



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
ÁREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
MENCIÓN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR



ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PIRUVATO QUINASA Y ALTERACIONES
MOLECULARES DEL PROMOTOR PROXIMAL DEL GEN *PKLR* EN
CÉLULAS SANGUÍNEAS DE PACIENTES CON DIABETES MELLITUS
TIPO 2 Y EN SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL

Lcda. Dayana Requena Sarcollira

Maracay, Noviembre 2016



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
ÁREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
MENCIÓN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR



ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PIRUVATO QUINASA Y ALTERACIONES
MOLECULARES DEL PROMOTOR PROXIMAL DEL GEN *PKLR* EN
CÉLULAS SANGUÍNEAS DE PACIENTES CON DIABETES MELLITUS
TIPO 2 Y EN SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL

AUTORA:

Lcda. Dayana Requena Sarcolira

TUTORA:

MSc. Juana Ledia Triana Alonso

Maracay, Noviembre 2016



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
ÁREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
MENCIÓN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR



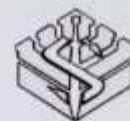
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PIRUVATO QUINASA Y ALTERACIONES
MOLECULARES DEL PROMOTOR PROXIMAL DEL GEN *PKLR* EN
CÉLULAS SANGUÍNEAS DE PACIENTES CON DIABETES MELLITUS
TIPO 2 Y EN SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL

AUTORA:

Lcda. Dayana Requena Sarcolira

Trabajo de Grado presentado ante el área de Postgrado de la Universidad de Carabobo para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, Mención Bioquímica y Biología Molecular.

Maracay, Noviembre 2016



ACTA DE APROBACIÓN DEL PROYECTO DEL TRABAJO DE GRADO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS, MENCIÓN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR.**

Nosotros, los abajo firmantes miembros de la Comisión Coordinadora del programa de postgrado: Maestría en Ciencias Biomédicas, mención Bioquímica y Biología Molecular, una vez leído, analizado, discutido y evaluado el PROYECTO DEL TRABAJO DE GRADO, titulado:

**ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PIRUVATO QUINASA Y ALTERACIONES
MOLECULARES DEL PROMOTOR PROXIMAL DEL GEN PKLR EN CÉLULAS
SANGUÍNEAS DE PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 Y EN
SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL.**

Desarrollado por

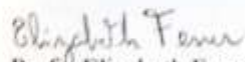
Autora: Dayana Requena S

CI: V-16.849.275

Acordamos que el mismo cumple con los requerimientos necesarios para su desarrollo y culminación, en concordancia con lo establecido en el Reglamento de los Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo, motivo por el cual fue:

APROBADO

En fe de lo cual firmamos, en Maracay a los veinte días del mes de Junio de 2016.


Prof.^a Elizabeth Ferrer
Miembro


Prof. Heriberto Correia
Miembro


Prof.^a Nancy Moreno
Coordinadora





Universidad de Carabobo
Facultad de Ciencias de la Salud
Dirección de Asuntos Estudiantiles
Postgrado- Sede Aragua



ACTA DE VEREDICTO
TRABAJO DE GRADO

Nosotros miembros del jurado designado para la evaluación del Trabajo de Grado titulado:

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PIRUVATO QUINASA Y ALTERACIONES MOLECULARES DEL PROMOTOR PROXIMAL DEL GEN *PKLR* EN CÉLULAS SANGUÍNEAS DE PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 Y EN SANGRE DE CORDON UMBILICAL

Presentado por **DAYANA REQUENA SARCOLIRA** Cédula de identidad: **16.849.275**, para optar al Título de: **MAGISTER SCIENTIARUM EN CIENCIAS BIOMÉDICAS MENCIÓN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.**

Una vez leído el trabajo por cada miembro del jurado, se fijó el día Martes 22 de noviembre de 2016 a las 9:00 am., para la presentación pública. Estimamos que el mismo cumple con lo establecido en el Capítulo X, Sección Cuarta en su artículo 130 del Reglamento de los Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo, el cual reza: "El trabajo de grado es el resultado del estudio que demuestra la capacidad crítica, analítica, constructiva en un contexto sistémico y de dominio teórico y metodológico de la investigación aplicada en la respectiva área del conocimiento del cursante", por lo cual es: **APROBADO.**

El trabajo constituye un aporte original en el área de investigación relacionada con mecanismos bioquímicos y moleculares en el estudio de la Diabetes Mellitus. El jurado acordó por unanimidad otorgar mención **HONORIFICA.**

En Maracay, a los veintidós días del mes de noviembre de 2016.

La tutora fue la MSc. Juana Ledía Triana Alonso CI: 6.238.078.

Dra. Emma Rueda de Arvelo
CI: 7.243.641
Miembro Externo

MSc. Horacio Avila
CI: 8.689.053
Miembro Interno

Dr. Girolamo J. Barrera R.
CI: 14.924.242.
Presidente



..... *Luz de una tierra inmortal*

*A Francisco Triana, mi profe.
Con quien di los primeros pasos de este maravilloso
trabajo y quien siempre será una pieza importante
en mi desarrollo y crecimiento profesional.
Tu cuerpo ya no está entre nosotros, pero tu
recuerdo me acompañará eternamente, porque los
seres especiales jamás se olvidan.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios, porque a través de tu Santo Espíritu iluminas mi camino y me llenas de sabiduría y entendimiento. Por darme la fortaleza necesaria para culminar este trabajo a pesar de todas las adversidades que se presentaron en el camino.

A mi mamá, por brindarme su apoyo incondicional en todo momento, por la paciencia y sobre todo por soportar mi ausencia producto de las horas extras de trabajo. TE AMO.

A mi familia, porque siempre han estado pendientes de esta tesis que parecía interminable, y porque sin duda alguna, son los mejores.

A la Prof. Ledia Triana. Caramba profe, mi agradecimiento hacia usted es más extenso que este trabajo. Siempre le agradeceré el no abandonarnos en aquel momento tan duro que vivimos por la partida del profe, porque solo usted tenía la fortaleza y conocimientos suficientes para seguir adelante con el trabajo del laboratorio, a pesar de las diversas situaciones personales que se le presentaron. También le agradezco la confianza que me sigue brindando, permitirme trabajar a su lado y aprender de usted; y porque a la final, el análisis tan hermoso y detallado de los resultados de este trabajo se los debo a usted.

A Antonio Yépez, porque fuiste el primero en brindarme tu apoyo cuando comencé en el laboratorio y por darme la oportunidad de trabajar contigo y aprender mucho de ti.

A Ninoska Ramírez, porque me has brindado una amistad incondicional que se fortalece con el tiempo, siempre estás pendiente de mí y de mis necesidades, y

porque eres la mejor compañera de compras y de comidas rompe dietas, jajajajaja. Te quiero mucho amiga.

A Ana Celia, Eduardo Luis y Nirza. Porque del día a día nació una linda amistad, por brindarme su apoyo y compañía en todo momento.

A Erley y María Fernanda, por brindarme su apoyo y compañía en el desarrollo de mis experimentos, sin ustedes, todo hubiese sido más complicado.

Al Dr. Carlos Ortiz, por abrirnos las puertas de su consultorio y brindarnos su apoyo en la toma de las muestras de este trabajo.

A los profesores Elizabeth Ferrer y Germán Fraile, porque a diario me regalan las mejores tardes de “*coffee time*”.

A todos los profesores del programa de postgrado, por brindarme sus conocimientos y permitirme adquirir las diferentes habilidades y destrezas.

A mi familia BIOMED, porque siempre me hacen sentir como en casa, por recibirme con los brazos abiertos y brindarme su apoyo en las buenas y en las malas.

A todas las personas que forman parte de mi vida, por el cariño que me brindan y porque sé que de una u otra manera cuento con ustedes.

A todos, eternamente agradecida...

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LA SECCIÓN DE BIOQUÍMICA DE ÁCIDOS
NUCLEICOS Y SÍNTESIS DE PROTEÍNAS DEL INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS “Dr. FRANCISCO J. TRIANA ALONSO”,
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE
CARABOBO (BIOMED-UC), EN COOPERACIÓN CON EL LABORATORIO
VENEZOLANO DE CÉLULAS MADRE C.A. Y FINANCIADO POR EL
PROYECTO LOCTI: “OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS
PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS DE SANGRE DE CORDÓN
UMBILICAL”

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
CAPÍTULO I	
1.1 Introducción.....	1
1.2 Objetivos.....	6
1.2.1 General.....	6
1.2.2 Específicos.....	6
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	
2.1 Diabetes mellitus.....	8
2.2 Diabetes mellitus tipo 2.....	10
2.3 Genética de la diabetes mellitus tipo 2.....	13
2.4 Enzima piruvato quinasa.....	15
2.4.1 Gen de la piruvato quinasa L como candidato probable en la etiopatogenia de la diabetes mellitus tipo 2.....	18
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO	
3.1 Diseño y tipo de investigación.....	21
3.2 Características de la muestra, criterios de inclusión y recolección de datos.....	21
3.2.1 Muestras.....	21
3.2.2 Criterios de inclusión.....	22
3.2.3 Técnicas e instrumento de recolección de los datos de los donantes de sangre periférica.....	23
3.3 Procedimiento experimental.....	23
3.3.1 Obtención de la muestra de sangre periférica.....	23

	Pág.
3.3.2 Determinación de parámetros clínicos de laboratorio.....	24
3.3.3 Extracción y análisis del ADN.....	25
3.3.4 Amplificación de la región promotora del gen <i>PKLR</i> mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	26
3.3.5 Análisis de Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla (SSCP).....	27
3.3.6 Determinación de la actividad enzimática de piruvato quinasa.....	28
3.3.6.1 Preparación del extracto proteico celular.....	28
3.3.6.2 Ensayos de actividad de piruvato quinasa.....	29
3.4 Análisis estadístico de los datos.....	30
 CAPÍTULO IV: RESULTADOS	
4.1. Características generales de las muestras sanguíneas.....	31
4.2 Extracción y análisis del ADN genómico.....	32
4.3 Amplificación de la región promotora del gen <i>PKLR</i>	34
4.4 Análisis por SSCP de la región promotora amplificada del gen <i>PKLR</i> en muestras de sangre periférica y de cordón umbilical.....	36
4.5 Actividad enzimática de piruvato quinasa.....	42
4.6 Asociación de la actividad de piruvato quinasa con las variantes en el promotor de la enzima y su relación con la diabetes mellitus.....	55
4.7 Correlación de la actividad enzimática de piruvato quinasa y los patrones de SSCP con los parámetros clínicos de laboratorio en los donantes diabéticos.....	60
4.8 Correlación de la actividad enzimática de piruvato quinasa y los patrones de SSCP con los años de evolución y manifestación de la diabetes mellitus....	72

	Pág.
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN	
Discusión.....	73
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
Conclusiones.....	90
Recomendaciones.....	91
BIBLIOGRAFÍA.....	92
ANEXOS	
Anexo A.....	102
Anexo B.....	104

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	
Figura 1. Representación esquemática de la expresión del ARNm de PK L y R de rata usando promotores específicos de tejido. Regulación de la transcripción y procesamiento del ARNm de PKL. Regulación de la actividad de piruvato quinasa.....	17
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	
Figura 2. Perfil del ADN en electroforesis en gel de agarosa al 0,8%.....	33
Figura 3. Amplificación de la región promotora del gen <i>PKLR</i> mediante PCR.....	34
Figura 4. Estandarización de la reacción de amplificación del fragmento de 618 pb correspondiente a la región promotora del gen <i>PKLR</i> con diferentes concentraciones de oligonucleótidos, ADN y magnesio.....	35
Figura 5. Amplificación de la región promotora del gen <i>PKLR</i> por PCR con las condiciones optimizadas.....	36
Figura 6. Análisis por Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla (SSCP) de los productos de PCR (618 pb) de DD, DS, DSCA y SCU.....	37
Figura 7. Perfiles de migración por SSCP y análisis densitométrico de las muestras (DD, DS, DSCA y SCU).....	38
Figura 8. Distribución porcentual de las variaciones en el promotor de <i>PKLR</i> según la técnica Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla en las poblaciones de DD, DS, DSCA y SCU...	40
Figura 9. Cinética de reacción de PK en ausencia y presencia de 25 mM PEP.....	43

	Pág.
Figura 10. Relación de la velocidad inicial de reacción de PK con la concentración de sustrato.....	45
Figura 11. Optimización de la cantidad de proteína a utilizar por ensayo de actividad de piruvato quinasa.....	46
Figura 12. Actividad específica de PK en las poblaciones de sangre periférica y sangre de cordón umbilical.....	47
Figura 13. Distribución de los valores de actividad específica de PK en diferentes grupos dentro de cada muestra poblacional.....	49
Figura 14. Cinéticas de reacción y actividad específica de PK en los diferentes grupos de cada población.....	50
Figura 15. Distribución porcentual de los grupos de actividad enzimática en las poblaciones de DD, DS, DSCA y SCU.....	52
Figura 16. Distribución porcentual de los individuos en los diferentes grupos de actividad de PK con respecto a los patrones de SSCP en las poblaciones de DD, DSCA y DS.....	59
Figura 17. Correlación de la actividad de PK en los diferentes grupos de DD con los valores de glicemia, HbA1c e insulina y promedios con la desviación estándar de los parámetros clínicos en los diferentes grupos de actividad enzimática.....	63
Figura 18. Valores promedio y desviación estándar de glicemia, HbA1c, insulina y actividad de PK en los diferentes grupos de actividad enzimática de DD de acuerdo a los patrones de SSCP.....	65
Figura 19. Correlación de la actividad de PK en los diferentes grupos de DD con los valores de colesterol, HDL-col y LDL-col, y promedios con la desviación estándar de estos parámetros clínicos en los diferentes grupos de actividad enzimática.....	68

