucosa intestinal, entre otros tejidos. Su gen comprende 9 exones y abarca más de 150 Kb. Debido al *splicing* alternativo de su ARNm puede producir dos isoformas (Figura 5). El PPAR γ 1, es ampliamente expresado en varios tejidos y se forma por la unión de los exones 1 a 6, A1 y A2; mientras que el PPAR γ 2 se halla sobre todo en adipocitos e intestino delgado, y consta de los exones 1 a 6 y B (Gouda *et al.*, 2010). Se han descrito otras variantes de *splicing* con función incierta o de tipo dominante negativo (ya que estas son incapaces de transactivar a sus genes diana) (Costa *et al.*, 2010).

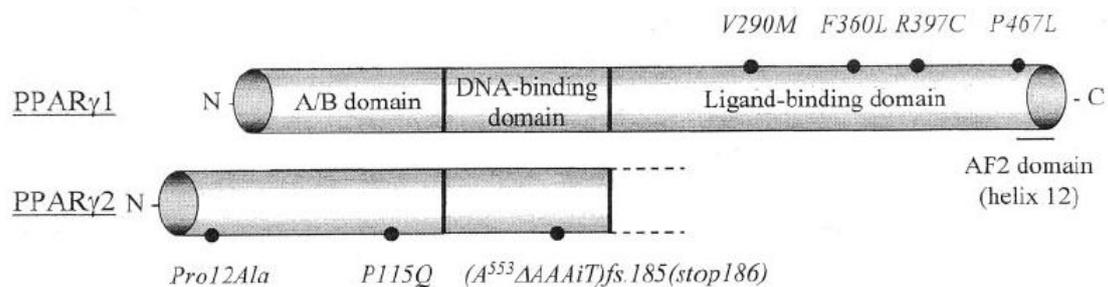


Figura 5. Estructura del *PPARG* y algunos de sus polimorfismos (Gurnell *et al.*, 2003).

La proteína PPAR γ cumple varias funciones en distintos órganos y tejidos. Se ha demostrado su rol clave en la diferenciación de los adipocitos y la promoción de la acumulación de lípidos en el tejido adiposo. Además, es importante en el mantenimiento de la viabilidad y función normal de las células adiposas. En los macrófagos, ha demostrado estar vinculada en la formación de células espumosas, la aterogénesis y la supresión de la formación de citocinas inflamatorias. Tiene un papel fundamental en la regulación del metabolismo de glúcidos y lípidos en hígado, músculo esquelético y tejido adiposo, afectando así sus niveles plasmáticos. Cumple funciones también en el mantenimiento de la homeostasis en el tejido óseo, la concentración de orina por el riñón, la generación de hipertensión arterial y la hipertrofia miocárdica. Al estar tan involucrado en el metabolismo glucídico y lipídico, constituye uno de los factores principales en determinar la sensibilidad o resistencia a la insulina a través la obesidad, la producción de adipocinas y la regulación de los niveles de glucosa en plasma como se mencionó con anterioridad. Este receptor además, es la diana de las Tiazolidinedionas (TZD), fármacos usados como insulino-sensibilizantes en el tratamiento de la DM (Gurnell *et al.*, 2003; He, 2009).

Se ha investigado el rol en la IR de muchas de las variantes en el *PPARG2*, siendo el polimorfismo Pro12Ala (rs1801282) el más examinado en estudios epidemiológicos. Este implica una mutación de cambio de sentido en la que la sustitución de C por G en el codón 12 del exón B determina el cambio de una prolina por alanina en la proteína. En diversos trabajos la variante Ala12 se ha correlacionado con una menor adiposidad e IMC, mejor respuesta a las TZD, así como una menor predisposición al desarrollo de IR, DMT2 y SM. Esto se debería a que esta mutación produce una proteína con menor

capacidad de unión al ADN y de transactivación en el dominio AF1 (*activation function 1*) de su región N-terminal (Semple *et al.*, 2006; He, 2009). La disminución en la actividad de la variante Ala12 tendría efectos favorables en la homeostasis de la glucosa al modular la función del PPAR γ 2, uno de los genes más asociados al “genotipo de la economía” (*Thrifty Genotype*). Brevemente, los genes involucrados en el genotipo de la economía son aquellos que permiten un mejor y mayor almacenamiento energético, que en épocas ancestrales de escasez de alimentos significaban una ventaja para la supervivencia. Sin embargo, en la actualidad, al disponerse de mayor cantidad de alimentos y reducirse el gasto de energía, predisponen al desarrollo de obesidad, IR y DMT2 (Taverna, 1997).

Los múltiples estudios poblacionales realizados hasta la fecha han arrojado resultados contradictorios en cuanto a la asociación entre el polimorfismo Pro12Ala y la obesidad, la IR, y la DMT2. Por ejemplo, estudios en italianos, españoles, daneses, franceses, rusos y chinos de Hong Kong han correlacionado positivamente al alelo Ala12 con una mayor sensibilidad a la insulina y/o menor predisposición a la DMT2 (González Sánchez *et al.*, 2002; Frederiksen *et al.*, 2002; Buzzetti *et al.*, 2004; Ghousaini *et al.*, 2005; Chistiakov *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2012). Por el contrario, trabajos en poblaciones de Argentina, Qatar, China y el sudeste asiático no han podido demostrar estas asociaciones o inclusive han informado una relación opuesta (Radha *et al.*, 2006; Badii *et al.*, 2008; Tellechea *et al.*, 2009; Tong *et al.*, 2012). Su asociación con la obesidad y el IMC ha producido resultados aun más discordantes en los trabajos anteriormente citados. Las causas de estas discrepancias se atribuyen en parte a la naturaleza multifactorial y poligénica de los fenotipos estudiados así como también a las diferencias étnicas entre las distintas poblaciones (He, 2009).

Se estima que la frecuencia del alelo Ala12 es de entre 1.7 y 21.6% en personas sanas (Gouda *et al.*, 2010); siendo la media para caucásicos de un 12%, para mexicanos americanos del 10%, samoanos del 8%, africanos americanos del 3% y chinos del 1% (He, 2009). Dentro de la población diabética se estima que estas frecuencias son menores (Semple *et al.*, 2006). En la región, un estudio en brasileños de Porto Alegre mostró una prevalencia del 14% del genotipo Pro/Ala y 1.5% del Ala/Ala, con una frecuencia de 0.09 para el alelo Ala12 (Mattevi *et al.*, 2007); mientras que en un trabajo realizado con 572 argentinos de sexo masculino con y sin SM, se encontró un

14.9% del genotipo Pro/Ala y no se halló el genotipo Ala/Ala (Tellechea *et al.*, 2009). En nuestro país el único trabajo publicado hasta la fecha refiere un 21.4% de portadores del alelo Ala12 en una población de 54 pacientes de ambos sexos expuestos crónicamente a un alto consumo de grasas saturadas y trans (Pisabarro *et al.*, 2004). Es importante entonces la realización de estudios en el Uruguay para investigación del papel del polimorfismo Pro12Ala en la IR, DMT2 y el SM. Esto ayudaría a una mayor caracterización de estas alteraciones en la población uruguaya y podría llegar a servir en un futuro no sólo para su diagnóstico sino también para su tratamiento.

1.6. El abordaje poblacional en el estudio genético de la DM

La DM representa un claro ejemplo de cómo los factores ambientales y genéticos confluyen en un fenotipo dado. En este caso los primeros potenciarían la expresión de los últimos. Sin embargo, algunos factores adquiridos como la obesidad se hayan a su vez determinados por el componente genético, el cual explica aproximadamente un 60% de su base etiológica y en la que son compartidos varios genes de susceptibilidad con la resistencia a la insulina y la DMT2. Ante este panorama, puede comprenderse porqué la enfermedad se ha catalogado dentro del grupo de las “Enfermedades Complejas” para su estudio genético.

La Genética de Poblaciones a través del análisis de las frecuencias alélicas características de cada población, sus cambios, y las fuerzas que actúan para ello, proporciona una importante vía de aproximación al estudio de esta enfermedad compleja. En muchas poblaciones de diferente origen étnico ya se han podido demostrar variaciones alélicas (polimorfismos) en distintos genes (o en sus proximidades) asociadas a la DM (Elbein, 2009; Whincup *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012; Sanghera & Blakett, 2012). Como ejemplos dentro de los tipos de polimorfismos encontrados se pueden citar los minisatélites, los microsátélites, los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP en inglés) y los polimorfismos de nucleótido simple (SNP en inglés).

Estudios epidemiológicos en la población norteamericana han determinado que el riesgo de padecer DMT2 es de dos a cinco veces mayor en los afroamericanos,

hispanos y comunidades nativas americanas en comparación con los blancos no hispanos (Egede & Dagogo-Jack, 2005). De esta manera, el origen étnico y la combinación de determinadas variantes genéticas se han postulado como factores de riesgo para la aparición de la enfermedad en dicha población. Sin embargo, estas afirmaciones no pueden ser simplemente extrapoladas desde estos trabajos a la población uruguaya. Esto se debe a que esta última se halla mestizada, con un origen trihíbrido (aportes europeo, africano e indígena), y presenta un alto índice de mixogenación sin la presencia de grupos aislados (Bonilla *et al.*, 2004; Gascue *et al.*, 2005; Hidalgo *et al.*, 2005). Estas características que la hacen particular e individualizable de otros grupos, explican porqué no es recomendable realizar generalizaciones a partir de otras poblaciones y la necesidad de conocer entre otros aspectos, las frecuencias génicas y genotípicas locales, ayudando esto a un mayor entendimiento de la enfermedad en nuestro país.

2. HIPÓTESIS

H1: En la población estudiada los pacientes diabéticos que no presentan insulino-resistencia poseen una mayor frecuencia del alelo Ala12 del *PPARG2*.

H0: La frecuencia del alelo Ala12 es la misma en las poblaciones de pacientes diabéticos con y sin presencia de insulino-resistencia.

3. OBJETIVOS

General:

Aportar conocimiento acerca del polimorfismo Pro12Ala del gen *PPARG2* y sobre su relación con la insulino-resistencia en una población uruguaya con Diabetes Mellitus.

Específicos:

- Profundizar en el conocimiento y uso de técnicas de laboratorio comunes como son la extracción de ADN, la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la electroforesis en geles.
- Realizar la genotipificación para el polimorfismo Pro12Ala en una muestra de pacientes con Diabetes Mellitus del Banco de ADN del Departamento de Genética del IIBCE, Montevideo, Uruguay.
- Calcular y analizar las frecuencias génicas y genotípicas de este polimorfismo en los pacientes con y sin insulino-resistencia dentro de esta población.
- Implementar la técnica de PCR en Tiempo Real en la genotipificación de dicho polimorfismo.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Población estudiada

Se analizaron 156 muestras de ADN pertenecientes al banco genómico del Laboratorio de Genética Humana del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) de pacientes con diagnóstico de Diabetes Mellitus. Todos los pacientes manifestaron por escrito su consentimiento informado para la extracción y posterior uso de las muestras de ADN con fines de investigación científica y cuyo protocolo fue aceptado por el MSP y el Comité de Ética del IIBCE. Se seleccionaron a su vez aquellos pacientes en los cuales se contara con la historia clínica completa.