	Pág.	
Figura 20	Correlación de la actividad de PK en los diferentes grupos de DD con los valores de VLDL-col y triglicéridos, y promedios con la desviación estándar de estos parámetros clínicos en los diferentes grupos de actividad enzimática.....	69
Figura 21.	Valores promedio y desviación estándar de los parámetros del perfil lipídico en los diferentes grupos de actividad enzimática de DD de acuerdo a los patrones de SSCP.....	71
Figura 22.	Correlación de la actividad enzimática de PK y los patrones de SSCP con la edad de la manifestación de la diabetes mellitus y años de evolución de la enfermedad.....	72

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	
Tabla 1. Características clínicas de la población donante de sangre periférica.....	32
Tabla 2. Prevalencia de variaciones en el promotor de <i>PKLR</i> según el método de SSCP.....	39
Tabla 3. Análisis estadístico del riesgo a la diabetes mellitus en función de los patrones de SSCP observados en DD y DS.....	41
Tabla 4. Análisis estadístico del riesgo a la diabetes mellitus en función de los patrones de SSCP observados en DD, DS y DSCA.....	42
Tabla 5. Prevalencia de individuos en los diferentes grupos de actividad de PK de cada población.....	51
Tabla 6. Análisis estadístico del riesgo a la diabetes mellitus en función de las actividades de PK observadas en DD y DS.....	53
Tabla 7. Análisis estadístico del riesgo a la diabetes mellitus en función de las actividades de PK observadas en DD, DS y DSCA.....	54
Tabla 8. Análisis estadístico de la asociación de las actividades de PK con los patrones de SSCP o variantes en el promotor de la enzima en la población total.....	56
Tabla 9. Prevalencia de individuos en los diferentes grupos de actividad de PK de cada población con respecto a los patrones de SSCP.....	59
Tabla 10. Análisis estadístico del riesgo a la diabetes mellitus en función de las actividades de PK y los patrones de SSCP observados en DD y DS.....	60

UNIVERSIDAD DE CARABOBO
ÁREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
MENCIÓN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Actividad enzimática de piruvato quinasa y alteraciones moleculares del promotor proximal del gen *PKLR* en células sanguíneas de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y en sangre de cordón umbilical

Autora: Lcda. Dayana Requena Sarcollira

Tutores: MSc. Juana Ledia Triana Alonso

Maracay, Noviembre 2016.

RESUMEN

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) comprende un grupo complejo y heterogéneo de condiciones metabólicas caracterizadas por hiperglicemia, debido a la resistencia en la acción de la insulina y/o disminución de su secreción. Aproximadamente el 7% de la población venezolana sufre DMT2. En la DMT2 existe predisposición genética y el gen de la piruvato quinasa hepática (*PKLR*), clave en el proceso de glucólisis, se ha propuesto como un posible factor para el desarrollo de esta enfermedad. El objetivo del trabajo fue identificar variaciones en la región promotora de *PKLR* relacionadas con la actividad enzimática y asociadas a la DMT2 en una población venezolana de donantes sanos (DS), donantes diabéticos (DD), donantes sanos con antecedentes familiares de DMT2 (DSCA) y donantes de sangre de cordón umbilical (SCU). Se amplificó por PCR un fragmento de 618 pb entre las posiciones -469 y +149 de *PKLR*. Mediante la técnica SSCP se detectaron tres patrones genéticos diferentes (P1, P2, P3) dos de ellos (P1, P2) presentes en las cuatro poblaciones estudiadas. El P2 es el más prevalente en los DD (61 %), con alta asociación a la DMT2 (OR=6,22; P= 0,0008) y P1 está asociado a los DS (P= 0,0048). El P3 solo se observó en DS y SCU. Se detectaron tres grupos de actividad específica de piruvato quinasa (PK) en todas las poblaciones [baja (G1), intermedia (G2) y alta (G3)]. La actividad baja (G1) está asociada al patrón genético P2, y la intermedia (G2) a P1. El grupo G1(P2) es prevalente en DD (50%) y está asociado a DMT2 (OR=3,81; P= 0,0351), presentando resistencia a la insulina, hiperinsulinismo y dislipidemia con alto riesgo aterogénico. En las variables analizadas, los DSCA tienen mayor similitud con los DD que con los DS y un riesgo mayor a la patología (~2 veces). La metodología descrita en SCU podría aplicarse para detectar variantes genéticas asociadas a la DMT2 a temprana edad, y para el control de calidad genético en diversas terapias con células madre. Los resultados sugieren que la variante P2 en el promotor de *PKLR* podría afectar la transcripción del gen y disminuir la expresión de PK, transformándose en uno de los posibles marcadores genéticos para detectar predisposición a la DMT2 y permitir aplicar medidas preventivas o desarrollar nuevos tratamientos.

Palabras clave: Diabetes mellitus, *PKLR*, SSCP, piruvato quinasa, actividad enzimática.

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) comprende un grupo de trastornos metabólicos de etiología multifactorial, que tienen en común el fenotipo de la hiperglicemia; esa característica se debe a una resistencia a la acción de la hormona insulina y/o alteración en su producción y secreción por las células β de los Islotes de Langerhans del páncreas. Las dos formas más comunes de la diabetes son: la tipo 1 (DMT1), caracterizada por una disminución en la producción de insulina debido generalmente a reacciones autoinmunes contra las células β pancreáticas, y la tipo 2 (DMT2), donde existe un deterioro en la respuesta a la acción de la insulina y disfunción de las células β del páncreas (Lin y Sun, 2010; ADA, 2016).

Existen también otros tipos de diabetes que se presentan con menor frecuencia en la población, tal es el caso de la diabetes de desarrollo juvenil (MODY, por sus siglas en inglés *Maturity Onset Diabetes of the Young*) que es un subtipo genéticamente heterogéneo de DMT2, caracterizado por aparición a temprana edad (usualmente alrededor de 25 años), herencia autosómica dominante y un defecto primario en la secreción de insulina (Fajans y cols., 1994), la diabetes mitocondrial, cuyos estudios comenzaron debido a la preponderancia de la DMT2 en mujeres y su asociación con el ADN mitocondrial (Kadowaki y cols., 1994) y la DM gestacional, que se presenta aproximadamente en el 7% del total de mujeres embarazadas (Metzger y cols., 2010). Se ha documentado también la aparición de DM asociada a enfermedades del páncreas exocrino (como la fibrosis quística), y la diabetes inducida por fármacos o químicos (por el uso de glucocorticoides en el tratamiento para el VIH/SIDA o posterior a trasplante de órganos) (ADA, 2016).

La DMT1 representa solo el 5 a 10% del total de pacientes con diabetes, mientras que la DMT2, está presente en el 90 a 95% de las personas con diabetes (ADA, 2014). La DMT2 es uno de los mayores problemas para los sistemas de salud de Latinoamérica. La Federación Internacional de Diabetes (IDF, por sus siglas en inglés *International Diabetes Federation*) estimó en el 2015 que la prevalencia de diabetes en América era de 9,4% entre los adultos de 20 a 79 años y 39% de estos pacientes ignoran su condición. En la mayoría de los países de la región, la diabetes se encuentra entre las primeras cinco causas de mortalidad, siendo la cardiopatía isquémica y los infartos cerebrales las causas de muerte más frecuentes entre las personas con diabetes (IDF, 2015). En Venezuela, la DM ocupa la quinta posición entre las 25 causas de muerte diagnosticadas para el año 2012, lo que implica el 7,11% de la mortalidad total del país, según reportes del Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS, 2014). Dentro de las diferentes variantes de diabetes, la DMT2 es la más prevalente y la que está recibiendo más atención desde el punto de vista de la investigación (ADA, 2010).

El riesgo de desarrollar DMT2 incrementa con la edad, la obesidad y el sedentarismo; también ha sido asociada con una fuerte predisposición genética diferente a la forma autoinmune de la DMT1. Sin embargo, la genética de la DMT2 es compleja y no está claramente definida (ADA, 2010).

Desde el primer amplio estudio de asociación genética para la identificación de nuevos locus con susceptibilidad para la DMT2 realizado en el año 2007, se han identificado aproximadamente 40 genes que podrían estar involucrados en el desarrollo de esta enfermedad. Sin embargo, los locus genéticos identificados representan aproximadamente el 10% del total de factores genéticos hereditarios de la DMT2 (Imamura y Maeda, 2011).

Variaciones en el gen de la insulina, el receptor de insulina y genes de los transportadores de glucosa han sido considerados como los principales condicionantes genéticos para el desarrollo de DMT2 (Permutt y Hattersley, 2000). Adicionalmente, se identificó una región del cromosoma 1q (q21-q23) en poblaciones de diferentes etnias, que también contiene muchos genes que podrían ser factores importantes para el desarrollo de esta enfermedad. Esta región incluye al gen de la isoforma hepática de la enzima piruvato quinasa (*PKLR*), el gen del ligando natural propuesto para el receptor de sulfonilureas y el gen de la α -endosulfina (*ENSA*), entre otros (Wallace y cols., 2004).

La piruvato quinasa (PK) es una enzima clave en la regulación de la glucólisis, cataliza la transferencia de un grupo fosforilo desde el fosfoenolpiruvato al ADP con la producción de una molécula de ATP y piruvato. El gen *PKLR*, codifica las isoenzimas L y R, está ubicado en el cromosoma 1q21 y el procesamiento del ARNm sufre un corte y empalme alternativo para generar dos isoformas que son controladas por distintos promotores y muestran diferente distribución de tejidos: la isoforma de las células rojas (exones 1 y 3-12) y la isoforma hepática (exones 2 y 3-12) que también es expresada en las células β pancreáticas, intestino delgado y túbulo contorneado proximal (Yamada y Noguchi, 1999). Además, la PKL comparte la distribución de genes en tejidos que causan varios tipos de MODY (Fajans y cols., 2001) y está entre los genes que se expresan menos en pacientes MODY1 y 3 (Wang y cols., 2000a; Wang y cols., 2000b; Shih y cols., 2001).

Wang y cols. (2002) identificaron cinco variaciones en el gen *PKLR* y determinaron que dos de éstas están asociadas con el incremento del riesgo a sufrir DMT2. Otros investigadores se han dedicado a analizar las variaciones de la actividad enzimática de PK en pacientes diabéticos. En un estudio de perfiles polipeptídicos en células sanguíneas de pacientes con DM, se observó la disminución de un polipéptido con peso molecular compatible con la enzima PK (Adán y cols., 2002).

Posteriormente, analizando la actividad de esta enzima, se evidenció una disminución significativa en células sanguíneas de pacientes con la enfermedad (Luis y Martínez, 2004). Tomando estos reportes en conjunto, se configuró una hipótesis explicativa: en las células sanguíneas de al menos un grupo significativo de pacientes con DM, la enzima PK podría estar menos expresada.

Una posible explicación a la menor expresión de PK en pacientes con DM podrían ser las alteraciones en el promotor proximal del gen, ya que afectarían la unión de factores transcripcionales indispensables para la actividad de la ARN polimerasa (Lugo, 2011). Sin embargo, no hay estudios detallados que relacionen la enfermedad y la actividad enzimática con cambios en el promotor del gen de la PK.

Por otro lado, el análisis de variaciones genéticas relacionadas con la DM es importante realizarlo a temprana edad, para diseñar medidas correctivas que prevengan la aparición de los síntomas o la aplicación de terapias específicas. En este sentido, las muestras de sangre de cordón umbilical (SCU) serían ideales para tal fin. Estudios de regiones génicas correspondientes a los promotores de los genes *PKM* y *PKLR* (González y cols., 2009), *GCK* (Nones y cols., 2011) y *SLC2A2* (Torres, 2013), mostraron aportar información de gran utilidad en SCU y relacionada con posibles variaciones que contribuyen al desarrollo de la DM.

El estudio de las variaciones en genes claves del metabolismo regulados por la insulina en SCU no solo sería útil como un posible método de diagnóstico temprano de la enfermedad, sino también, en una nueva terapia propuesta para la DM que implica el uso de células madre de sangre de cordón umbilical (SCU) (Koblas y cols., 2005; Liu y Han, 2008). Para implementar este tipo de terapia es necesario que además de las pruebas normales de histocompatibilidad que se realizan (Delaney y cols., 2009), se hagan estudios genéticos sobre la muestra a trasplantar, con la

finalidad de garantizar que no contenga información genética relacionada con alguna patología, incluyendo la DM.

La correlación de la actividad enzimática de PK con polimorfismos en la región promotora del gen *PKLR* en pacientes diabéticos también sería importante considerando el componente ambiental de la DMT2, pues cada vez es más evidente el efecto de las condiciones ambientales sobre el desarrollo de la enfermedad, las cuales pueden ser controladas de acuerdo al perfil genético de cada individuo si hay un diagnóstico temprano de riesgo a la DMT2. Por tal motivo, en el presente trabajo se analizó la actividad enzimática de piruvato quinasa y su posible correlación con variaciones en el promotor del gen *PKLR* en células sanguíneas de pacientes con DMT2 y en células de SCU, y la implicación de dichas variantes en la enfermedad.

Los resultados obtenidos podrían aportar mayores conocimientos sobre los aspectos moleculares y metabólicos de la DMT2, además de establecer un posible patrón genético de riesgo a la DMT2 relacionado con piruvato quinasa. Estas variantes génicas también podrían ser incluidas en los marcadores genéticos relacionados con la patología y que corresponden a estudios a largo plazo, además de servir para la evaluación terapéutica y evolutiva de la DMT2.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo General

Evaluar la actividad enzimática de piruvato quinasa y las alteraciones moleculares del promotor del gen *PKLR* en células sanguíneas de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y en sangre de cordón umbilical.

1.2.2 Objetivos específicos

- Amplificar la región promotora del gen *PKLR* mediante la técnica reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos diseñados.
- Analizar las variaciones en la región amplificada del promotor del gen *PKLR* mediante la técnica de Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla (SSCP).
- Determinar la actividad enzimática de piruvato quinasa en extractos proteicos celulares de las muestras en estudio.
- Determinar la asociación de las diferentes actividades de piruvato quinasa con las variantes en el promotor de la enzima y su relación con la diabetes mellitus mediante pruebas estadísticas.
- Correlacionar la actividad enzimática de piruvato quinasa y las variaciones encontradas en el promotor del gen *PKLR* con los parámetros clínicos de laboratorio en los donantes diabéticos.

- Correlacionar la actividad enzimática de piruvato quinasa y las variaciones encontradas en el promotor del gen *PKLR* con los años de evolución y manifestación clínica de la Diabetes Mellitus.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus (DM) comprende un grupo de trastornos metabólicos de etiología multifactorial, que tienen en común el fenotipo de la hiperglicemia; está caracterizada por resistencia a la acción de la insulina y/o un trastorno en la producción o secreción de la hormona, que se traduce en una disminución de la incorporación de glucosa a las células y su aumento en el torrente sanguíneo (Lin y Sun, 2010).

Las dos formas más comunes de la DM son la tipo 1 (DMT1), caracterizada por una disminución en la producción de insulina, y la tipo 2 (DMT2), donde existe un deterioro en la respuesta a la acción de la insulina y disfunción de las células β del páncreas (Lin y Sun, 2010). Ambos tipos de diabetes son considerados como las principales enfermedades multifactoriales, con varios factores predisponentes genéticos y ambientales, algunos de los cuales podrían ser comunes a los dos (Tuomi, 2005). Además, están asociadas con excesiva morbilidad y mortalidad; la DMT1 está presente en menos del 10% de la población diabética, mientras que la DMT2 es una enfermedad muy diferente que está alcanzando proporciones epidémicas en las sociedades occidentales y se prevé que afectará a 300 millones de personas en todo el mundo para el año 2025 (King y cols., 1998, Zimmet y cols., 2001). Ambas conducen a hiperglicemia, excesiva producción de orina (poliuria), sed compensatoria (polidipsia), incremento en la ingesta de líquidos, visión borrosa, pérdida de peso, letargo y cambios en el metabolismo energético (Lin y Sun, 2010).

El trastorno de la regulación metabólica que acompaña a la DM provoca alteraciones fisiopatológicas secundarias en muchos sistemas orgánicos, generando anomalías en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, siendo la base de éstas, la acción deficiente de la insulina en los tejidos diana (ADA, 2010). La diabetes reduce la expectativa y calidad de vida, e incrementa el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, neuropatía periférica, enfermedad renal, ceguera, múltiples infecciones y amputación, generalmente de miembros inferiores (Brownlee, 2001).

Se han reportado otros tipos de diabetes, entre ellos la diabetes mitocondrial, cuyos estudios comenzaron debido a la preponderancia de la DM2 en mujeres y su asociación con el ADN mitocondrial (Kadowaki y cols., 1994), la DM gestacional que es diagnosticada en el segundo o tercer trimestre del embarazo, pero no es considerada una diabetes claramente manifiesta, ya que generalmente se resuelve después del parto; y otros tipos específicos de DM debido a diversas causas, tal es el caso de la diabetes monogénica [como la diabetes neonatal y la diabetes de desarrollo juvenil (MODY, por sus siglas en inglés *Maturity Onset Diabetes of the Young*)], enfermedades del páncreas exocrino (como la fibrosis quística), y la diabetes inducida por fármacos o químicos (por el uso de glucocorticoides en el tratamiento para el VIH/SIDA o posterior a trasplante de órganos) (ADA, 2016).

La asignación de un tipo de diabetes a un individuo, con frecuencia depende de las circunstancias presentes en el momento del diagnóstico, y muchas personas diabéticas no se ajustan fácilmente a una clase específica de diabetes. Por esa razón, es importante estudiar la patogénesis de la hiperglicemia para que la diabetes sea diagnosticada y tratada de manera eficiente (ADA, 2016).

La DM2 está presente en el 90 a 95% de las personas con diabetes (ADA, 2014), por lo que representa uno de los mayores problemas para los sistemas de salud

de Latinoamérica. La Federación Internacional de Diabetes (IDF) estimó en el 2015 que la prevalencia de diabetes en América era de 9,4% entre los adultos de 20 a 79 años y que 39% de estos pacientes ignoran su condición. Se calcula que esta cifra aumentará hasta alcanzar el 12,7% de los adultos para el año 2035. En la mayoría de los países de la región, la diabetes se encuentra entre las primeras cinco causas de mortalidad, siendo la cardiopatía isquémica y los infartos cerebrales las causas de muerte más frecuentes entre las personas con diabetes (IDF, 2015).

En Venezuela, la DM ocupa el quinto lugar entre las 25 causas de muerte diagnosticadas para el año 2012, lo que implica el 7,11% de la mortalidad total del país, según reportes del Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS, 2014). Dentro de las diferentes variantes de diabetes, la DMT2 es la más prevalente y la que está recibiendo más atención desde el punto de vista de la investigación (ADA, 2010).

2.2 DIABETES MELLITUS TIPO 2

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) comprende un grupo complejo heterogéneo de condiciones metabólicas caracterizadas por el incremento de los niveles de glucosa en sangre debido a la resistencia a la acción de la insulina y/o en la secreción de la misma (Das y Elbein, 2007). La etiología específica de la DMT2 aún no es del todo conocida, estudios refieren que no ocurre destrucción de las células β del páncreas y los pacientes no presentan ninguna de las otras causas descritas para la DMT1 (ADA, 2010).

La secreción de insulina y la acción de la misma, se ven afectadas en la DMT2. Su relativa importancia ha sido fuertemente debatida, pero actualmente se conoce que la disfunción de las células β pancreáticas es un elemento clave en el

desarrollo de la enfermedad. Las anormalidades en la secreción de insulina preceden a la aparición de la DMT2 y pueden presentarse incluso cuando los sujetos muestran tolerancia a la glucosa (Van Haeften y cols., 1998). La DMT2 también puede ocurrir sin resistencia a la insulina (Gerich, 1998) y, de manera inversa, algunas formas severas de resistencia a la insulina (como aquellas causadas por mutaciones en el receptor) pueden no estar acompañadas por diabetes (Taylor, 1992; Chalkley y cols., 2002).

La resistencia a la insulina se manifiesta como una disminución en el transporte de glucosa inducido por la insulina en adipocitos y músculo esquelético, un aumento de la producción de glucosa hepática y alteraciones en el metabolismo de lípidos en el tejido adiposo y hepático (Saltiel y Kahn 2001; Le Roith y cols., 2003). La resistencia insulínica se caracteriza por una menor acción inhibitoria de la insulina sobre la lipasa sensible a hormonas de los adipocitos viscerales, lo cual lleva a un aumento de ácidos grasos libres en circulación, por lo que la dislipidemia es un hallazgo muy frecuente en pacientes con diabetes (Brites y cols., 2013).

La diabetes es una enfermedad que va disminuyendo progresivamente la calidad de vida de quien la padece. Con la aplicación de insulina a los enfermos diabéticos, una terapia que comenzó hace más de 60 años y que produjo una considerable mejoría en los pacientes con DMT1, se pensó que el problema estaba resuelto, pero la diabetes es una enfermedad mucho más compleja, sobre todo la tipo 2, y dicha complejidad se observa con el aumento en el tiempo de vida de los pacientes debido a la aplicación de los tratamientos (Lin y Sun, 2010).

Muchos pacientes que presentan este tipo de diabetes son obesos, y la obesidad por sí sola causa algún grado de resistencia a la insulina. Esta forma de diabetes frecuentemente presenta varios años de evolución sin ser diagnosticada porque la hiperglicemia se desarrolla gradualmente y, en las primeras etapas de la

enfermedad, muchas veces las manifestaciones no son lo suficientemente graves como para que el paciente note cualquiera de los síntomas clásicos de diabetes. No obstante, este tipo de pacientes presentan alto riesgo de desarrollar complicaciones macro y microvasculares. El riesgo de desarrollar DMT2 incrementa con la edad, la obesidad y el sedentarismo. Se desarrolla con mayor frecuencia en mujeres que previamente presentaron diabetes gestacional e individuos con hipertensión o dislipidemia, y con frecuencia varía entre diferentes razas y grupos étnicos. La DMT2 también ha sido asociada con una fuerte predisposición genética diferente a la forma autoinmune de la DMT1. Sin embargo, la genética de la DMT2 es compleja y no está claramente definida (ADA, 2010).

La alta prevalencia de la DMT2, así como, la reducción de la expectativa y calidad de vida de los pacientes que sufren la enfermedad, ha llevado a la realización de numerosas investigaciones que han cubierto diferentes aspectos de la patología. Muchas de esas investigaciones han estado dirigidas hacia el componente genético, para tratar de detectar variaciones o polimorfismos que se relacionen con la DMT2 y a la influencia de los factores ambientales sobre determinados patrones genéticos que conducen al desarrollo de la enfermedad (Laukkanen y cols., 2005; Willer y cols., 2007; Kilpeläinen y cols., 2007; Lyssenko y cols., 2008).

El descubrimiento de locus de susceptibilidad genética a la DMT2 ha sido un desafío, y aún más la necesidad de crear nuevas estrategias para superar esta dificultad. El desarrollo de altas tecnologías en software de genotipificación, estadística y computación ha mostrado un progreso remarcable sobre el estudio del genoma y asociaciones genéticas (Imamura y Maeda, 2011).

2.3 GENÉTICA DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2

Como en otras enfermedades complejas, en la DMT2 se ha demostrado una clara predisposición genética. En la mayor parte de los sujetos que presentan una DMT2 típica, se espera la detección de influencias genéticas que no pueden definirse en términos mendelianos simples, así como también, de síndromes clínicos que son heterogéneos, incluso dentro de un mismo núcleo familiar, al igual que influencias importantes del ambiente. Las formas más comunes de la DMT2 son una consecuencia de un conjunto de genes mutantes, cada uno con una contribución pequeña, que junto con el ambiente y el envejecimiento, tendrían como efecto común final la enfermedad (Imamura y Maeda, 2011).

Los estudios asociados al genoma (GWAS, por sus siglas en inglés *Wide Genome Association Studies*,) han facilitado un aumento rápido y sustancial en el número de variantes de susceptibilidad genética confirmadas para la DMT2. Con las investigaciones realizadas se han encontrado 40 variaciones; este éxito ha creado la esperanza de que los resultados se traduzcan en una mejor atención clínica para el creciente número de pacientes con diabetes. Esto incluye la predicción del riesgo y la prevención de enfermedades posteriores, la farmacogenética, y el desarrollo de nuevos productos terapéuticos. Sin embargo, los locus genéticos identificados hasta ahora representan sólo una pequeña parte (aproximadamente el 10%) del total de factores genéticos hereditarios de la DMT2 (Imamura y Maeda, 2011).

Antes del inicio de los GWAS, la importancia de los factores genéticos en la etiología de la DMT2 había sido bien establecida a través de estudios realizados en grupos familiares (Groop y cols., 1996; Poulsen y cols., 1999). Estos estudios son usados para la identificación de variantes genéticas familiares que tienen un gran efecto y fue utilizado con éxito para descubrir varias mutaciones causales de las formas monogénicas de DM (Fajans y cols., 2001).

El gen de la insulina, el receptor de insulina y genes de transportadores de glucosa han sido considerados como factores importantes para el desarrollo de DMT2. Un pequeño grupo de pacientes con DMT2 (2-5%) presentan un tipo de diabetes que resulta de las mutaciones en un gen que da lugar a disfunción de las células β o, menos frecuentemente, resistencia a la insulina (Permutt y Hattersley, 2000).

Willer y cols. (2007) realizaron un análisis exhaustivo sobre más de 120 investigaciones de asociación de variantes genéticas con DMT2 y llegaron a la conclusión que hay muchas inconsistencias debido a la alta heterogeneidad etiológica a través de las poblaciones. Muchos de los reportes de asociación de un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) con la DMT2 involucran a genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos (gluconeogénesis, transporte y metabolismo de la glucosa, metabolismo y biosíntesis de glucógeno, glicólisis, transcripción de genes, transducción de señales y apoptosis).