Se trabajó también con la muestra de un individuo del banco genómico que no fue incluido en el análisis estadístico debido a que no poseía diagnóstico de DM, pero por haber sido la única muestra encontrada con genotipo Ala/Ala, se utilizó como control positivo de homocigosis en las técnicas de PCR en tiempo real y PCR-RFLP.

Para el análisis comparativo, la población fue dividida en dos subpoblaciones teniendo en cuenta la presencia o ausencia de IR según la relación TG/HDL. Valores iguales o mayores a 3 mg/dl determinan el estado de insulino-resistencia, mientras que cifras inferiores predicen su ausencia (McLaughlin *et al.*, 2005).

4.2. Extracción de las muestras de ADN

A partir de sangre venosa periférica (y con EDTA como anticoagulante) se extrajo ADN genómico mediante el método del Fenol-Cloroformo (véase protocolo en el Anexo 1).

4.3. Medida de la concentración de ADN

Para medir la concentración ADN se usó el espectrofotómetro UV/Vis NanoDrop 1000 el cual posee un rango de cuantificación de entre 2 y 3700 ng/μl para ADN de doble cadena. Además, con este equipo se pudo obtener también una medida de la pureza y calidad del ADN mediante las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230.

4.4. Elección de los cebadores para la PCR

Los cebadores fueron tomados del artículo de Oh y colaboradores (2000) que amplifican una secuencia de 270 pb que contiene al SNP de interés, siendo el *primer* directo 5'-GCCAATTCAAGCCCAGTC-3' y el *primer* reverso 5'-GATATGTTTGCA-GACAGTGTATCAGTGAAGGAATCGCTTTCCG-3'.

El *primer* reverso contiene un cambio de base en el extremo 5' *downstream* del sitio de sustitución Pro12 (CCA) Ala (GCA) a los efectos de generar un "mismatch" que adicione un sitio de corte para la enzima de restricción BstU1 en los productos de PCR.

4.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR a tiempo final)

Para la PCR se usó un termociclador Biometra siendo las condiciones de ciclado las siguientes: una desnaturalización inicial a 95°C por 5 min., seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 min, *annealing* a 56°C por 1 min., y extensión a 72°C por 1 min., con una extensión final a 72°C por 10 min. (Oh *et al.* 2000). La reacción de PCR fue preparada en un volumen final de 25 µl. Las características del *master mix* se detallan en el Anexo 2.

4.6. Digestión del producto de PCR

El producto de 270 pb fue digerido con la endonucleasa de restricción BstU-I (New England Biolabs) según los detalles del fabricante; ésta digiere secuencias palindrómicas de tipo CG-CG. Cuando está presente el alelo Ala12 se produce el cambio de C por G en la secuencia generándose un sitio de corte para esta enzima. Esta técnica es llamada Polimorfismos de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) y como se comentó previamente es ampliamente usada para el análisis de variantes génicas. Luego de la digestión los productos esperados son: un fragmento de 270 pb para homocigotas Pro/Pro, fragmentos de 227 y 43 pb para homocigotas Ala/Ala; y fragmentos de 270, 227 y 43 pb para heterocigotas Pro/Ala.

4.7. Electroforesis de los fragmentos de ADN

Tanto los productos de PCR como los de digestión fueron corridos en geles de agarosa al 2.5% teñidos con Bromuro de Etidio [5µl/ml] en buffer TBE 1X (Tris-ác. bórico-EDTA). Para su visualización se usó un transiluminador UV acoplado a una cámara digital.

4.8. PCR en Tiempo Real-HRM

Se decidió usar también esta técnica para la genotipificación del polimorfismo Pro12Ala ya que ésta es una alternativa rápida, sencilla y de relativo bajo costo, siendo además el método HRM (*High Resolution Melting*) muy sensible y específico en la detección de alelos.

Para la puesta a punto se tomaron 40 muestras de la población analizada mediante PCR-RFLP las que se realizaron por duplicado para valorar la confiabilidad de la técnica y ajustar las concentraciones del molde de ADN.

Inicialmente se utilizó el kit comercial Type-itHRM de QIAGEN para la amplificación por PCR. Se realizaron los ajustes necesarios del ciclado y las condiciones del *master mix* se siguieron de acuerdo al protocolo del kit. Se trabajó en un volumen total de 25 µl. Posteriormente se cambió el método anterior por el uso del fluoróforo SYTO[®]9 de Invitrogen. Éste permite el uso de los reactivos y condiciones del método de PCR-RFLP lo cual disminuye los costos y simplifica la técnica. Todas las muestras fueron amplificadas y analizadas en el Rotor Gene 6000 QIAGEN.

4.9. Análisis mediante secuenciación

A los efectos de confirmar que se estaba amplificando el fragmento correcto y que los genotipos encontrados eran los correspondientes se secuenciaron 5 de las muestras amplificadas seleccionadas al azar. El alineamiento de estas secuencias se realizó utilizando el programa Mega versión 5.0.

4.10. Análisis estadísticos

Para estudiar si la población problema se encontraba en Equilibrio de Hardy-Weimberg se usó el software Court Lab-HW Calculator (M. Court 2005-2008). Para el cálculo de las frecuencias génicas y genotípicas así como su posterior análisis y el de las demás variables de estudio se usó el programa SPSS v.10.0 (SPSS Inc. Chicago). Se analizó la distribución normal de las variables utilizando para su comparación métodos paramétricos (t-Student) o no paramétricos (Mann-Whitney). Para las variables cualitativas se utilizaron tablas de contingencia de 2 x 2.

5. RESULTADOS

5.1. Población estudiada

Se analizaron 156 muestras de pacientes diabéticos del banco de ADN del Laboratorio de Genética Humana del IIBCE. De ellos 73 eran de sexo masculino y 83 de sexo femenino. Todos los pacientes contaban con un diagnóstico certero de diabetes e historia clínica completa.

Al realizar la separación de la población analizada en cuanto a la variable establecida (índice TG/HDL) la misma quedó dividida en 81 individuos con IR y 75 individuos sin IR (Figura 6). La edad y características metabólicas de las subpoblaciones analizadas se listan en la Tabla 3.

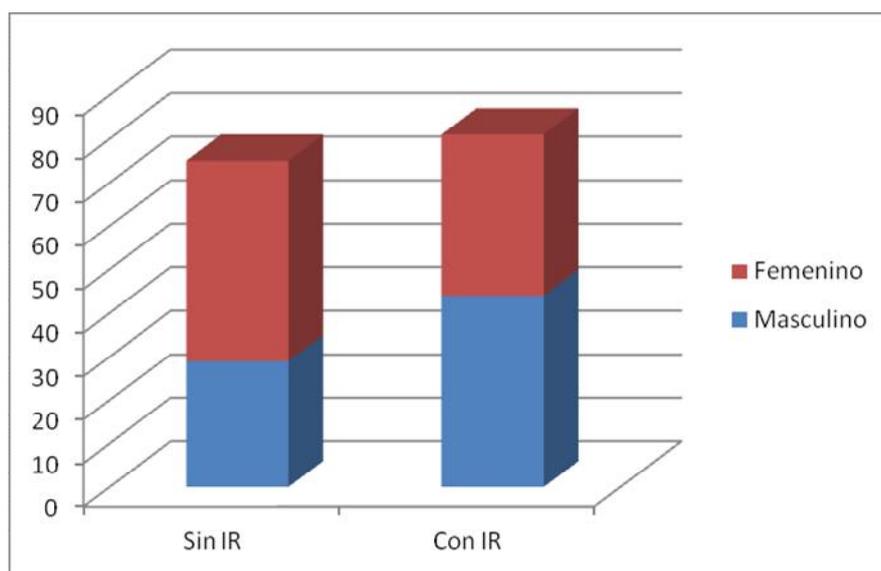


Figura 6. Distribución por sexo en ambos grupos analizados. IR: Insulino-resistencia.

Tabla 3. Características clínicas de las subpoblaciones de estudio.

Variable	Población con IR X± DS	Población sin IR X± DS	p
Edad (años)	63.60 ± 1.28	58.38 ± 2.03	NS
IMC (kg/m ²)	30.77 ± 5.53	27.51 ± 6.15	0.00
Colesterol total (mg/dl)	212.99 ± 5.24	187.59 ± 5.73	0.00
HDL (mg/dl)	45.20 ± 1.05	59.06 ± 2.04	0.00
LDL (mg/dl)	126.87± 8.03	108.92 ± 4.40	NS
Triglicéridos (mg/dl)	235.05 ± 8.89	101.65 ± 4.54	0.00
TG/HDL	5.41 ± 0.25	1.80 ± 8.47 x 10 ⁻²	0.00

NS: no significativo.

Se realizó la comparación de las distintas variables paraclínicas cuantitativas observándose diferencias significativas ($p < 0.001$) en todas ellas excepto para la edad y el LDL (Tabla 3). En las Figuras 7 a 11 se grafican las medidas descriptivas de estas variables y la comparación del error estándar de las dos subpoblaciones.

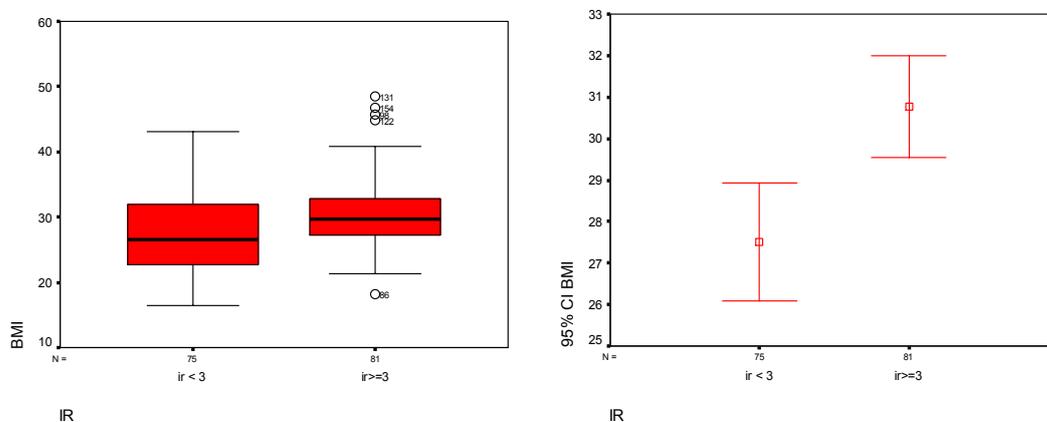


Figura 7. Media, desvío y error estándar para el índice de masa corporal (BMI) en ambas muestras. Se puede observar cómo la población con IR tiene un rango de distribución menor y cómo los intervalos de confianza para las medias de ambas subpoblaciones son diferentes.