El número de locus genéticos que predisponen a la diabetes, junto con la estimación de la magnitud de sus efectos, han sido evaluados en cientos de familias de diferentes grupos étnicos y raciales. El cromosoma 1q (en particular, 30 Mb estrechamente cercanas al centrómero) está clasificado junto a regiones en los cromosomas 10 y 20, como uno de los más fuertes y con mayor vinculación con la DMT2 (Prokopenko y cols., 2008). Dentro de esta región, 1q21-23 específicamente, los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) comunes que marcaron un bloque de desequilibrio de ligamiento están asociados con la DMT2, incluyendo el gen de la piruvato quinasa hepática (*PKLR*), en varias poblaciones derivadas de Europa. Variantes no codificantes en la región de *PKLR* probablemente alteran la expresión génica de uno o más genes. Los estudios sugieren una mayor producción de glucosa hepática y la reducción de la sensibilidad de los hepatocitos a la insulina, lo que

apunta a *PKLR* por sí solo, como el gen más probable relacionado con la patología en esa población (Wang y cols., 2002).

2.4 ENZIMA PIRUVATO QUINASA

La piruvato quinasa (PK) es una de las enzimas reguladoras de la ruta glucolítica, que cataliza la transferencia de un grupo fosforilo desde el fosfoenolpiruvato al ADP con la producción de una molécula de ATP y piruvato. Todas las isoenzimas de la piruvato quinasa se encuentran en el citosol y funcionan como un tetrámero. La PK en mamíferos tiene cuatro isoenzimas referidas como L, R, M₁, M₂ (Imamura, 1986) y están codificadas por dos genes. El gen *PKLR*, que codifica las isoenzimas L y R ubicado en el cromosoma 1q21 y el gen *PKM* que codifica las isoenzimas M₁ y M₂ localizado en el cromosoma 15q22. La piruvato quinasa L (PKL) se expresa predominantemente en hígado, pero está presente en riñón, intestino delgado y en las células β - pancreáticas, mientras que la expresión de la piruvato quinasa R (PKR) está restringida a los eritrocitos. La isoenzima M₁ (PKM₁) es expresada en el músculo esquelético, corazón y cerebro, mientras que la isoforma M₂ es expresada en los demás tejidos, en células transformadas y en células β del páncreas en mayor cantidad que la isoenzima L. La homocigosis para mutaciones del gen de la PKR y la resultante deficiencia de PK se han documentado en casos de anemia hemolítica, pero estas mutaciones son raras (Yamada y Noguchi, 1999).

El transcripto del gen *PKLR* sufre un corte y empalme (*splicing*) alternativo para generar la isoforma de las células rojas (exones 1 y 3-12) y la isoforma hepática (exones 2 y 3-12) (Figura 1A). Estas dos isoformas son controladas por diferentes promotores y muestran distinta distribución de tejidos. La transcripción del ARNm de

la PKL es activada por la insulina a través de elementos de respuesta a esteroides y además el gen sufre sobre expresión por efecto de la glucosa, a través de la activación del elemento de respuesta a carbohidratos presente en la región promotora de PKL (Yamada y Noguchi, 1999).

El gen *PKLR* se ubica cerca y corriente abajo, del gen del factor de transcripción HNF-1 α relacionado con diabetes tipo MODY (Wang y cols., 2000a; Shih y cols., 2001). En consecuencia, la PKL comparte la distribución de genes en tejidos que se conocen causan varios tipos de MODY (Fajans y cols., 2001), y está entre los genes que se expresan menos en pacientes MODY 1 y 3 (Wang y cols., 2000a; Wang y cols., 2000b; Shih y cols., 2001).

La piruvato quinasa también sufre regulación a nivel de su actividad dependiendo de los niveles de glucosa circulante (Figura 1B). La actividad de PKL en respuesta a la glucosa es controlada por reacciones de fosforilación-defosforilación, donde interviene la proteína quinasa A (PKA) activada por AMP (Da Silva y cols., 2000). Esta quinasa es blanco del fármaco metformina utilizado en los tratamientos de DM (Zhou y cols., 2001). Igualmente, la fructosa 1,6 bifosfato es un efector positivo de la actividad enzimática de PK, mientras que el ATP y la alanina son efectores negativos.

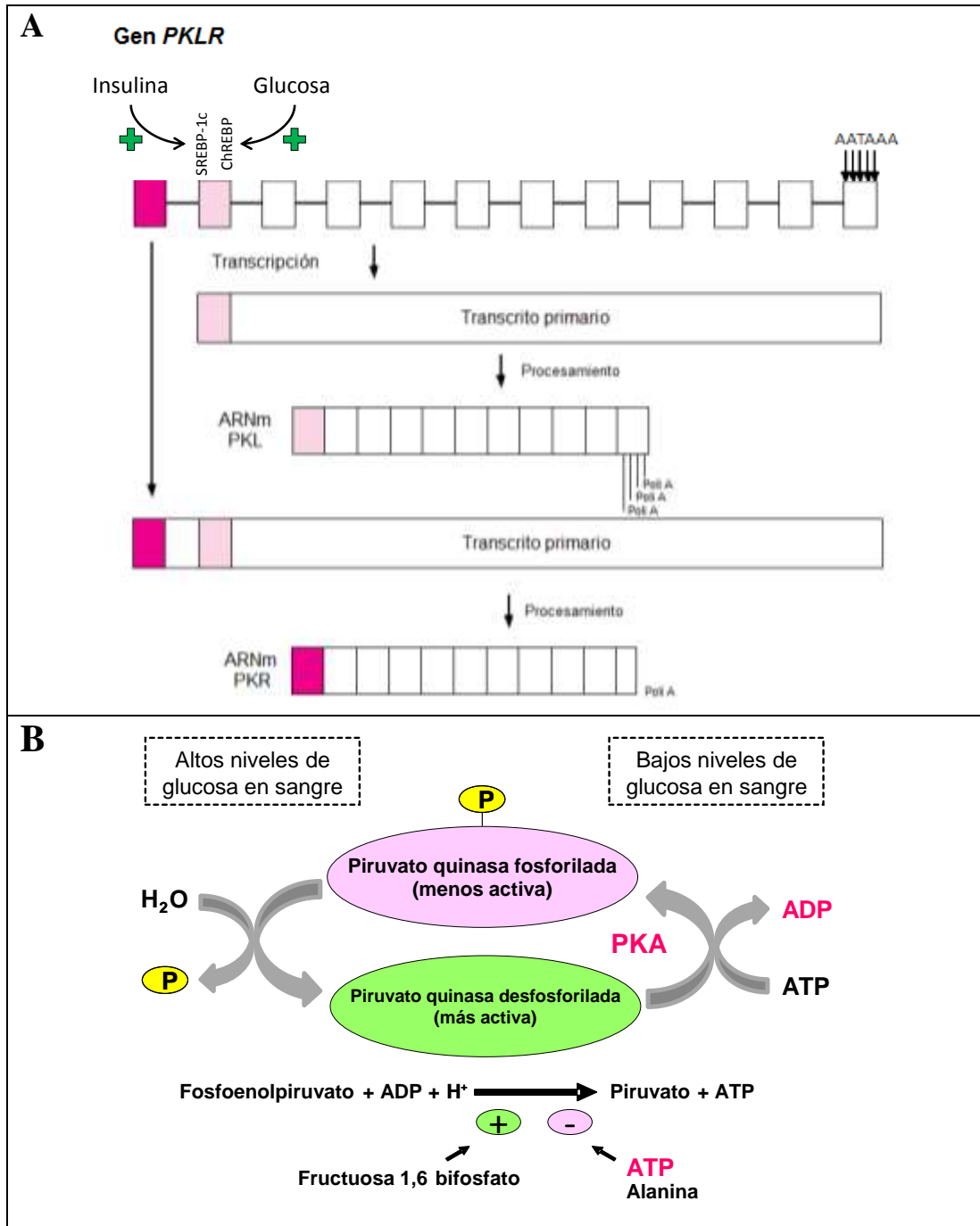


Figura 1. Regulación de la transcripción y actividad de piruvato quinasa. (A) Regulación de la transcripción y procesamiento del ARNm de PKL y R de rata usando promotores específicos de tejido. (Modificado de Yamada y Noguchi, 1999). **(B)** Regulación de la actividad de piruvato quinasa (Modificado de Malcovati y Valentini, 1982).

2.4.1 Gen de la piruvato quinasa L como factor probable en la etiopatogenia de la diabetes mellitus tipo 2

Para probar la hipótesis de que la variación en *PKLR* contribuye a la patogénesis de la diabetes, se estudiaron mutaciones en 16 personas diabéticas, caucásicos del norte de Europa, que fueron seleccionadas a partir de familias con fuerte evidencia de diabetes vinculada a variaciones en el cromosoma 1q21-q23. Se estudió la asociación de cinco SNPs, un polimorfismo de inserción-delección, y un polimorfismo de repetición de trinucleótidos en pacientes con DMT2 y sujetos control de la misma población. Seleccionaron las regiones promotoras del gen, los exones, los intrones circundantes y la región 3' no traducible. Concluyeron que, variantes en el gen *PKLR* están asociadas con el incremento del riesgo a sufrir diabetes (riesgo relativo ~1.8). Estos resultados sugieren un modelo de genes susceptibles, cada uno con contribución modesta. Aunque estos genes están expresados en hígado y páncreas, el medio por el cual estas variantes aumentan el riesgo, es incierto (Wang y cols., 2002).

Aunque se conoce que las mutaciones en los promotores tienen consecuencias funcionales importantes para la expresión genética, su análisis no es frecuente en el diagnóstico molecular, por lo que es necesario incrementar las investigaciones en este tópico, para determinar posibles vinculaciones de los cambios observados con diferentes patologías (De Vooght y Van Solinge, 2009).

En las últimas tres décadas, la ausencia del efecto de la insulina endógena, signo característico de la diabetes mellitus (DM), se ha relacionado con anomalías de expresión genética como alteraciones en la transcripción de un número importante de genes y en la síntesis de proteínas. Esto se evidenció, mediante la existencia de alteraciones cuantitativas de polipéptidos en leucocitos de pacientes con DM (Adán y cols., 2002). Entre los polipéptidos detectados en menor proporción en estos

pacientes, se encontró una región que corresponde al peso molecular esperado para la enzima piruvato quinasa (PK) de leucocitos (Yamada y Noguchi, 1999). Además, el gen de la PKL, como se indicó anteriormente, es uno de los factores para, si existe alteración, determinar la aparición de la enfermedad (Wang y cols., 2002). Sin embargo, no se han reportado estudios de secuencia que demuestren diferencias genéticas en correlación con la función bioquímica de la enzima.

Luis y Martínez (2004), evaluaron la actividad de PK en células sanguíneas de pacientes con DMT2 y controles sanos. La actividad se determinó mediante métodos espectrofotométricos y se relacionó con la glicemia y la hemoglobina A1c (Hb A1c). Los resultados evidenciaron menores promedios de las actividades específicas de la PK en los extractos de células sanguíneas totales y de una fracción enriquecida en leucocitos de los pacientes con DMT2 (43 ± 8 y 41 ± 4 U/mg de proteína, respectivamente) en relación a los obtenidos en el grupo control (53 ± 5 y 50 ± 6 U/mg de proteína, respectivamente). Además, se observó la existencia de dos grupos de pacientes, uno de ellos con actividades enzimáticas dentro del rango control, y el otro con actividades que permanecieron por debajo de dicho rango de forma independiente a la glicemia y Hb A1c. Esto sugiere la existencia de dos grupos de pacientes con DMT2 genéticamente diferentes, lo cual, constituye un dato importante que sirve de punto de partida para la evaluación de la enfermedad desde otras perspectivas.

En un estudio posterior, Cipriani y cols. (2006), se plantearon la hipótesis de que en pacientes con DM, existe una menor expresión de PK que puede relacionarse con alteraciones en los promotores proximales de los genes que codifican la síntesis de esta enzima. Para validar esta hipótesis, Lugo (2011), estudió los cambios en el promotor proximal de los genes de la PKL y PKM de pacientes con DMT2 en comparación con el correspondiente en donantes sanos. La secuencia del promotor proximal de cada gen fue amplificada por PCR utilizando cebadores específicos. Los análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de los

productos amplificados no mostraron diferencias entre pacientes y donantes sanos, mientras que los análisis de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP) permitieron identificar dos haplotipos alterados en la secuencia del promotor de PKM y uno en el promotor de PKL para el grupo diabético. Los cambios evidenciados pueden justificar, al menos en parte, la observación previa de menor actividad enzimática en pacientes con DMT2.

Los resultados de las diversas investigaciones hasta ahora realizadas, soportan la hipótesis de que variaciones en el gen de PKL en humanos pueden tener relación con la patogénesis de la DMT2. Esta relación se ve reflejada tanto en los estudios poblacionales que han correlacionado algunos polimorfismos en la secuencia del gen con personas que sufren DMT2, como en los ensayos funcionales *in vitro* donde se muestra que en pacientes con DMT2 la actividad enzimática de PK se encuentra alterada.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1 DISEÑO Y TIPO DE INVESTIGACIÓN

El presente estudio es cuantitativo, se plantea en el marco tanto exploratorio como descriptivo, correlacional y de corte transversal.

3.2 CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA, CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y RECOLECCIÓN DE DATOS

3.2.1 Muestras

Se trabajó con una muestra compuesta por 46 pacientes con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) codificados como DD y 30 donantes sanos sin antecedentes familiares de la enfermedad (DS), utilizados como control del estudio. Adicionalmente, se usó una muestra de 51 donantes sanos con antecedentes familiares de DMT2 (DSCA), a manera de comparar los diferentes parámetros estudiados con la población de DD y DS. Las muestras fueron seleccionadas a través de muestreo no probabilístico de tipo intencional. La toma de muestra de los pacientes con DMT2 se realizó en el Centro de Atención al Pie Diabético dirigido por el Dr. Carlos Ortiz, en la ciudad de Maracay, Estado Aragua, bajo consentimiento informado (Anexo A) para la extracción e investigación. Los datos aportados por los participantes se encuentran codificados bajo un número (garantía de anonimidad) y los documentos fueron firmados por el participante y el investigador.

Para los análisis correspondientes a sangre de cordón umbilical (SCU), se utilizaron 24 muestras de SCU, donadas por el Laboratorio Venezolano de Células Madre y provenientes de neonatos de la Maternidad Integral de Aragua, Maracay, estado Aragua. Estas muestras fueron trasladadas hasta la Sección de Bioquímica de Ácidos Nucleicos y Síntesis de Proteínas del Instituto de Investigaciones Biomédicas Dr. Francisco Triana Alonso (BIOMED-UC), donde fueron almacenadas.

3.2.2 Criterios de inclusión

Para el caso de las muestras de sangre periférica se incluyeron individuos de sexo femenino y masculino, con edades comprendidas entre 35 y 65 años. Los pacientes debían presentar diagnóstico clínico de DMT2, mientras que los individuos sanos con y sin antecedentes familiares de la enfermedad, no debían presentar dicho diagnóstico, ni tampoco presentar algún tipo de enfermedad endocrino-metabólica o inmunológica.

Las muestras de ADN provenientes de SCU se obtuvieron de mujeres con embarazos a término y que no presentaran ninguno de los siguientes factores: rotura de bolsa de líquido amniótico de más de 12 horas ni fiebre materna ($> 38^{\circ}\text{C}$), presencia de meconio en líquido amniótico, sufrimiento fetal, inmunización materna eritrocitaria (anticuerpos irregulares en suero de madre), anemia materna ($\text{Hb} < 10,5 \text{ g/dL}$), enfermedad infecciosa transmisible (virus de la inmunodeficiencia humana, citomegalovirus, sífilis, hepatitis B, hepatitis C, toxoplasmosis y rubeola).

3.2.3 Técnicas e instrumento de recolección de los datos de los donantes de sangre periférica

Para la recolección de los datos de la muestra se diseñó un formato de ficha clínica (Anexo B) que contiene toda la información necesaria para realizar el trabajo, como datos personales del participante, antecedentes personales y familiares patológicos, edad, tiempo de evolución de la enfermedad, complicaciones y tipo de tratamiento. Los datos fueron tomados a partir de las historias clínicas archivadas en el lugar donde se tomaron las muestras.

3.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.3.1 Obtención de la muestra de sangre periférica

La sangre fue obtenida de pacientes con DMT2 y donantes sanos, con y sin antecedentes familiares de la enfermedad, con ayuno previo entre 8 y 12 horas. La muestra fue tomada por un bioanalista con experiencia, se extrajeron 12 mL de sangre de una vena del antebrazo previa asepsia de la zona; 6 mL de sangre se colocaron en un tubo sin anticoagulante para realizar la medición de glicemia, colesterol total, HDL-colesterol, triglicéridos e insulina, mientras que los 6 mL restantes se dispensaron en dos tubos con anticoagulante EDTA, uno se utilizó para realizar mediciones de hematología completa y hemoglobina A1c (Hb A1c) y el otro se empleó en la extracción de ADN genómico y en la obtención del extracto proteico celular total.

3.3.2 Determinación de parámetros clínicos de laboratorio

A cada uno de los diferentes individuos participantes en el estudio se le realizaron las siguientes determinaciones: hematología completa, glicemia, colesterol total, HDL-colesterol, triglicéridos, insulina y Hb A1c.

La hematología completa se realizó en un analizador semi-automatizado marca Mindray BC-2300, el cual utiliza el principio de la impedancia para el conteo de glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas, y el método SFT para la determinación de hemoglobina.

La determinación de glicemia se realizó empleando el método de glucosa-oxidasa (marca Chemroy), los niveles de colesterol total y HDL-colesterol se determinaron empleando el método enzimático CHOP-PAP (marca Bioscience) y para la determinación de triglicéridos se utilizó el método enzimático G.P.O TRINDER (marca Bioscience), siguiendo las instrucciones del fabricante en cada caso.

Para el análisis cuantitativo de la insulina se utilizó el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (E.L.I.S.A) tipo sándwich (marca D.R.G), siguiendo las instrucciones del fabricante. Mientras que la determinación de Hb A1c se realizó a través del método de cromatografía de baja presión, utilizando un analizador *DiaSTAT Hemoglobin A1c (BIO-RAD)*.

Los resultados de las determinaciones de las pruebas de bioquímica sanguínea fueron entregados a los participantes de forma gratuita.

3.3.3 Extracción y análisis del ADN

La extracción del ADN se realizó utilizando el método de precipitación salina reportado por Sambrook y Rusell (2001). A 300 μL de sangre completa se le agregaron 900 μL de solución de lisis de células rojas (Tris-HCl 20 mM pH 7,6), se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Posterior al tiempo de incubación, se realizó un paso de centrifugación a 14.000 rpm por 20 s, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió con 600 μL de solución de lisis fría (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8, SDS 0,1%), se mezcló rápidamente por vórtex y se añadieron 3 μL de Proteinasa K (20 mg/mL) y se incubó a 55°C por 3 h. Culminado este tiempo, se agregaron 3 μL de RNAsa (4 mg/mL) y se incubó por 15 min a 37°C, seguidamente se añadieron 200 μL de solución de acetato de potasio (conteniendo 60% de acetato de potasio 5 M y 11,5% de ácido acético glacial). Se centrifugó a máxima velocidad por 3 min a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un tubo que contenía 600 μL de isopropanol. Luego de mezclar por inversión, el ADN precipitado se recuperó por centrifugación a 14.000 rpm por 1 min. El sedimento se lavó con etanol al 70% y se repitió el paso de centrifugación, se descartó el sobrenadante y los restos de alcohol se evaporaron en una microcentrífuga al vacío (*speed vac*, Savant DNA 120) durante 10 min. El ADN se resuspendió en 100 μL de agua libre de nucleasas y se almacenó a -20°C. Todos los pasos de centrifugación se realizaron empleando la microcentrífuga Eppendorf® 5424.

La concentración y calidad de los ácidos nucleicos se determinó por medición de absorbancia a 260 y 280 nm (espectrofotómetro Beckman DU® 650) y mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8% [en tampón Tris-Borato- EDTA (TBE); 90 mM, 90 mM y 2 mM, respectivamente, pH 8,3], empleando *Lambda DNA Hind III Marker* (Promega) como marcador de pares de bases (MPB). La migración electroforética se realizó usando TBE como tampón y a voltaje constante (65V) en todos los casos. Las bandas de ácidos nucleicos se visualizaron por tinción con

bromuro de etidio según técnicas estándar (Ogden y Adams 1987). Las imágenes de los patrones electroforéticos obtenidas por transiluminación UV, se digitalizaron en un GelDoc 1000 (*BIO-RAD*) y se analizaron con el programa *Multianalyst* (*BIO-RAD*).

3.3.4 Amplificación de la región promotora del gen *PKLR* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se realizó la amplificación de la región promotora del gen *PKLR* mediante PCR a partir de muestras de ADN de sangre periférica y SCU, para lo cual se utilizaron las siguientes condiciones, optimizadas previamente por González y cols. (2009), empleando el estuche comercial *Go Taq Flexi DNA Polimerase*[®] (*Promega corp, USA*): MgCl₂ 1 mM, desoxinucleótidos trifosfato 150 μM, oligonucleótidos directo y reverso 1 μM cada uno, *Taq* ADN polimerasa 0,02 U/μL, ADN genómico 1,5 ng/μL, incubados en el tampón de reacción *colorless Go Taq*[™] (1X: Tris-HCl 50 mM pH 9,0; NaCl 50 mM), en un volumen final de 50 μL.

Se utilizó la pareja de cebadores PKL51 (cebador directo 5'-CTTGGGTTCAAACATGTAGG-3') y PKL32 (cebador reverso 5'-CCCTTCTTACCTCCTGGAG-3'), diseñados previamente en el laboratorio (Cipriani y cols., 2006), para la amplificación de un fragmento de 618 pb, que corresponde a la región promotora del gen *PKLR*, desde la posición -469 hasta +149, abarcando una porción del promotor distal, el promotor proximal y basal, la región 5' no traducible y 149 pb de la región codificante. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador (Thermo Pxe 0.2) programado para 36 ciclos. El primer ciclo consistió en: desnaturalización a 95°C por 5 min, hibridación a 60°C por 1 min y síntesis a 72°C por 1 min. Los 34 ciclos posteriores consistieron en: desnaturalización a 95°C por 1 min, hibridación a 60°C por 1 min y síntesis a 72°C por 1 min. En el último

ciclo se realizó una desnaturalización a 95°C por 1 min, una extensión a 72°C por 7 min y enfriamiento a 4°C por 10 min. Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en tampón TBE. Las condiciones electroforéticas y su posterior análisis se realizaron como fue indicado anteriormente.

3.3.5 Análisis de Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla (SSCP)

Este análisis se realizó de acuerdo a procedimientos reportados (Gasser y cols., 2006) con pequeñas modificaciones. Con la finalidad incrementar la sensibilidad de la técnica, se procedió a digerir el fragmento de 618 pb, previamente amplificado por PCR, con la enzima *Rsa* I (*Promega Corp.*, USA), la cual tiene una diana de restricción en la posición 221 pb de la secuencia estudiada y genera dos fragmentos, uno de 221 pb y otro de 397 pb. Los ensayos de restricción se realizaron incubando 15 µL de producto de PCR con 1 U de enzima, en un volumen final de 20 µL bajo las condiciones iónicas específicas de la enzima (Tris-HCl 10 mM pH 7,9; MgCl₂ 10 mM, NaCl 50 mM, DTT 1 mM) a 37°C durante dos horas. Los productos de la digestión enzimática se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en tampón TBE.

Luego de verificar la digestión del fragmento, se tomó un volumen de 10 µL de la reacción de restricción y se mezcló con 8 µL de tampón desnaturalizante (NaOH 10 mM, formamida 95%, azul de bromofenol 0,01% y xilencyanol 0,01%). Las muestras se desnaturalizaron en un termociclador (Thermo Pxe 0.2) a 95°C durante 12 min y se evitó la renaturalización de las mismas mediante enfriamiento inmediato a 0°C en baño de hielo. Las muestras (18 µL) se analizaron en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes preparados en tampón TBE, con poliacrilamida al 7%. La electroforesis se llevó a cabo usando TBE como tampón de migración, a 4°C y a corriente constante, 24 mA los primeros 30 min y luego 5 mA el resto de la

migración, durante 24 horas. Para la visualización de las bandas se empleó la tinción con nitrato de plata (An y cols., 2009) y las imágenes digitalizadas (GelDoc 1000, *BIO-RAD*) se analizaron mediante densitometría computarizada usando el programa *Multianalyst* (*BIO-RAD*).

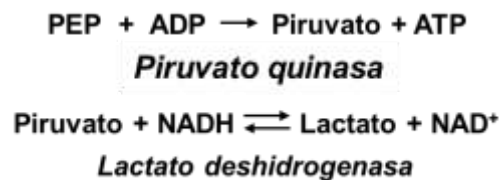
3.3.6 Determinación de la actividad enzimática de PK

3.3.6.1 Preparación del extracto proteico celular

Se tomó 1 mL de sangre completa (periférica y de cordón umbilical), y se centrifugó a 5.000 rpm por 5 min para separar el plasma, el paquete celular se lavó con tampón fosfato salino (Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1 mM, NaCl 140 mM, KCl 5 mM, pH 7,4), y se almacenó a -80°C hasta su uso. El paquete celular obtenido se sometió a homogenización con un pistón (Douncer) de 2 mL y un volumen de 1 mL aproximado de Hepes-KOH 50 mM (pH 7,5) aplicando un número de 15 abrasiones por muestra; posteriormente se centrifugó a 14.000 rpm por 20 min (a 4°C), y el sobrenadante obtenido (extracto celular total) se dividió en alícuotas de 150 μL que se almacenaron a una temperatura de -80°C hasta su uso. Los pasos de centrifugación se realizaron empleando la microcentrífuga Eppendorf® 5424. La concentración de proteínas totales en los extractos celulares, se determinó utilizando el método de Lowry (Lowry y cols., 1995) para lo que se construyó una curva de calibración empleando como patrón albúmina de suero de bovino.

3.3.6.2 Ensayos de actividad de piruvato quinasa

La medición se hizo utilizando una enzima indicadora. El piruvato formado a partir del fosfoenolpiruvato (PEP), por acción de la PK, es reducido a lactato consumiendo NADH en una segunda reacción catalizada por un exceso de lactato deshidrogenasa.