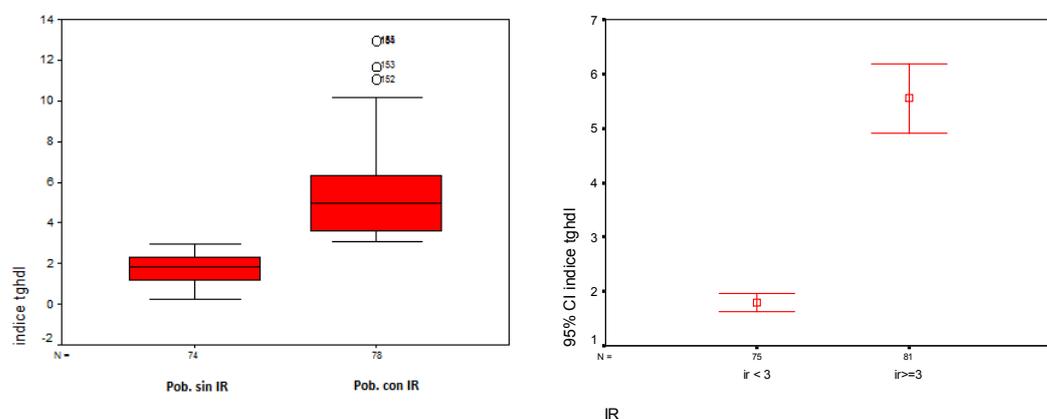


Figura 8. Media, desvío y error estándar para el índice TG/HDL en ambas muestras. Se destaca la mayor uniformidad en la población sin IR mientras que la población con IR presenta una distribución asimétrica con mayor dispersión hacia el cuartil superior.

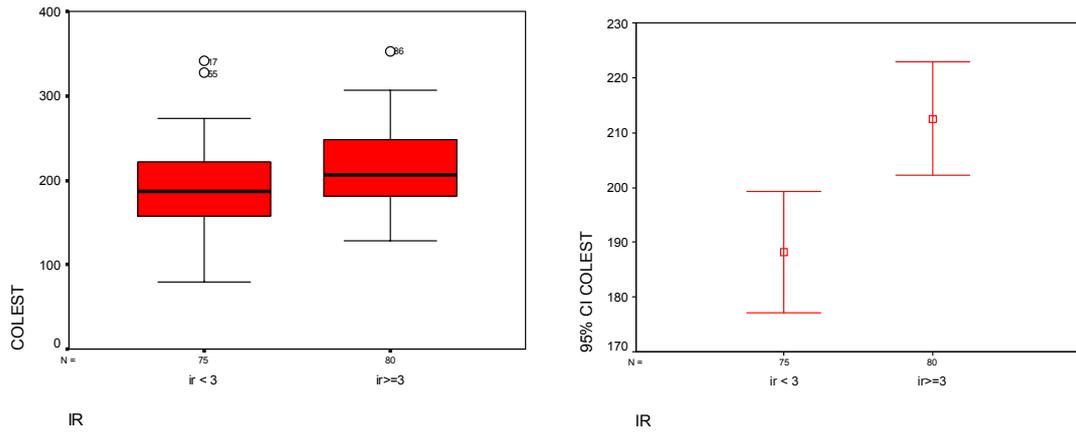


Figura 9. Media, desvío y error estándar para los niveles de colesterol total en ambas muestras. Se destaca la diferencia en los intervalos de confianza para la media de las dos subpoblaciones.

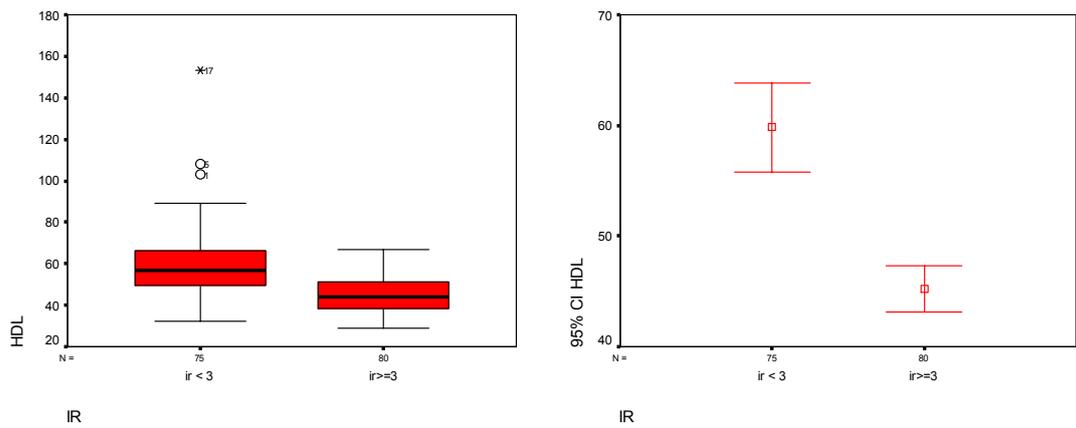


Figura 10. Media, desvío y error estándar para los niveles de HDL en ambas muestras. Se observa como la población con IR presenta menores niveles de HDL y medias significativamente diferentes.

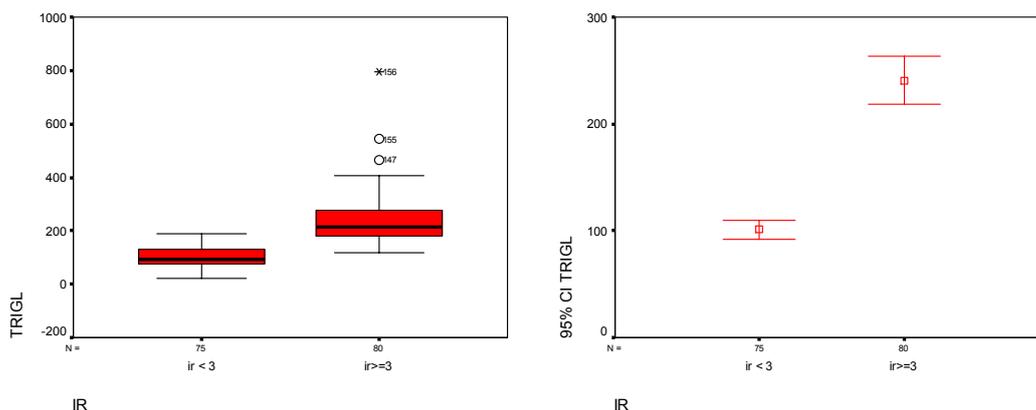


Figura 11. Media, desvío y error estándar para valores de triglicéridos en ambas muestras. La población con IR presenta mayores valores de triglicéridos y medias significativamente diferentes.

Al encontrarse diferencia estadística en la media del IMC se procedió al análisis en base a las categorías definidas por la OMS (<http://apps.who.int/bmi/index>) donde también se observaron diferencias significativas ($p < 0.001$) presentando los pacientes con IR mayor sobrepeso u obesidad (Figura 12).

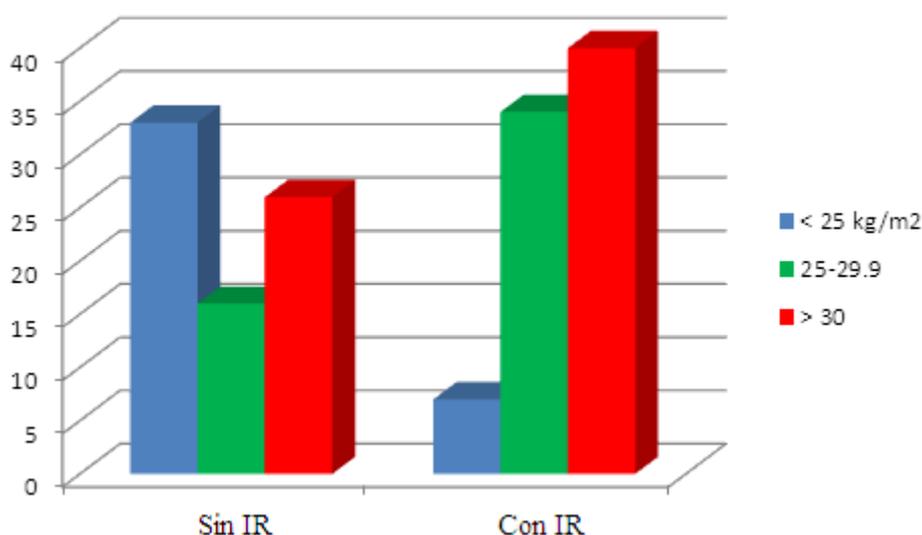


Figura 12. Distribución de los rangos del IMC entre las dos subpoblaciones de estudio.

En relación al perfil lipídico se analizaron las muestras en forma categórica (normal, deseable y anormal) en base al Segundo Consenso Uruguayo sobre Dislipemias (1998) donde se encontraron diferencias muy marcadas observándose la mayor de ellas a nivel de los triglicéridos, donde todos los pacientes sin IR tienen perfiles normales (Figuras 13-16):

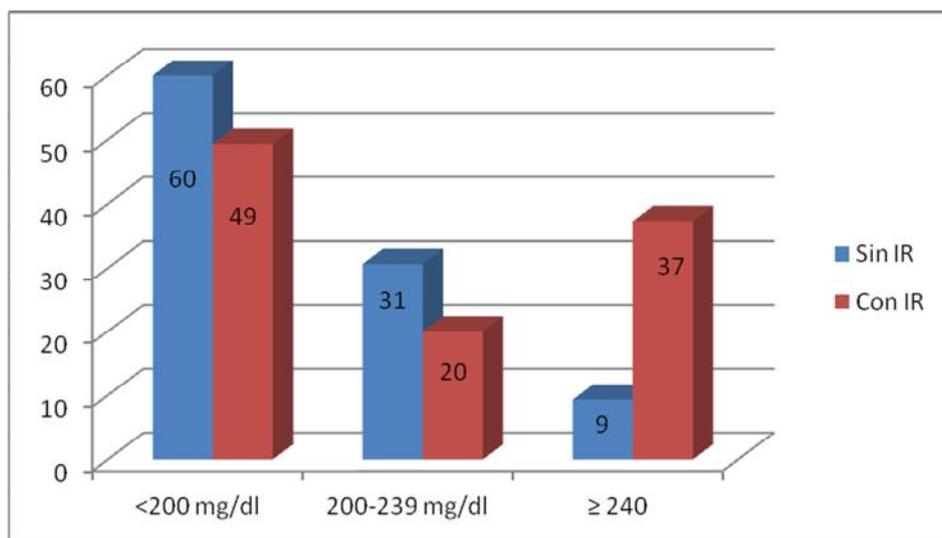


Figura 13. Valores de colesterol total expresados en porcentaje en ambas poblaciones ($p < 0.001$).