Como el NADH se diferencia del NAD^+ por su capacidad de absorber luz a 340 nm, se observó una disminución en la absorbancia de la mezcla a medida que progresó la reacción. En condiciones de saturación de la PK, la velocidad de disminución de la absorbancia ($\Delta A_{340}/\text{min}$) es proporcional a la actividad enzimática absoluta presente en el extracto celular (Malcovati y Valentini, 1982).

Los ensayos de actividad enzimática se realizaron bajo las siguientes condiciones: adenosin difosfato (ADP) 4 mM, NADH 0,5 mM, fosfoenolpiruvato (PEP) 25 mM, lactato deshidrogenasa (LDH) 0,022 U/L, y se emplearon diferentes cantidades de extracto para establecer la cantidad óptima. Los diferentes componentes se incubaron bajo condiciones iónicas establecidas (Hepes KOH 20 mM pH 7,5; MgCl_2 10 mM; KCl 50 mM) a una temperatura de 25°C. La cinética de reacción se siguió por medidas de absorbancia a 340 nm (espectrofotómetro Beckman DU® 650) cada minuto y a partir de 5 segundos de comenzar la reacción después de agregar el extracto celular. La reacción se siguió hasta observar medidas constantes de absorbancia a 340 nm.

A partir de los cambios de absorbancia registrados a 340 nm por min y empleando el coeficiente de extinción molar del NADH ($6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y el espesor de la celda donde se midió la absorbancia (1 cm), se calculó la actividad enzimática de cada muestra.

Actividad enzimática de PK = Piruvato formado = NADH consumido = $(\Delta A_{340}/\text{min})/(6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm})$.

Para la cuantificación respectiva se definió una unidad de actividad enzimática (U) como: la cantidad de enzima real que cataliza la formación de un nmol de piruvato y por ende promueve el consumo de un nmol de NADH por minuto a 25°C .

Las comparaciones de actividad enzimática promedio y por muestra individual se realizaron con el parámetro de actividad específica:

Actividad específica: U/mg de proteínas en el extracto celular.

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Para el análisis de las variables cuantitativas se utilizaron las medidas de tendencia central como la media aritmética y la desviación estándar. Se evaluó la asociación de los polimorfismos y la actividad de PK con la diabetes mellitus mediante el cálculo de las *odds ratios* (OR) y del riesgo relativo, empleando el programa GraphPad InStat. Para evaluar la asociación de los polimorfismos y de la actividad enzimática de PK con los parámetros clínicos de laboratorio se aplicaron la Prueba de Fisher's, ANOVA, prueba de múltiples comparaciones de Tukey, y t de Student.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Características generales de las muestras sanguíneas

Las muestras de sangre periférica obtenidas de las diferentes poblaciones en estudio (DD, DS y DSCA), fueron analizadas para determinar algunos parámetros clínicos considerados importantes dentro del diagnóstico de la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), como se indica en Materiales y Métodos 3.3.2. Las edades de los participantes estuvieron comprendidas entre 35 y 65 años, con un promedio de 49 ± 15 años para DS, un promedio de 46 ± 11 años para DSCA y un promedio de 57 ± 9 años para DD, sin diferencias significativas entre las edades de los diferentes grupos. El sexo femenino fue el predominante en los grupos de DS y DSCA, y en DD el número de individuos de ambos sexos fue semejante (Tabla 1).

La glicemia en ayunas y la Hb A1c fueron los valores sanguíneos considerados para la correcta clasificación de los donantes, ya que representan los parámetros internacionales más relevantes para el diagnóstico de la diabetes. Los promedios de la glicemia en ayunas fueron de 90 ± 9 mg/dL para DS, 90 ± 10 mg/dL para DSCA y 195 ± 87 mg/dL para DD. Adicionalmente, se obtuvieron valores de Hb A1c de $5,2 \pm 0,5$ % en DS; $5,0 \pm 0,9$ % en DSCA y $8,9 \pm 2,5$ % en DD (Tabla 1), y ambos parámetros fueron significativamente diferentes entre los DD y el control de DS, e igualmente entre los DD y los DSCA ($P < 0,05$). Estos parámetros cumplieron con los criterios de la Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD) y la Asociación Americana de Diabetes (ADA) (ALAD, 2013; ADA, 2016) en lo concerniente a la clasificación de los individuos en donantes sanos sin diabetes y donantes con DMT2, además del diagnóstico médico previamente establecido.

Tabla 1. Características clínicas de la población donante de sangre periférica.

Parámetro	Donantes sanos sin antecedentes familiares de DM	Donantes sanos con antecedentes familiares de DM	Donantes diabéticos
Edad	49 ± 15	46 ± 11	57 ± 9
Sexo (F/M)	23/7	34/17	24/22
Glicemia (mg/dL)	90 ± 9	90 ± 10	*195 ± 87
Hb A1c (%)	5,2 ± 0,5	5,0 ± 0,9	*8,9 ± 2,5
Insulina (μUI/mL)	9,8 ± 2,6	9,0 ± 2,9	♦8,2 ± 1,7
Colesterol (mg/dL)	197 ± 40	188 ± 44	177 ± 50
HDL-c (mg/dL)	50 ± 9	48 ± 9	46 ± 11
LDL-c (mg/dL)	119 ± 39	108 ± 39	98 ± 46
VLDL-c (mg/dL)	26 ± 10	27 ± 10	32 ± 12
Triglicéridos (mg/dL)	149 ± 73	141 ± 78	159 ± 71

*Prueba de Fisher: significativamente diferentes a los demás valores en cada caso (P < 0,05).

♦Prueba de Fisher: significativamente diferentes al valor de DS (P < 0,05).

Los promedios de los parámetros clínicos como colesterol, HDL-colesterol, LDL-colesterol, VLDL-colesterol y triglicéridos, no mostraron diferencias significativas entre los tres grupos. En el caso de los niveles de insulina, hay diferencias significativas (P < 0,05) entre los DD y los DS, pero los DSCA mostraron un valor intermedio que no es significativamente diferente al de DS y DD (Tabla 1). Los DD tienen un nivel de insulina en promedio significativamente más bajo (8,2 ± 1,7 μUI/mL) que los DS (9,8 ± 2,6 μUI/mL), a pesar de que algunos reciben tratamiento con insulina exógena.

4.2 Extracción y análisis del ADN genómico

El ADN de las muestras de sangre periférica y de cordón umbilical, se obtuvo empleando el método de precipitación salina como se indica en Materiales y Métodos

3.3.3. Las muestras sanguíneas fueron una buena fuente de ADN y se obtuvieron valores alrededor de los 170 µg/mL del ácido nucleico.

La calidad del ADN obtenido en cuanto a su pureza se determinó por la relación de absorbancia a 260 nm y 280 nm (A_{260}/A_{280}). Los valores promedio de las relaciones de absorbancia para el ADN extraído fueron $1,72 \pm 0,09$ para DD; $1,61 \pm 0,06$ para DS; $1,66 \pm 0,09$ para DSCA y $1,63 \pm 0,13$ para SCU, estando alrededor del límite inferior del rango considerado como óptimo para un ADN de buena calidad (1,7 a 1,9) (Puerta y Urueña, 2005).

La integridad del ADN extraído de las diferentes muestras se comprobó por electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. En la Figura 2 se muestran algunos ejemplos del perfil electroforético del ADN obtenido para las muestras de DS, DSCA, DD y SCU.

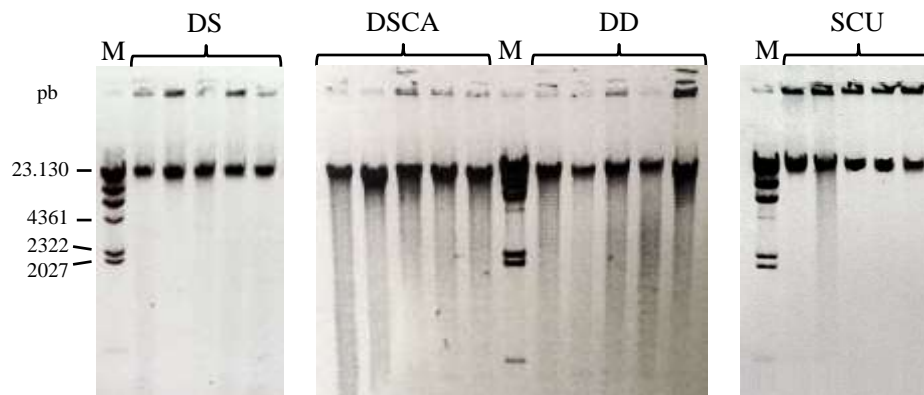


Figura 2. Perfil del ADN en electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. El ADN fue extraído de las muestras de DS, DSCA, DD y SCU, como se indica en Materiales y Métodos (3.3.3) y luego se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. M= Marcador *Lambda DNA/Hind III* (Promega Corp, USA).

Se detectó una banda principal en todos los casos que migró en una posición superior a 23 Kb (migración típica del ADN de alto número de pares de bases) y no se observaron aparentes productos secundarios de menor tamaño, lo que indicó la

obtención de un ADN de buena calidad para los estudios de amplificación posteriores.

4.3 Amplificación de la región promotora del gen *PKLR*

Se realizó la amplificación de la región promotora del gen *PKLR* mediante PCR de las muestras de ADN de sangre periférica y de cordón umbilical, para lo cual se utilizaron condiciones optimizadas previamente (González y cols., 2009), las cuales se describieron en Materiales y Métodos 3.3.4. Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, empleando “*Bench Top 100 bp DNA Ladder*” (Promega Corp, USA) como marcador de pares de bases, obteniendo la amplificación de fragmentos con el tamaño esperado en las muestras empleadas (618 pb; Figura 3).

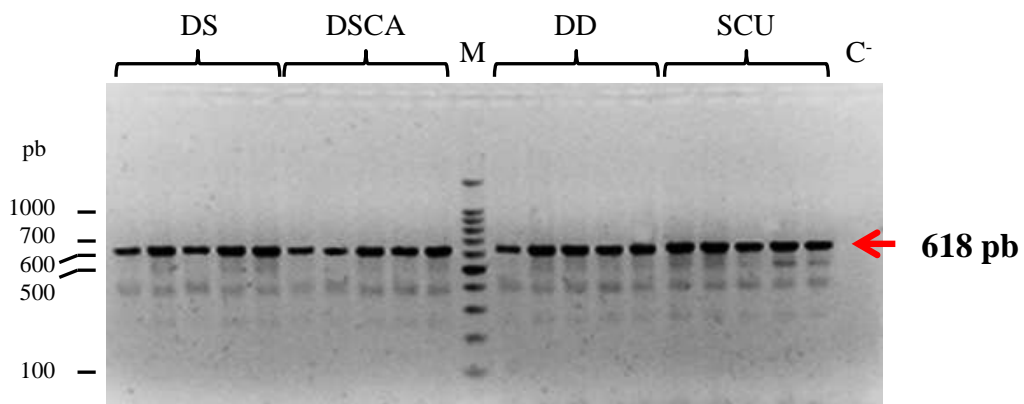


Figura 3. Amplificación de la región promotora del gen *PKLR* mediante PCR. Se obtuvieron fragmentos con la longitud esperada (618 pb) en la totalidad de las muestras. Se observó la amplificación de productos secundarios inespecíficos en todas las muestras analizadas (DS, DSCA, DD y SCU). M: Marcador “*Bench Top 100 bp DNA Ladder*” (Promega Corp, USA). C⁻: control negativo.

Para eliminar los productos secundarios inespecíficos, se procedió a la optimización de las condiciones de PCR empleando el estuche comercial *Go Taq*

Flexi DNA Polimerase[®] (Promega corp, USA), variando las concentraciones de: pareja de oligonucleótidos PKL5132 (0,13 a 1,0 μ M), ADN (0,03 a 3,0 ng/ μ L) e iones magnesio (1 a 2 mM). En la Figura 4A se observa la estandarización de la concentración de oligonucleótidos, habiendo utilizado en el ensayo 0,13; 0,25; 0,5; 0,75 y 1 μ M. En la Figura 4B se muestra la estandarización del ADN con concentraciones de 3; 1,5; 1; 0,75; 0,5; 0,38; 0,25; 0,13; 0,06 y 0,03 ng/ μ L; en el caso de los iones magnesio (Figura 4C) se emplearon 1; 1,25; 1,5; 1,75 y 2 mM para seleccionar la concentración óptima.