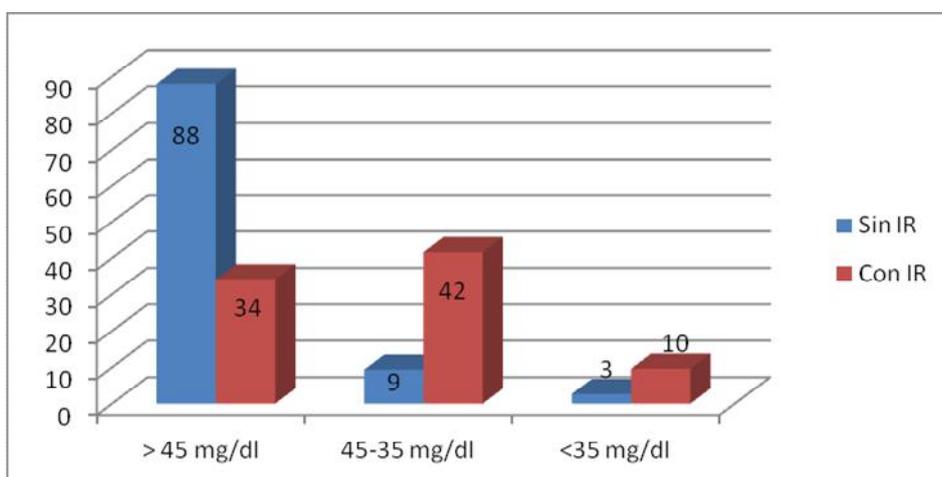


Figura 14. Valores de HDL expresados en porcentaje en ambas poblaciones ($p < 0.001$).

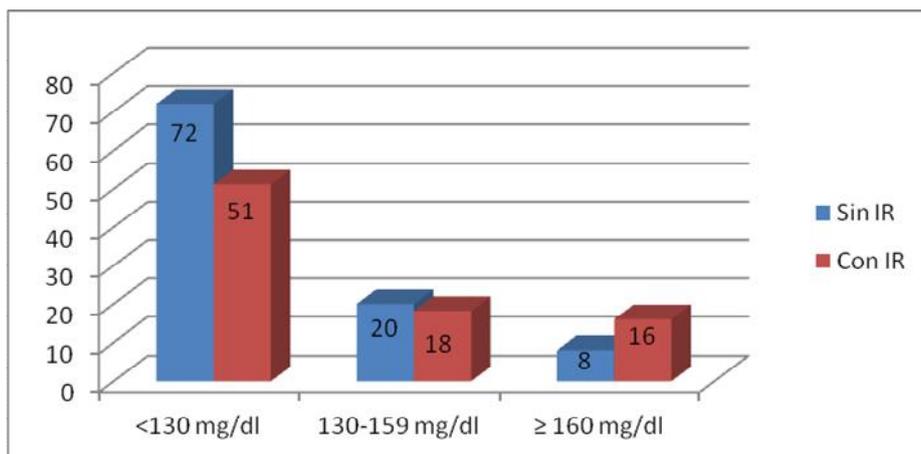


Figura 15. Valores de LDL colesterol expresados en porcentaje en ambas poblaciones (diferencias no significativas).

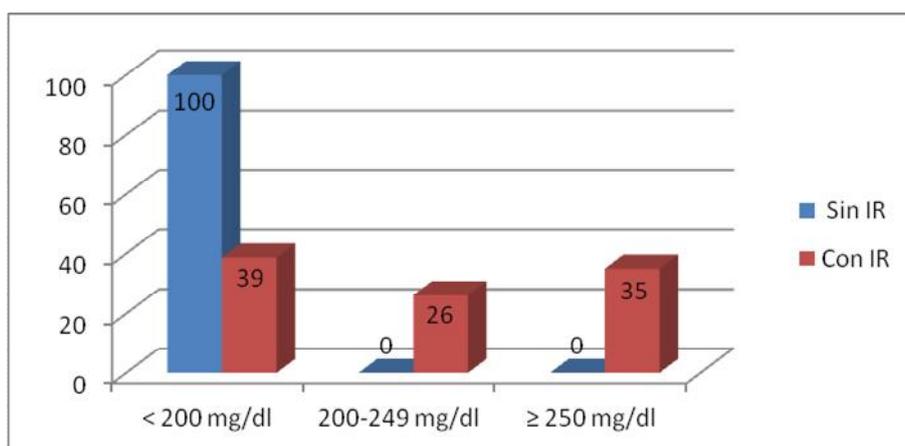


Figura 16. Valores de triglicéridos expresados en porcentaje en ambas poblaciones ($p < 0.001$).

5.2. Genotipificación mediante RFLP

Mediante la amplificación por PCR a tiempo final, posterior digestión con BstU-I y electroforesis en gel de agarosa se obtuvo la genotipificación del polimorfismo resultando: el homocigota CC (alelo Pro) en un fragmento de 270 pb ya que no se encuentra el sitio de restricción; el homocigota GG donde está presente el alelo Ala, en dos fragmentos de 227 y 43 pb respectivamente evidenciando la existencia del cambio de C a G en el sitio rs1801282 a nivel genómico, y el heterocigota donde se observan las 3 bandas (270, 227, 43 pb) (Figura 17):

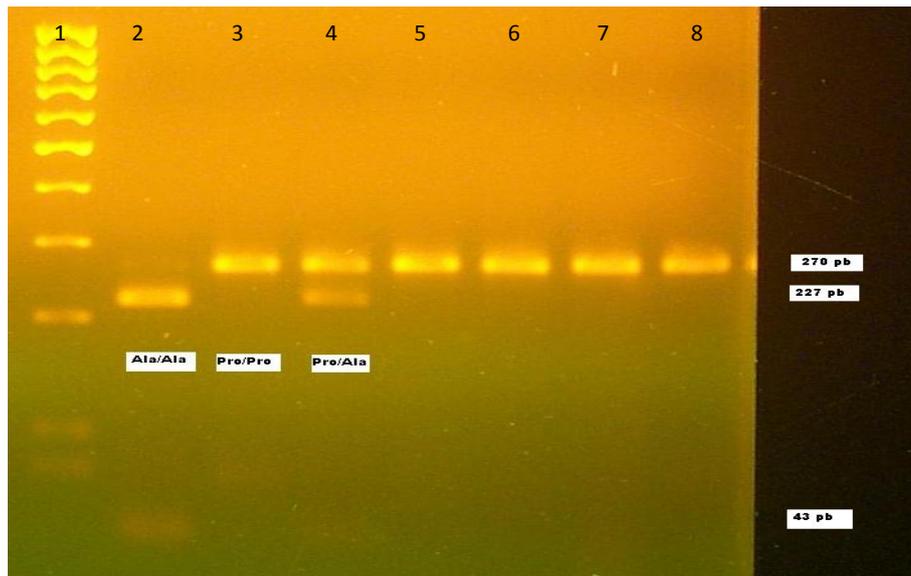


Figura 17. Electroforesis de las digestiones con BstU-I: carril 1- marcador de peso molecular (100 pb), carril 2-genotipo Ala/Ala (227 y 43 pb), carril 3-genotipo Pro/Pro (270 pb), carril 4-genotipo Pro/Ala (270, 227 y 43 pb), carriles 5-8 -genotipos Pro/Pro.

Dentro de la población de pacientes analizada no se encontró ningún individuo homocigota Ala/Ala por lo cual se analizaron muestras de individuos sin DM hasta encontrar un homocigota para usarlo como control positivo de este genotipo.

5.3. Genotipificación mediante PCR en Tiempo Real

Las amplificaciones en tiempo real mostraron idénticos patrones de curvas tanto con el uso del kit Type-itHRM como con el del fluoróforo SYTO[®]9. Tanto en las curvas de desnaturalización (Figura 18) como en las de fluorescencia normalizada (Figura 19) fue posible diferenciar a los individuos homocigotas de los heterocigotas.

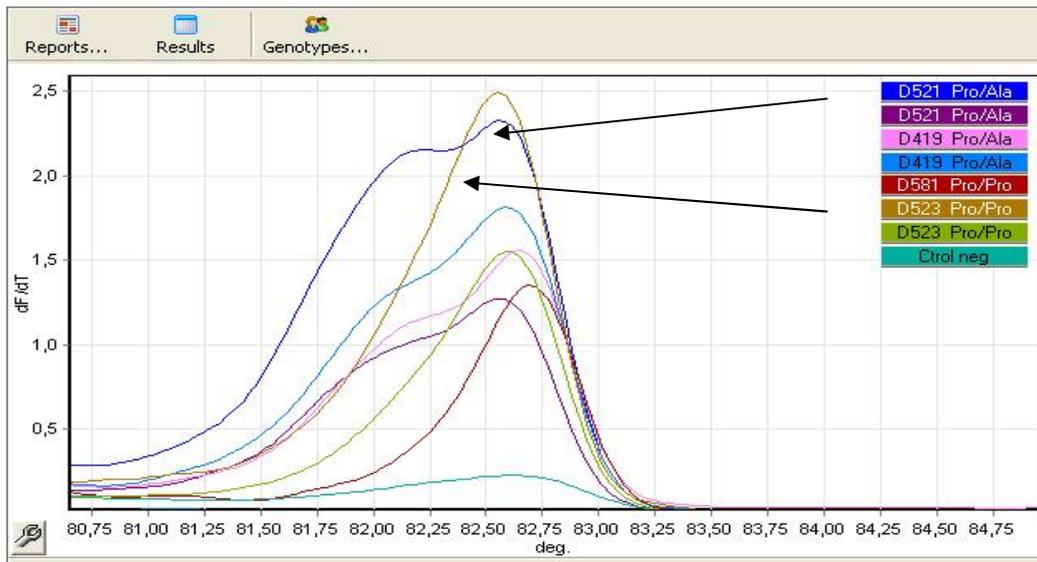


Figura 18. Curvas de desnaturalización correspondientes a 7 de las muestras analizadas. Se observa el esbozo de un doble pico en las curvas de los heterocigotas y un pico en las de los homocigotas.

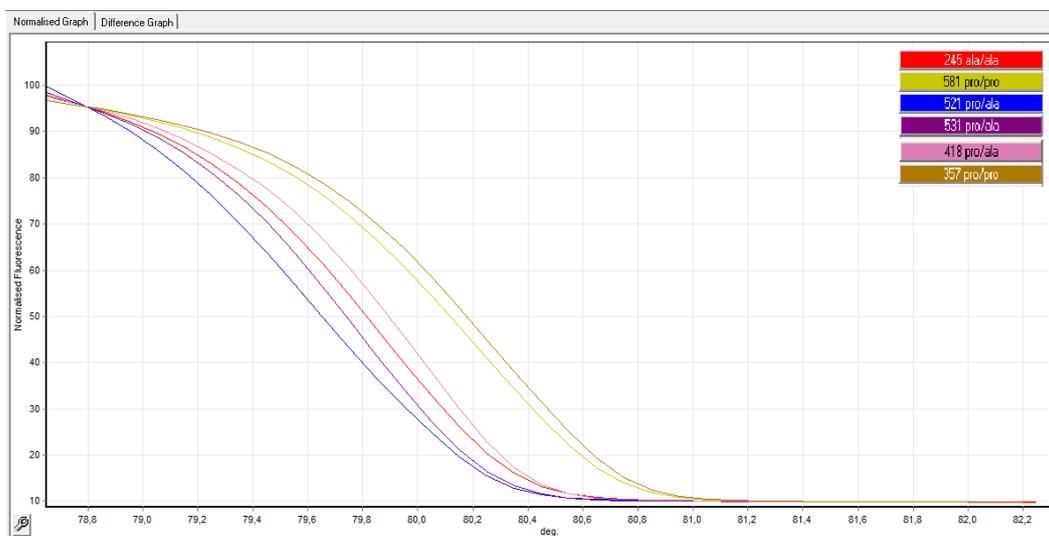


Figura 19. Gráfica de fluorescencia normalizada vs. temperatura en grados Celsius. Las curvas pertenecientes a los individuos homocigotas se separan de las correspondientes a los individuos heterocigotas.

5.4. Análisis mediante secuenciación

Se enviaron a secuenciar 5 muestras tomadas al azar para confirmar los resultados obtenidos mediante PCR a tiempo final y a tiempo real. Se alinearon mediante el programa Mega 5.0 (Figuras 20 y 21).

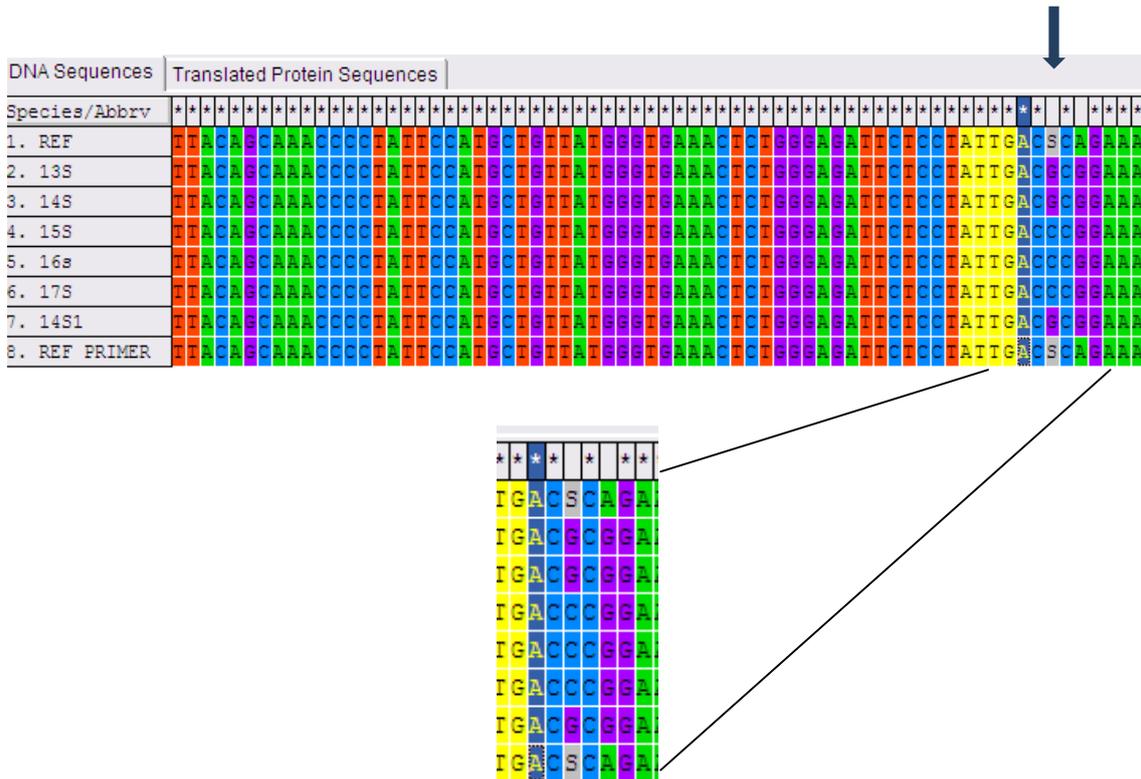


Figura 20. Alineación de las secuencias mediante el programa MEGA. Se muestra un motivo en amarillo, encontrándose el SNP analizado 3 bases hacia el extremo 3' (flecha). S: secuencia de referencia.

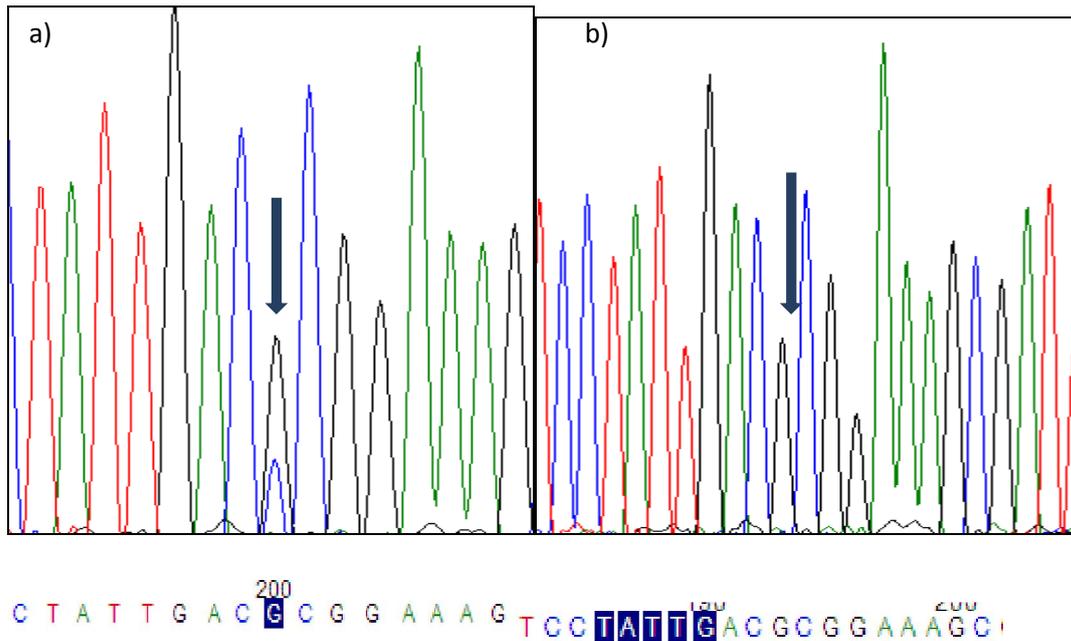


Figura 21. (a) Cromatograma de un individuo heterocigota para el SNP (flecha). (b) Cromatograma de un individuo homocigota para el SNP (flecha).

5.5. Equilibrio de Hardy-Weimberg

No se observaron desviaciones del Equilibrio de Hardy-Weimberg para el polimorfismo estudiado en ninguna de las dos subpoblaciones ($p=0,41$ para la población sin IR y $p=0.51$ para la población con IR).

5.6. Cálculo y comparación de frecuencias

Las frecuencias génicas y genotípicas observadas se muestran en la Tabla 4. El análisis mediante tablas de contingencia de 2 x 2 para la búsqueda de asociación entre el SNP y la IR no mostró diferencias significativas entre ambos grupos (con y sin IR). Se destaca también la ausencia de individuos de genotipo GG (Ala/Ala) en estas poblaciones (Tabla 4 y Figura 22).

Tabla 4. Frecuencias génicas y genotípicas en ambas poblaciones.

	Frecuencias Genotípicas			Frecuencias Génicas	
	CC	CG	GG	C	G
Pob. sin IR	0,827	0,173	0	0,913	0,087
Pob. con IR	0,864	0,136	0	0,932	0,068
Pob. total	0,846	0,154	0	0,923	0,077

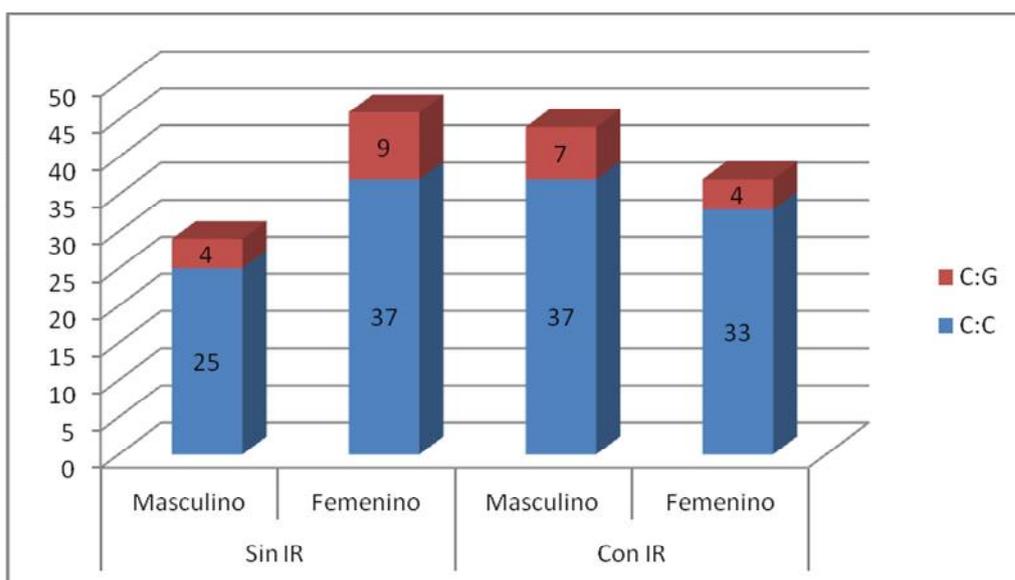


Figura 22. Distribución de genotipos en las poblaciones estudiadas subdivididas por sexo. Se destaca una mayor proporción de mujeres sin IR.

Para analizar las frecuencias encontradas en el total de la muestra y compararlas con otras poblaciones se recurrió a la información de la base del centro NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) donde se indica que el MAF (*minor allele frequency*) en base a 1000 genomas muestra una frecuencia de 0.066 para el alelo G.

Por ende la frecuencia del alelo C es de 0.934, siendo este el alelo ancestral. Cuando se realizó la comparación con este dato, la población estudiada no presentaba diferencias significativas en la frecuencia alélica.

Por otro lado, cuando se recabó la información de la base ALFRED (*AlleleFREquencyDatabase*) de la *National Science Foundation* sobre los datos de frecuencia para diferentes poblaciones humanas, se encontraron diferencias significativas con África y Sudamérica (Tabla 5). De igual manera, al comparar nuestros datos con las frecuencias génicas de otras poblaciones en la base dbSNP-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>), se hallaron diferencias significativas con otros grupos hispanos (Tabla 6).