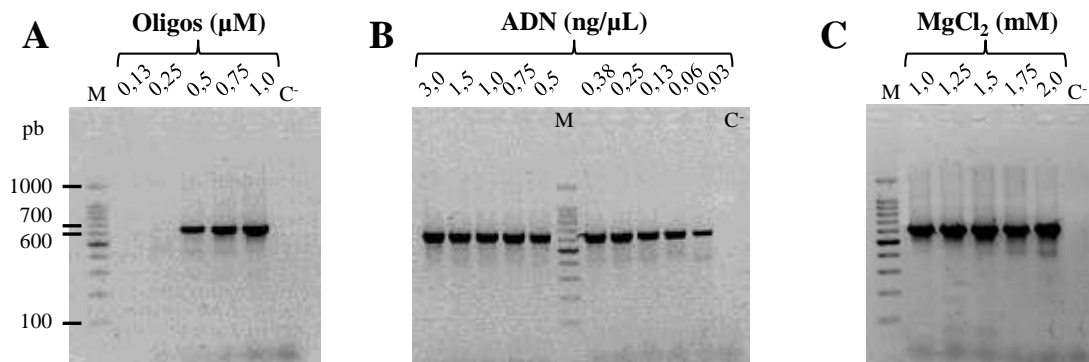


Figura 4. Estandarización de la reacción de amplificación del fragmento de 618 pb correspondiente a la región promotora del gen *PKLR* con diferentes concentraciones de oligonucleótidos, ADN y magnesio. Los productos de la reacción de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %. La reacción de PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: A. Utilizando el intervalo de concentraciones indicadas de oligonucleótidos y 1,5 ng/ μ L de ADN. B. Utilizando 0,5 μ M de oligos y las concentraciones de ADN indicadas. C: Utilizando 0,5 μ M de oligos; 0,5 ng/ μ L de ADN y las concentraciones indicadas de magnesio. M: Marcador “*Bench Top 100 bp DNA Ladder*” (Promega Corp, USA). C: control negativo.

Los criterios de selección de concentraciones óptimas fueron: intensidad de la banda correspondiente al producto esperado y ausencia de productos secundarios. Se determinó que la mínima concentración de oligonucleótidos para alcanzar la máxima cantidad de producto amplificado de 618 pb sin la formación de productos inespecíficos fue 0,5 μ M (Figura 4A) y la de ADN fue alrededor de 0,5 ng/ μ L (Figura

4B). En cuanto a la concentración de iones magnesio, se determinó que la condición inicial de 1 mM es la óptima (Figura 4C). Las condiciones finales de PCR donde se obtuvo la mayor cantidad de producto sin reacciones secundarias fueron: $MgCl_2$ 1mM, dNTP mix 150 μ M, oligonucleótidos directo y reverso 0,5 μ M cada uno, *Taq* ADN polimerasa 0,02 U/ μ L, ADN genómico 0,5 ng/ μ L.

Una vez optimizadas las condiciones de PCR, se procedió a amplificar el fragmento correspondiente al promotor del gen *PKLR* en las 127 muestras de sangre periférica y 24 muestras de cordón umbilical. En la Figura 5 se muestra un ejemplo de las amplificaciones de las diferentes poblaciones, obteniéndose el producto esperado de 618 pb, con buena intensidad de bandas y en ausencia de productos secundarios.

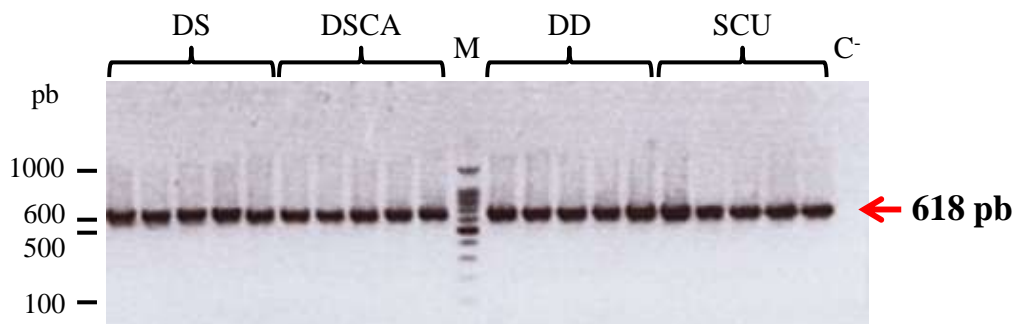


Figura 5. Amplificación de la región promotora del gen *PKLR* por PCR con las condiciones optimizadas. Se obtuvieron fragmentos con la longitud esperada (618 pb) en la totalidad de las muestras de DS, DSCA, DD y SCU. El tamaño de los segmentos amplificados fue uniforme, y no se observó la amplificación de productos secundarios inespecíficos. M: Marcador “*Bench Top 100 bp DNA Ladder*” (Promega Corp, USA). C: control negativo.

4.4 Análisis por SSCP de la región promotora amplificada del gen *PKLR* en muestras de sangre periférica y de cordón umbilical

Para determinar las posibles variaciones en la secuencia del promotor del gen *PKLR*, los productos de PCR (618 pb) de cada una de las muestras (DS, DSCA, DD y

SCU) fueron analizados por el método de Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla (SSCP, por sus siglas en inglés *Single Strand Conformation Polymorphism*). Este método detectó cambios en la secuencia de ADN por diferencias en la migración de las bandas de ácidos nucleicos desnaturalizadas y visualizadas con nitrato de plata en un gel de poliacrilamida al 7% (Materiales y Métodos 3.3.5). En la Figura 6 se muestra un resumen de los resultados obtenidos.

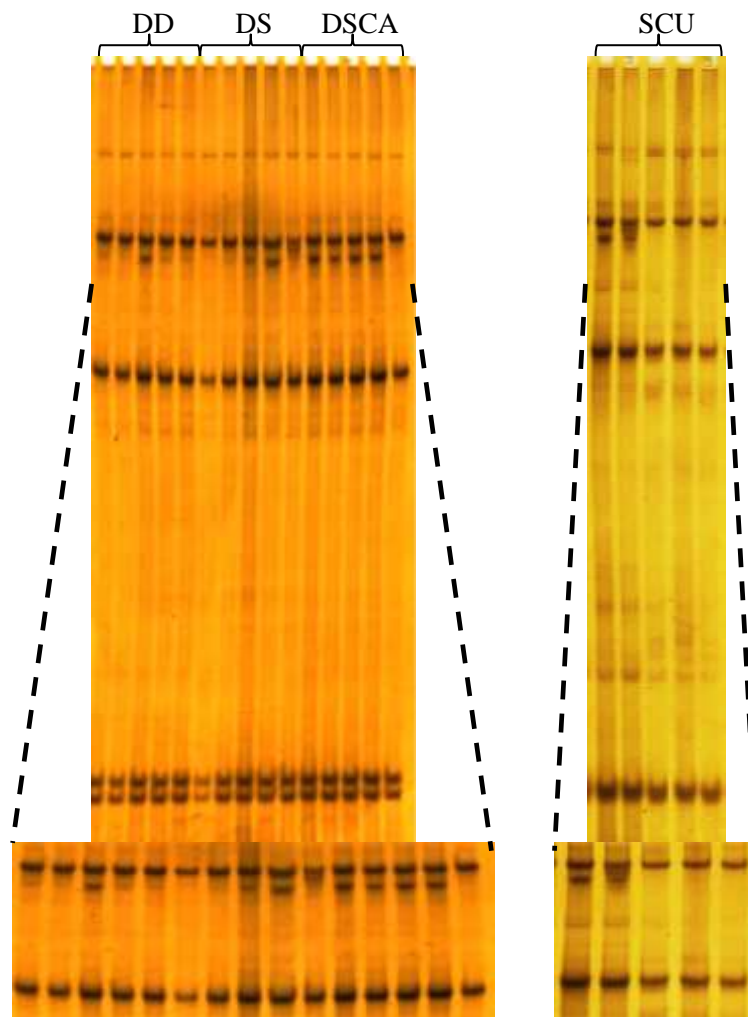


Figura 6. Análisis por Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla (SSCP) de los productos de PCR (618 pb) de DD, DS, DSCA y SCU. Patrones de migración en gel de poliacrilamida al 7%. Las bandas de ácidos nucleicos fueron visualizadas por tinción con nitrato de plata. La población total mostró tres patrones diferentes de migración.

Todas las muestras de las diferentes poblaciones estudiadas (DS, DSCA, DD y SCU) mostraron dos patrones generales de migración (patrón de tres bandas principales y patrón de dos bandas principales), un tercer patrón (cuatro bandas principales) se observó solo en DS y en SCU (Figura 6).

El análisis general por SSCP permitió hacer un estudio más detallado de cada muestra por densitometría computarizada de los geles de poliacrilamida, para determinar con mayor exactitud los diferentes patrones. Con este análisis, se calcularon los porcentajes de área y distancias de migración de cada banda principal en los distintos patrones de migración. Dentro de cada patrón, no se observaron diferencias significativas de migración o en el porcentaje de área de las bandas. Los tres perfiles de migración y sus respectivas densitometrías (patrón 1: tres bandas; patrón 2: dos bandas; patrón 3: cuatro bandas), se observan en la Figura 7.

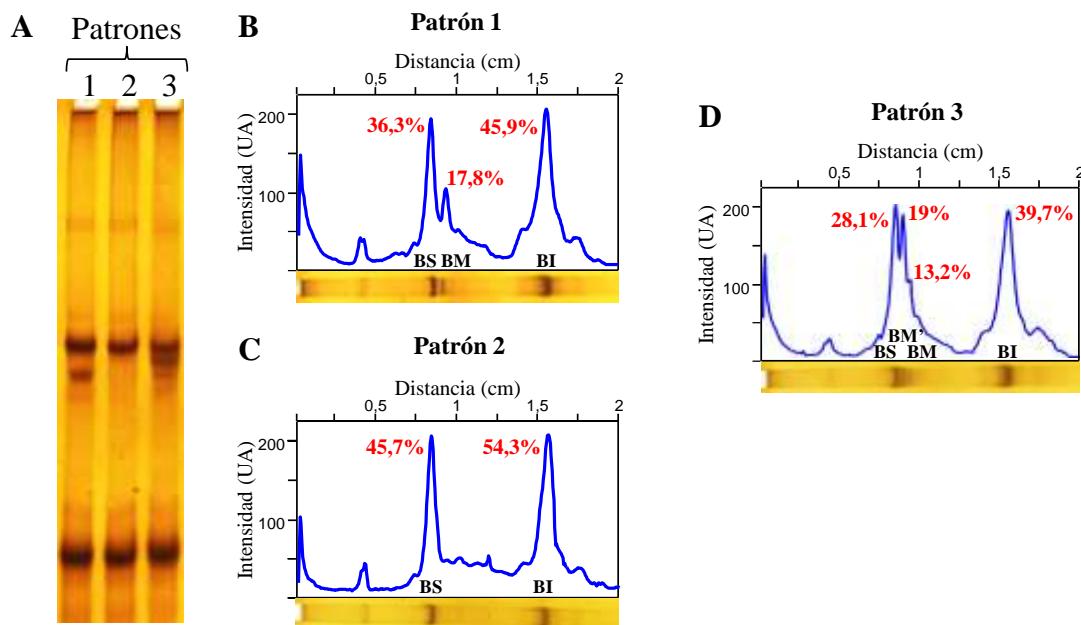


Figura 7. Perfiles de migración por SSCP y análisis densitométrico de las muestras (DD, DS, DSCA y SCU). **A)** Patrones de migración en gel de poliacrilamida al 7 % (1→3). **B→D)** Análisis densitométrico de cada patrón. Se señalan los porcentajes de área de cada banda (Superior: BS; Medias: BM y BM'; Inferior: BI). Todos los patrones corresponden a muestras de DS.

Los resultados del número y porcentajes de muestras en la población para cada patrón detectado por SSCP se observan en la Tabla 2 y Figura 8. Claramente los resultados revelaron diferencias entre la población diabética y las poblaciones de donantes sanos y los neonatos donantes de SCU.

Tabla 2. Prevalencia de variaciones en el promotor de *PKLR* según el método de SSCP.

Patrón SSCP	Número de muestras				% de individuos			
	DD	DS	DSC A	SCU	DD	DS	DSC A	SCU
1	18	22	32	12	39	73	63	50
2	28	6	19	11	61	20	37	46
3	0	2	0	1	0	7	0	4
Total	46	30	51	24	100	100	100	100

Los amplicones de 618 pb fueron analizados en geles de poliacrilamida según la técnica de SSCP. Se determinaron tres patrones diferentes en la población total.

En los DD el patrón 2 de SSCP de dos bandas separadas y bien definidas (Figura 7C) fue el más prevalente, ya que en el 61% de los individuos se detectó dicho patrón (Tabla 2 y Figura 8), mientras que el 39% restante presentó el patrón 1 de tres bandas (Figura 7B); este último fue el más común en la población de DS (73%), DSCA (63%) y en SCU (50%), y en segundo lugar estuvo el patrón 2 de SSCP [DS (20%), DSCA (37%) y en SCU (46%)]. Los DS y SCU fueron las únicas poblaciones que presentaron el patrón 3 de SSCP de cuatro bandas (Figura 7D) con una prevalencia de 7% y 4%, respectivamente (Tabla 2 y Figura 8).