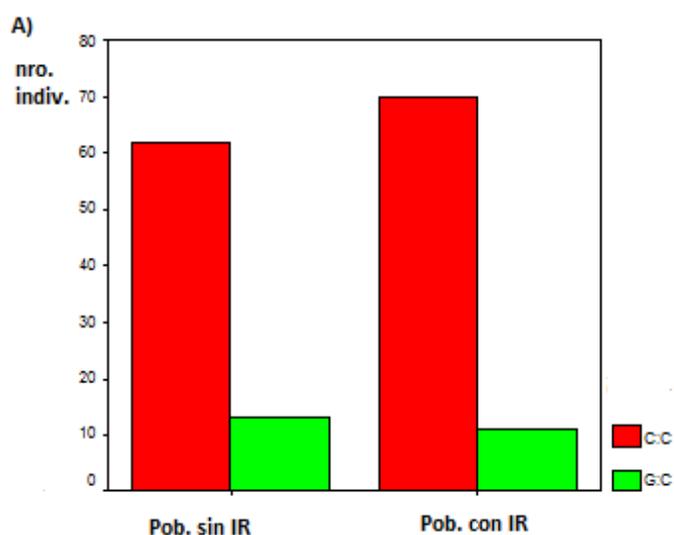
Tabla 5. Comparación con las frecuencias de otras poblaciones en ALFRED.

Población	n (cromosomas)	Frecuencias Génicas		p
		C	G	
Uruguay	312	0.923	0.077	
Africa*	526	0.98	0.02	< 0.001
Europa	6108	0.89	0,11	NS
Asia	3772	0,895	0,105	NS
Sudamérica*	346	0,997	0,003	<0.001

Tabla 6. Comparación con las frecuencias génicas en distintas poblaciones en dbSNP-NCBI (ss48296480).

Población	Frecuencias Génicas		p
	C	G	
Uruguay	0.923	0.077	
Caucásicos	0,887	0,113	NS
Africanos	0,958	0,042	NS
Hispanos*	0,870	0,130	<0.05
Islas del Pacífico	0,896	0,104	NS

Posteriormente se analizó si existía asociación entre los genotipos y el estado de insulino-resistencia de cada subpoblación, no encontrándose diferencias significativas ($p=0.516$). En la Figura 23 se puede observar la distribución de los genotipos en cada subpoblación.



B)

		Genotipo		Total
		C:C	G:C	
CATEG	Pob. sin IR	62	13	75
	Pob. con IR	70	11	81
Total		132	24	156

Figura 23. (A) Distribución de genotipos en las poblaciones estudiadas. (B) Número de individuos con cada genotipo. Nro. indiv.: número de individuos. Pob.: población.

6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La diabetes es una enfermedad de origen multifactorial de gran prevalencia en la cual intervienen y se interrelacionan tanto factores genéticos como ambientales. El estudio genético surge entonces como una herramienta útil para el abordaje de esta patología. Esta ha sido catalogada dentro del grupo de las “enfermedades complejas” y se pueden resumir las principales causas de ello en: su heterogeneidad, tanto genotípica como fenotípica; su fisiopatología, tema en el cual queda aún mucho por descubrir; y la complejidad en el diagnóstico (Taverna, 1997) (esto debido a la gran cantidad de subtipos y variantes, al comportamiento subclínico de larga data que la caracteriza, y a que aún hoy existe controversia sobre sus criterios diagnósticos).

Dentro de los complejos procesos fisiopatológicos que originan la DMT2, la resistencia periférica a la insulina toma un rol preponderante, y entre las distintas causas de ésta, la obesidad ocupa un papel protagónico. Varios genes se han encontrado participando en la regulación del eje adipo-insulínico y muchos de sus polimorfismos aparecen además, como indiscutibles candidatos a ser vinculados a sus alteraciones o al incremento de su eficiencia (Sanghera & Blackett, 2012). La variante Pro12Ala del gen *PPARG2* ha sido correlacionada con una menor predisposición a la DMT2, a la obesidad, y a la generación de IR. Se postula además, que las diferencias en la composición genética de las distintas poblaciones determinarían el mayor o menor peso de este polimorfismo en los caracteres mencionados. Sobre este tema se discutirá más adelante.

Otra de las dificultades que surgen frente al estudio de la DMT2, y en particular en la valoración de la resistencia a la insulina asociada a ésta, es que si bien existen varios métodos para la estimación de la relación glucosa/insulina plasmática, todos presentan desventajas (Singh *et al.*, 2010). Por ejemplo, el método de la pinza euglucémica hiperinsulinémica, actualmente considerado el “*gold standard*”, es muy poco usado debido a sus limitaciones prácticas. Otros índices como la evaluación del modelo homeostático (HOMA-IR) y la medida de marcadores séricos vinculados a la obesidad como la adiponectina muestran también inconvenientes; en el caso del primero, se ha comprobado que al depender de la medida de la glucosa en ayunas

refleja más la resistencia a nivel hepático que la periférica en general (Katsuki *et al.*, 2002). Por otro lado, la adiponectina no es analizada de rutina en los laboratorios debido a su costo. Por estas razones, en el presente trabajo se prefirió el uso del índice TG/HDL (McLaughlin *et al.*, 2005; Quijada *et al.*, 2008; Marotta *et al.*, 2010), tomando como punto de corte el valor 3 mg/dl.

Como fue desarrollado anteriormente, es bien conocida la relación directa existente entre algunas de las alteraciones en el Perfil Lipídico y del aumento del IMC con la obesidad. Esta última a su vez, constituye uno de los pilares en la generación de IR junto a otros factores predisponentes (Reaven *et al.*, 2013). De esta forma el índice TG/HDL surge como un método más práctico para ser usado a nivel poblacional. Por la sencillez de su cálculo y accesibilidad de los parámetros involucrados (medida en plasma de triglicéridos y de lipoproteínas de alta densidad), podría ser una nueva alternativa al método HOMA-IR, el cual es uno de los métodos más aceptados en nuestro país, pero que sin embargo es poco aplicado.

Posteriormente a nuestro trabajo surge un planteo matemático en el cual se adicionan al índice TG/HDL otros valores que ajustarían en mayor medida la valoración clínica de la insulino-resistencia como son una constante por sexo, el índice cadera/cintura y el IMC (Amato *et al.*, 2014). Esta fórmula matemática debe ser aún validada en estudios científicos.

Al estudiar si existían diferencias en cuanto al genotipo del PPAR γ 2 Pro12Ala con respecto a la IR o el IMC no se obtuvieron valores significativos ($p=0.516$ y $p=0.702$ respectivamente) (ver Figura 23). Siendo la DM una enfermedad poligénica y multifactorial, no es de extrañar que el efecto de un gen “relacionado con la DM” como el PPAR γ 2 pueda no ser visible al ser estudiado individualmente. Por ejemplo, los trabajos de Linder y colaboradores (2012) han demostrado el efecto sumatorio de los alelos de riesgo de varios genes (incluido PPAR γ 2) en la generación de intolerancia a la glucosa en mujeres caucásicas. Por otro lado, Black y colaboradores (2008) mostraron en una población mexicana que la interacción entre la variante Pro12Ala y la variante A (rs2144908) del gen HNF4A se asocian juntas a mayor sensibilidad a la insulina, mientras que de forma independiente no lo hacían. En el mismo sentido otros trabajos han demostrado el aumento del valor predictivo para la DMT2 al combinar la

información de otras variantes de riesgo junto a las de PPAR γ 2 (Lyssenko *et al.*, 2005; Weedon *et al.*, 2006).

Además de la importancia de encarar el estudio de la DM como una enfermedad poligénica, podría ser necesario tener en cuenta también la intervención de factores epigenéticos y ambientales predisponentes (Wren & Garner, 2005; He, 2009). Estos últimos son determinantes en modular los efectos del gen *PPARG2*. Este, pertenece al grupo de genes vinculados al “*Thrifty Genotype*” (genotipo de la economía), los cuales desde tiempos ancestrales han servido para la acumulación de nutrientes y energía en el cuerpo preparándolo así para las épocas de escasez (Egede & Dagogo-Jack, 2005). El alelo Pro12 por lo tanto sería ventajoso en este tipo de situaciones, sin embargo, en la actualidad, los hábitos de vida sedentarios y el excesivo consumo de calorías entre otros factores, llevan a un balance calórico positivo continuo con la consecuente generación de obesidad y sus patologías asociadas. El alelo Ala12 por su parte, al generar una variante con menor actividad funcional, tendría entonces un rol protector. Se podría hipotetizar a nivel evolutivo, que la baja frecuencia de este alelo en las poblaciones (Tablas 5 y 6) podría deberse a un insuficiente tiempo de evolución hacia el alelo Ala, el cual no ha podido acompañar la rapidez en el cambio del estilo de vida de los últimos tiempos.

Gouda y colaboradores (2010) han estimado la frecuencia del alelo Ala12 entre 1.7 y 21.6%, y según He y colaboradores (2009) la media para caucásicos se situaría en el 12%, en mexicanos americanos sería del 10%, en africanos americanos del 3% y en chinos del 1%. A nivel regional, los estudios de Mattevi y colaboradores (2007) en brasileños de Porto Alegre informaron una frecuencia del 9% para Ala12. Algunos autores estiman que las frecuencias de Ala12 en la población diabética son menores a las de la población general (Semple *et al.*, 2006). Esta hipótesis iría en el mismo sentido que la de la relación inversa entre el alelo Ala12 y la predisposición a la obesidad, IR y DMT2. Se han realizado gran cantidad de estudios de asociación entre estas variables en distintas poblaciones obteniéndose datos a favor y en contra del rol protector de Ala12 (Buzzetti *et al.*, 2004; Ghousaini *et al.*, 2005; Radha *et al.*, 2006; Badii *et al.*, 2008; Tellechea *et al.*, 2009; Chistiakov *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2012; Tong *et al.*, 2012).

En el análisis de las frecuencias alélicas con respecto a otras poblaciones, extraídas de las bases de datos disponibles (Tablas 5 y 6), debemos realizar algunas consideraciones. La población uruguaya presenta un origen tríhibrido con mayor proporción de origen caucásico pero con un alto grado de mixegenación (Bonilla *et al.*, 2004; Gascue *et al.*, 2005; Hidalgo *et al.*, 2005). Los ancestros provenientes del continente africano fueron originarios de las regiones de Alta Guinea (Senegal, Guinea, Sierra Leona), Baja Guinea (Gana, Togo, Benin, Nigeria, Camerún), Gabón, Congo, Angola y Mozambique (Rout, 1976). Al realizar las comparaciones alélicas es lógico encontrar diferencias ya que las poblaciones africanas de la base ALFRED usadas como referencia son de la región de Etiopía, desde donde no vinieron inmigrantes. Con relación a las poblaciones citadas como “sudamericanas” donde también se encontraron diferencias, estas probablemente se deben a que fueron analizadas poblaciones de origen amerindio de la región de Ecuador; nuestra población si bien presenta alelos amerindios como lo demostraron los estudios con ADN mitocondrial (Bonilla *et al.*, 2004; Gascue *et al.*, 2005), no presenta comunidades aisladas. Con las poblaciones de origen caucásico no se hallaron diferencias debido a que precisamente la mayoría corresponde a países que nos dieron origen (Italia, Francia, España). Con respecto al continente asiático es también lógico no encontrar diferencias ya que el poblamiento de América se inició con grupos procedentes desde el sudeste de dicho continente.

Por otro lado, cuando se analizaron las bases de datos del NCBI donde se agrupan todas las poblaciones de cada región, sólo se encontraron diferencias con los hispanos. Debe notarse que estas poblaciones autorreferidas como “hispanos”, en general presentan una mezcla entre caucásicos y africanos o caucásicos e indígenas. Esto podría estar reflejando las características “híbridas” de estas poblaciones hispanas a diferencia de la nuestra de origen trihíbrido. Estudios para determinar la ancestralidad de las muestras a comparar (por ejemplo mediante marcadores genéticos informativos de ancestralidad) servirían para orientarnos en este sentido.

Con respecto al estudio de la relación del polimorfismo con la IR es interesante observar que si bien la diferencia no fue significativa entre ambas poblaciones se encontró una mayor proporción del alelo Ala12 en pacientes sin IR. Esto estaría de acuerdo con la teoría del rol protector de la variante Ala frente a la aparición de IR al

provocar grandes cambios en la estructura proteica y generando así una proteína con menor actividad funcional.

En cuanto a las frecuencias genotípicas, cabe destacar la gran semejanza entre la frecuencia del genotipo CC (Pro/Pro) en el grupo sin IR con la de los hispanos, mientras que en la población con IR esta es mayor y se acerca más a la de los africanos. Esto último también podría estar sugiriendo la relación entre el alelo ancestral Pro12 y la generación de IR como fue comentado previamente. Otro dato a destacar es la ausencia de individuos GG (Ala/Ala) a diferencia de los datos informados en la población general hispana (dbSNP-NCBI).

Siendo la DM una enfermedad de gran prevalencia y morbilidad en nuestra población el estudio de genes clave en su desarrollo, como el *PPARG2*, dan luz al entendimiento no sólo de su fisiopatología sino también de las potencialidades terapéuticas y de pesquisaje en poblaciones de riesgo o ante el desarrollo de futuras complicaciones, proporcionado así otra herramienta en la lucha contra esta patología.

7. PERSPECTIVAS

Muchas de las hipótesis realizadas podrían ser mejor estudiadas si se cuenta con un mayor tamaño muestral, aumentando así el poder estadístico. Además sería conveniente contar con estudios del polimorfismo en la población general para conocer sus frecuencias, así como la realización de estudios de tipo caso-control para un mayor entendimiento de la relación entre éste y la obesidad, la IR y la DMT2. Asimismo, el estudio de la interacción con otras variantes genéticas sumaría información valiosa en el análisis de estos caracteres poligénicos.

Otras perspectivas que surgen frente a este interesante tema serían la investigación del papel del polimorfismo Pro12Ala frente a la respuesta a las TZD y otros ligandos del PPAR γ 2 con potencialidad terapéutica (lo cual permitiría optimizar la indicación de estos fármacos), así como de las interacciones a nivel funcional con otras proteínas de las diferentes vías metabólicas para un mayor conocimiento de su rol en la homeostasis y la patología.

8. BIBLIOGRAFÍA

Adeghate E, Adem A, Hasan M, Tekes K, Kalasz H. Medicinal Chemistry and Actions of Dual and Pan PPAR Modulators. *Open Medicinal Chemistry Journal*. 2011; 5(Suppl 2): 93-8.

Anderwald C, Anderwald-Stadler M, Promintzer M, Prager G, Mandl M, Nowotny P, Bischof M, Wolzt M, Ludvik B, Kästenbauer T, Pacini G, Luger A, Krebs M. The Clamp-Like Index: a novel and highly sensitive insulin sensitivity index to calculate hyperinsulinemic clamp glucose infusion rates from oral glucose tolerance tests in nondiabetic subjects. *Diabetes Care*. 2007 Sep; 30(9): 2374-80.

Amato M, Pizzolanti G, Torregrossa V, Misiano G, Milano S, Giordano C. Visceral Adiposity Index (VAI) Is Predictive of an Altered Adipokine Profile in Patients with Type 2 Diabetes. *PLoS One*. 2014; 9(3): e91969.

American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2011 January; 34(Suppl 1): S62–S69.

Asociación Latinoamericana de Diabetes. Guías ALAD de diagnóstico, control y tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2. *Revista de la Asociación Latinoamericana de Diabetes*, 2013. ISSN 0327 – 9154.

Ahlqvist E, Ahluwalia T, Groop L. Genetics of type 2 diabetes. *Clinical Chemistry*. 2011 Feb; 57(2): 241-54.

Badii R, Bener A, Zirie M, Al-Rikabi A, Simsek M, Al-Hamaq A, Ghousaini M, Froguel P, Wareham NJ. Lack of association between the Pro12Ala polymorphism of the PPAR-c2 gene and type 2 diabetes mellitus in the Qatari consanguineous population. *Acta Diabetologica*. 2008; 45: 15–21.

Belkina AC, Denis GV. Obesity genes and insulin resistance. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*. 2010; 17(5): 472–477.

Black MH, Fingerlin TE, Allayee H, Zhang W, Xiang AH, Trigo E, Hartiala J, Lehtinen AB, Haffner SM, Bergman RN, McEachin RC, Kjos SL, Lawrence JM, Buchanan TA, Watanabe RM. Evidence of interaction between PPARG2 and HNF4A contributing to variation in insulin sensitivity in Mexican Americans. *Diabetes*. 2008 Apr; 57(4): 1048-56.

Bonilla C, Bertoni B, González S, Cardoso H, Brum-Zorrilla N, Sans M. Substantial Native American female contribution to the population of Tacuarembó, Uruguay, reveals past episodes of sex-biased gene flow. *American Journal of Human Biology*. 2004 May-Jun; 16(3): 289-97.

Buzzetti R, Petrone A, Ribaldo MC, Alemanno I, Zavarella S, Mein CA, Maiani F, Tiberti C, Baroni MG, Vecci E, Arca M, Leonetti F, Di Mario U. The common PPAR-c2 Pro12Ala variant is associated with greater insulin sensitivity. *European Journal of Human Genetics*. 2004; 12: 1050–1054.

Chen R, Corona E, Sikora M, Dudley JT, Morgan AA, Moreno-Estrada A, Nilsen GB, Ruau D, Lincoln SE, Bustamante CD, Butte AJ. Type 2 diabetes risk alleles demonstrate extreme directional differentiation among human populations, compared to other diseases. *PLoS Genetics*. 2012; 8(4): e1002621.

Chistiakov DA, Potapov VA, Khodirev DS, Shamkhalova MS, Shestakova MV, Nosikov VN. The PPAR γ Pro12Ala variant is associated with insulin sensitivity in Russian normoglycaemic and type 2 diabetic subjects. *Diabetes & Vascular Disease Research*. 2010; 7(1): 56–62.

Choi K, Kim YB. Molecular Mechanism of Insulin Resistance in Obesity and Type 2 Diabetes. *Korean Journal of Internal Medicine*. 2010; 25(2): 119-129.

Costa V, Gallo MA, Letizia F, Aprile M, Casamassimi A, Ciccodicola A. PPAR γ : Gene Expression Regulation and Next-Generation Sequencing for Unsolved Issues. *PPAR Research*. 2010; pii: 409168.

Després JP, Lemieux I, Bergeron J, Pibarot P, Mathieu P, Larose E, Rodés-Cabau J, Bertrand OF, Poirier P. Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 2008; 28(6): 1039-49.

Eckel RH, Kahn SE, Ferrannini E, Goldfine AB, Nathan DM, Schwartz MW, Smith RJ, Smith SR. Obesity and Type 2 Diabetes: What Can Be Unified and What Needs to Be Individualized? *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2011; 96: 1654–1663.

Egede LE, Dagogo-Jack S. Epidemiology of type 2 diabetes: focus on ethnic minorities. *Medical Clinics of North America*. 2005; 89(5): 949-75, viii.

Elbein SC. Genetics factors contributing to type 2 diabetes across ethnicities. *Journal of Diabetes Science and Technology*. 2009; 3(4): 685-9.

Farreras-Rozman. *Medicina Interna*. 17a ed. Ediciones Elsevier. Barcelona, 2008.

Ferrero R, Garcia T. Survey on the prevalence of diabetes in Uruguay. Encuesta de prevalencia de la diabetes en Uruguay. Primera fase: Montevideo. *Archivos de Medicina Interna*. 2005; 27: 1-12.

Frederiksen L, Brodbæk K, Fenger M, Jorgensen T, Borch-Johnsen K, Madsbad S, Urhammer SA. Studies of the Pro12Ala Polymorphism of the PPAR-Gene in the Danish MONICA Cohort: Homozygosity of the Ala Allele Confers a Decreased Risk of the Insulin Resistance Syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2002; 87(8): 3989–3992.

Gascue C, Mimbacas A, Sans M, Gallino JP, Bertoni B, Hidalgo P, Cardoso H. Frequencies of the four major Amerindian mtDNA haplogroups in the population of Montevideo, Uruguay. *Human Biology*. 2005 Dec; 77(6): 873-8.

Gerich JE. The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocrine Reviews*. 1998 Aug; 19(4): 491-503.

Ghousaini M, Meyre D, Lobbens S, Charpentier G, Clément K, Charles MA, Tauber M, Weill J, Froguel P. Implication of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma 2 gene in type 2 diabetes and obesity in the French population. *BMC Medical Genetics*. 2005; 6:1-8.

Gonzalez Sanchez JL, Serrano Rios M, Fernandez Perez C, Laakso M, Martinez Larrad MT. Effect of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor g-2 gene on adiposity, insulin sensitivity and lipid profile in the Spanish population. *European Journal of Endocrinology*. 2002; 147: 495–501.

Gouda HN, Sagoo GS, Harding AH, Yates J, Sandhu MS, Higgins JP. The association between the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 (PPARG2) Pro12Ala gene variant and type 2 diabetes mellitus: a HuGE review and meta-analysis. *American Journal of Epidemiology*. 2010 Mar 15; 171(6): 645-55.

Gurnell M, Savage DB, Chatterjee VK, O'Rahilly S. The metabolic syndrome: peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its therapeutic modulation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2003 Jun; 88(6): 2412-21.

Gurnell M. 'Striking the Right Balance' in Targeting PPARgamma in the Metabolic Syndrome: Novel Insights from Human Genetic Studies. *PPAR Research*. 2007; 2007: 83593.

Hannon TS, Bacha F, Lee SJ, Janosky J, Arslanian SA. Use of markers of dyslipidemia to identify overweight youth with insulin resistance. *Pediatric Diabetes*. 2006 Oct; 7(5): 260-6.

Hidalgo PC, Bengochea M, Abilleira D, Cabrera A, Alvarez I. Genetic Admixture Estimate in the Uruguayan Population Based on the Loci LDLR, GYPA, HBGG, GC and D7S8. *International Journal of Human Genetics*. 2005; 5(3): 217-222.

He W. PPAR γ 2 Pro12Ala Polymorphism and Human Health. *PPAR Research*. 2009; 2009:849538.

Ho JS, Germer S, Tam CH, So WY, Martin M, Ma RC, Chan JC, Ng MC. Association of the PPARG Pro12Ala polymorphism with type 2 diabetes and incident coronary heart disease in a Hong Kong Chinese population. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2012; 97(3): 483-91.

Katsuki A, Sumida Y, Urakawa H, Gabazza EC, Murashima S, Morioka K, Kitagawa N, Tanaka T, Araki-Sasaki R, Hori Y, Nakatani K, Yano Y, Adachi Y. Neither homeostasis model assessment nor quantitative insulin sensitivity check index can predict insulin resistance in elderly patients with poorly controlled type 2 diabetes mellitus. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2002; 87(11): 5332-5.

Lebovitz HE. *Manual para Clínicos sobre Resistencia a la Insulina*. Science Press Brasil – Latin America Ltda., 2003.

Linder K, Wagner R, Hatzigelaki E, Ketterer C, Heni M, Machicao F, Stefan N, Staiger H, HäringHU, Fritsche A. Allele summation of diabetes risk genes predicts impaired glucose tolerance in female and obese individuals. *PLoS One*. 2012; 7(6): e38224.

Lyssenko V, Almgren P, Anevski D, Orho-Melander M, Sjögren M, Saloranta C, Tuomi T, Groop L; Botnia StudyGroup. Genetic prediction of future type 2 diabetes. *PLoS Medicine*. 2005 Nov 1; 2(12): e345.

Marotta T, Russo BF, Ferrara LA. Triglyceride-to-HDL-cholesterol ratio and metabolic syndrome as contributors to cardiovascular risk in overweight patients. *Obesity (Silver Spring)*. 2010 Aug; 18(8): 1608-13.

Mattevi VS, Zembrzuski VM, Hutz MH. Effects of a PPARG gene variant on obesity characteristics in Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2007 Jul; 40(7): 927-32.

McCarthy MI. Genomics, type 2 diabetes, and obesity. *The New England Journal of Medicine*. 2010 Dec 9; 363(24): 2339-50.

McLaughlin T, Reaven G, Abbasi F, Lamendola C, Saad M, Waters D, Simon J, Krauss RM. Is there a simple way to identify insulin-resistant individuals at increased risk of cardiovascular disease? *American Journal of Cardiology*. 2005; 96(3): 399-404.

McLaughlin T, Lamendola C, Liu A, Abbasi F. Preferential fat deposition in subcutaneous versus visceral depots is associated with insulin sensitivity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2011 Nov; 96(11): E1756-60.

Noble JA, Erlich HA. Genetics of type 1 diabetes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012 Jan; 2(1): a007732.

Oh EY, Min KM, Chung JH, Min YK, Lee MS, Kim KW, Lee MK. Significance of Pro12Ala mutation in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 in Korean diabetic and obese subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2000; 85(5): 1801-4.

Oh JY. Regional adiposity, adipokines, and insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes and Metabolism Journal*. 2012 Dec; 36(6): 412-4.

Pisabarro R, Sanguinetti C, Stoll M, Prendez D. High Incidence of Type 2 Diabetes in Peroxisome Proliferator-Activated Receptor 2 Pro12Ala Carriers Exposed to a High Chronic Intake of Trans Fatty Acids and Saturated Fatty Acids. *Diabetes Care*. 2004; 27(9): 2251- 2252.

Quijada Z, Paoli M, Zerpa Y, Camacho N, Cichetti R, Villarroel V, Arata-Bellabarba G, Lanes R. The triglyceride/HDL-cholesterol ratio as a marker of cardiovascular risk in

obese children; association with traditional and emergent risk factors. *Pediatric Diabetes*. 2008 Oct; 9(5): 464-71.

Radha V, Vimalaswaran KS, Babu HN, Abate N, Chandalia M, Satija P, Grundy SM, Ghosh S, Majumder PP, Deepa R, Rao SM, Mohan V. Role of genetic polymorphism peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12Ala on ethnic susceptibility to diabetes in South-Asian and Caucasian subjects: Evidence for heterogeneity. *Diabetes Care*. 2006; 29(5): 1046-51.

Reaven G, Abbasi F, McLaughlin T. Obesity, insulin resistance, and cardiovascular disease. *Recent Progress in Hormone Research*. 2004; 59: 207–223.

Robbins S, Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Patología estructural y funcional*. 8 ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España, 2010.

Rout LB. *The African experience in Spanish America: 1502 to the present days*. Cambridge, England: Cambridge University Press, 1976.

Saini V. Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*. 2010, 15; 1(3): 68-75.

Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet*. 2010; 375(9733): 2267–2277.

Sanghera SK, Blakett PR. Type 2 Diabetes Genetics: Beyond GWAS. *Journal of Diabetes and Metabolism*. 2012, 23; 3(198) 1-23.

Sociedad Uruguaya de Ateroesclerosis. Segundo Consenso Uruguayo sobre Dislipemias. *Revista Uruguaya de Cardiología*. 1998; 13: 176-204.

Semple RK, Krishna CK, O’Rahilly S. PPAR γ and human metabolic disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2006; 116: 581–589.

Singh B, Saxena A. Surrogate markers of insulin resistance: A review. *World Journal of Diabetes*. 2010 May 15; 1(2): 36-47.

Smushkin G, Vella A. What is type 2 diabetes? *Medicine (Abingdon)*. 2010 Nov 1; 38(11): 597–601.

Taverna MJ. *Genética de la Diabetes Mellitus No Insulinodependiente*. Librería Akadia Editorial, Buenos Aires, 1997. Pp 110.

Tellechea ML, Aranguren F, Pérez MS, Cerrone GE, Frechtel GD, Taverna MJ. Pro12Ala Polymorphism of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Gene is Associated With Metabolic Syndrome and Surrogate Measures of Insulin Resistance in Healthy Men Interaction With Smoking Status. *Circulation Journal*. 2009; 73: 2118-2124.

Tong JY, Huang N, Wang L, Yi YS, Pan XH, Lü Y. Relationship between PPAR γ 2 Pro12Ala polymorphism and type 2 diabetes mellitus in Chinese Han population: a Meta-analysis. *Zhonghua Yu Fang Yi XueZaZhi*. 2012; 46(4): 359-63.

Weijers RNM. Lipid Composition of Cell Membranes and Its Relevance in Type 2 Diabetes Mellitus. *Current Diabetes Reviews*. 2012; 8: 390-400.

Whincup PH, Nightingale CM, Owen CG, Rudnicka AR, Gibb I, McKay CM, Donin AS, Sattar N, Alberti KG, Cook DG. Early emergence of ethnic differences in type 2 diabetes precursors in the UK: the Child Heart and Health Study in England (CHASE Study). *PLoS Medicine*. 2010 Apr 20; 7(4): e1000263.

Wren JD, Garner HR. Data-mining analysis suggests an epigenetic pathogenesis for type 2 diabetes. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2005 Jun 30; 2005(2): 104-12.

9. ANEXOS

1) Extracción de ADN por el método de Fenol-Cloroformo

Lisado de glóbulos blancos

- Colocar 10 ml de sangre periférica extraídos mediante una jeringa con EDTA en tubos de rosca estériles de 50 ml.
- Agregar 3 volúmenes de *Buffer* de lisis: NH_4Cl 155 mM, KHCO_3 10 mM (pH 7.4), EDTA 1 mM (pH 8), SSC 1X a partir de 20X (NaCl 3 M, Citrato de Sodio 0.3 M).
- Dejar 15 minutos en hielo, agitando de vez en cuando.
- Centrifugar 10 minutos a 1000 rpm.
- Eliminar el sobrenadante.
- Lavar el pellet con SSC 1X.
- Resuspender el pellet en *buffer* SE: NaCl 75 mM, EDTA 24 mM (pH 8).
- Agregar 500 μl de SDS 10% y 100 μl de Proteinasa K.
- Colocar en baño con agitación a 50 rpm a 50°C. A las dos horas reforzar con 100 μl más de Proteinasa K (10 mg/ml), dejar durante toda la noche.

Extracción con Fenol-Cloroformo

- Agregar 1 volumen de fenol.
- Mezclar 15 minutos hasta obtener una emulsión completa.
- Centrifugar 10 minutos a 200 rpm.
- Transferir la fase acuosa a otro tubo de polipropileno de 15 ml con tapa.
- Agregar 1 volumen de cloroformo alcohol isoamílico (24:1).
- Agitar durante 10 minutos.
- Centrifugar 5 minutos a 2000 rpm.
- Extraer la fase acuosa.

Precipitación

- Agregar 0.3 volúmenes de acetato de sodio 2M (pH 5.5).
- Agregar 2 volúmenes de etanol (100%).
- Mezclar por inversión hasta que se forme el precipitado.
- Recuperar el ADN precipitado en un tubo estéril de 5 ml con tapa.
- Lavar el ADN con 3 ml de etanol 70%.
- Secar el precipitado al aire.
- Resuspender en 0.1 a 1 ml de *buffer* TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM).
- Dejar en baño con agitación a 50°C toda la noche.

2) Condiciones de la *master mix* para la PCR a tiempo final:

	Vol. para una muestra (μL)
Buffer 1X	2.5
Primer Fw (10 pmol/ μL)	1
Primer Rv (10 pmol/ μL)	1
MgCl ₂ (25 mM)	3
dNTPs (25 mM)	0.5
Taq Pol (5U/ μL)	0.2
H ₂ O	15.8
ADN (100 ng/ μL)	1
Total	25

AGRADECIMIENTOS

A Adriana Mimbacas por enseñarme y guiarme tanto desde el primer día en que llegué al laboratorio, y por reafirmar y motivar mi gusto por la genética y la investigación. Además, por ser siempre una gran amiga.

A la Dra. Mónica Sans y el Dr. Julio Da Luz por sus valiosas correcciones y aportes para la presente tesina.

A mis compañeros del Laboratorio de Genética del IIBCE (Ana Laura, Joaquina, Carolina, Susana, Mariana C, Claudia, Matías, Mariana F, Elina y Florencia) por su compañerismo y amenizar mi trabajo en el laboratorio.

A mis amigos y compañeros del Departamento de Genética de la Facultad de Medicina, en especial a Natalia, Tatiana, Lorena, Ana, Carlos, Bernardo, Mónica, Jimena, Soledad, “las 3 Lucías”, Rafa y “los Santiagos”.

A mis grandes amigos Sol, Vicky, Gonza, Santi, Enzo y Noe, por estar siempre ahí.

A toda mi familia, por su incondicional apoyo y cariño. En especial a mi abuelo “Tata” por despertar y fomentar mi pasión por la ciencia desde que era niño.

A Kiara, Cachito y Fofi por su amistad y “hacerme el aguante” mientras escribía este trabajo.