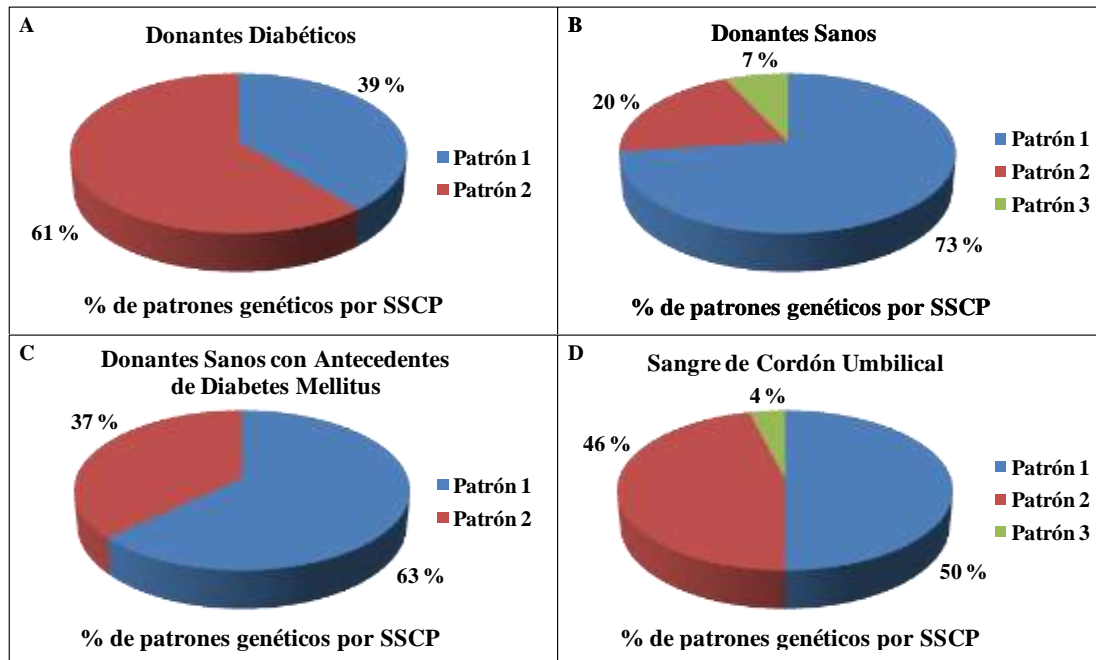


Figura 8. Distribución porcentual de las variaciones en el promotor de *PKLR* según la técnica Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla en las poblaciones de DD, DS, DSCA y SCU. Los amplicones del promotor del gen *PKLR* fueron analizados en geles de poliacrilamida. Se determinaron tres patrones diferentes como se muestra en la Tabla 2 y Figuras 6 y 7.

Los resultados del análisis por SSCP señalaron que debían existir al menos tres variantes genéticas en el promotor de *PKLR*, y dos de ellas, correspondientes a los patrones 1 y 2, se encontraron en todas las poblaciones estudiadas. Igualmente, los resultados indicaron que la metodología desarrollada es aplicable a muestras de SCU, ya que guardaron relación con los datos obtenidos en sangre periférica.

Para evaluar la asociación de los polimorfismos en *PKLR* con la DMT2 se construyeron las tablas de contingencia correspondientes y se calcularon las *odds ratios* (OR) de cada patrón de SSCP para cuantificar la asociación. Los resultados del cálculo de las OR para cada patrón de SSCP comparando la población de DD y DS se muestran en la Tabla 3 y las OR en relación a DSCA comparados con DS y DD se muestran en la Tabla 4.

Tabla 3. Análisis estadístico del riesgo a la diabetes mellitus en función de los patrones de SSCP observados en DD y DS.

Patrón SSCP	DS (n: 30)	DD (n: 46)	DD-DS		
			OR	IC del 95%	P
1	22	18	0,23	0,09 - 0,63	0,0048
2	6	28	6,22	2,13 - 18,19	0,0008
3	2	0	0,19	0,0086 - 4,07	0,4915

El patrón de dos bandas observado en el análisis por SSCP (patrón 2) mostró tener una alta asociación con la diabetes mellitus ($P= 0,0008$), y la OR indica que los donantes que presentaron este patrón tienen un riesgo aumentado a la enfermedad de 6,22 veces respecto al grupo control de DS (Tabla 3). Al mismo tiempo se observa que el patrón 1 está asociado a la población de DS ($P= 0,0048$) y los individuos que tienen este patrón poseen 4,35 veces ($1/OR = 1/0,23 = 4,35$) menos riesgo a sufrir la patología. El patrón 3 no mostró diferencias significativas entre las dos poblaciones ($P= 0,4915$).

Puesto que se determinó que el patrón 2 de SSCP está asociado a la DMT2, se analizó el riesgo de DSCA a sufrir la patología en comparación con DS y DD. En la Tabla 4 se observa que para cada patrón de SSCP no hay diferencias significativas entre los DS y los DSCA ($P > 0,1$ en cada caso); es decir, la población de DSCA guarda similitud con los DS. Al comparar los patrones de SSCP de los DD con los DSCA, se observan diferencias significativas en los dos patrones presentes en ambas poblaciones ($P= 0,0257$). Al igual que la comparación realizada con la población de DS (Tabla 3), el patrón 2 de SSCP está asociado a la población diabética en comparación con la población de DSCA, y los individuos con dicho patrón tienen un

riesgo de 2,63 veces mayor a sufrir la enfermedad. El riesgo u OR es menor (2,63 veces) a la comparación realizada con la población sana sin antecedentes (6,22 veces) (Tabla 3), lo que significa que la población diabética tiene mayor similitud o menor diferencia con la población de DSCA que con la población de DS. Igualmente, el patrón 1 está asociado a la población de DSCA, y los individuos con dicho patrón tienen 2,63 veces menos riesgo ($1/OR = 1/0,38 = 2,63$) a sufrir de diabetes mellitus en comparación con los DD. Por lo tanto, al compararse con la población diabética, los DSCA tienen más riesgo a sufrir la patología que los DS [2,63 veces menos riesgo para DSCA y 4,35 menos riesgo para DS (Tabla 3)]. El patrón 3 de SSCP no fue detectado en estas poblaciones (DSCA y DD).

Tabla 4. Análisis estadístico del riesgo a la diabetes mellitus en función de los patrones de SSCP observados en DSCA en relación a DD y DS.

Patrón SSCP	DS (n: 30)	DD (n: 46)	DSCA (n: 53)	DSCA-DS			DD-DSCA		
				OR	IC del 95%	P	OR	IC del 95%	P
1	22	18	32	0,61	0,23-1,65	0,4645	0,38	0,17-0,87	0,0257
2	6	28	19	2,38	0,82-6,85	0,1372	2,63	1,15-5,95	0,0257
3	2	0	0	0,11	0,0051-2,39	0,1343			

4.5 Actividad enzimática de piruvato quinasa

El extracto proteico celular total conteniendo a la piruvato quinasa (PK) de cada una de las muestras se obtuvo mediante homogeneización del paquete globular como se indica en Materiales y Métodos 3.3.6.1. La determinación de proteínas se realizó empleando el método de Lowry y se obtuvo una concentración promedio de

proteínas, en un volumen final de 1 mL, de $98 \pm 20 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ para los DD, $88 \pm 12 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ para DS, $69 \pm 10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ para DSCA y $191 \pm 65 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ para SCU.

Para determinar la actividad de PK en los extractos celulares, se procedió a calcular la velocidad inicial de la reacción que transforma el fosfoenolpiruvato (PEP) a piruvato y que representa una relación directa con la cantidad de enzima que cataliza dicha reacción. A cada extracto le fueron agregados los componentes de la reacción enzimática bajo las condiciones indicadas en Materiales y Métodos (3.3.6.2) y se siguió la cinética midiendo la disminución de absorbancia a 340 nm para detectar el consumo de NADH, que es proporcional a la concentración de piruvato sintetizado en la reacción catalizada por la enzima piruvato quinasa. En la Figura 9 se muestra un ejemplo de la cinética de reacción. También se observa el ensayo cinético sin el sustrato (PEP) en la mezcla de reacción.

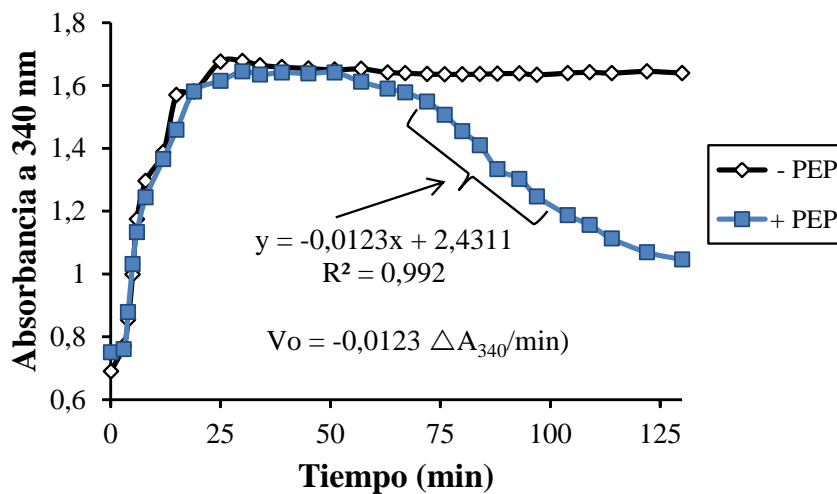


Figura 9. Cinética de reacción de PK en ausencia y presencia de 25 mM PEP. En el ensayo se usó una cantidad de extracto celular de 4 μg de un DS y las condiciones se indican en Materiales y Métodos (3.3.6.2).

La reacción enzimática presenta la característica de poseer un aumento de absorbancia a 340 nm en la parte inicial de la cinética, que indica la reacción catalizada por la enzima LDH para formar piruvato y NADH, a expensas de una cierta cantidad de NAD^+ presente en el NADH comercial, y del lactato en los extractos celulares y en la preparación comercial de LDH. Cuando se alcanza la concentración crítica de piruvato, la reacción catalizada por la LDH está en equilibrio (punto máximo de la curva), y la posterior síntesis de más piruvato, catalizada por la PK, determina el consumo de NADH por la LDH para formar nuevo lactato y producir la disminución de la absorbancia a 340 nm (sección descendente en la curva, (Figura 9). En este lapso de tiempo, la reducción inicial de la absorbancia a 340 nm es determinada por la velocidad de la reacción de la PK y corresponde a la velocidad enzimática inicial ($\Delta A_{340}/\text{min}$). En el ensayo sin colocar el sustrato (sin PEP) se detecta el aumento inicial de absorbancia hasta alcanzar un valor que se mantuvo constante en el tiempo y que indica la ausencia de una cantidad significativa de PEP en los extractos celulares y también la ausencia de otros procesos paralelos que consuman NADH.

Previo a la determinación de la actividad de la PK en todas las muestras del estudio, se ajustó la concentración del sustrato PEP. La cinética de reacción se realizó con diferentes concentraciones de PEP para determinar la cantidad de sustrato a la cual se alcanza la velocidad máxima a una cantidad fija de extracto de un control de DS (Figura 10). Se usó una concentración de sustrato en el intervalo de 5 a 30 mM de PEP. La gráfica de velocidad inicial ($\Delta A_{340}/\text{min}$) frente a la concentración de PEP reveló un comportamiento sigmoideal, que indica una cooperatividad positiva de sustrato, y que implica cambios conformacionales que incrementan la afinidad por el sustrato a medida que la concentración de éste aumenta. La velocidad máxima se alcanzó alrededor de 25-30 mM PEP.

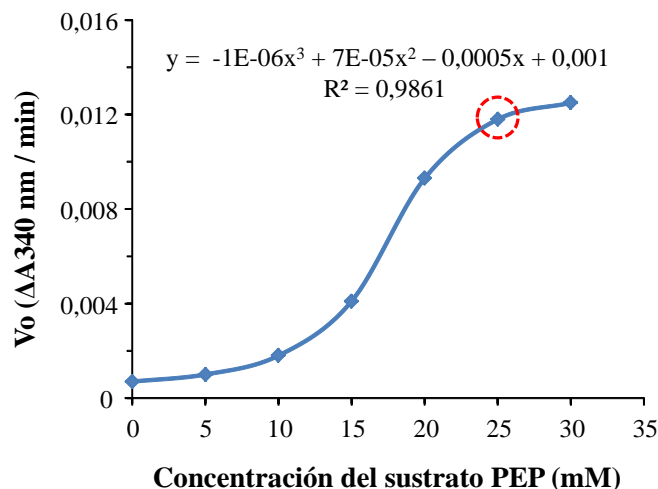


Figura 10. Relación de la velocidad inicial de reacción de PK con la concentración de sustrato. Se probaron diferentes cantidades de PEP (entre 5 y 30 mM). La velocidad máxima se alcanza con 25-30 mM PEP. Se usaron 4 μg de extracto celular de un DS. Las velocidades iniciales se calcularon como se muestra en la Figura 9.

Con la finalidad de establecer el estado de saturación de la enzima en los ensayos con los distintos extractos celulares y garantizar que las diferencias de actividades dependan sólo de la cantidad de PK, se determinó la velocidad inicial de la reacción catalizada por la enzima utilizando varias cantidades de extracto de un DS (1 a 12 μg de proteínas) y una cantidad fija del sustrato PEP (25 mM), correspondiente a la concentración de sustrato donde se observó velocidad máxima con 4 μg de extracto (Figura 9). En la Figura 11 se representan los resultados obtenidos y se observa una relación lineal de pendiente positiva entre la velocidad de reacción y todas las cantidades utilizadas de extracto celular. Esto indica que la actividad de PK aumenta de manera proporcional al aumento de la cantidad de extracto, y se deduce que hay una saturación inicial de la enzima con el sustrato en todas las mezclas de reacción, por lo tanto, las diferencias de velocidad se deben a las distintas cantidades o actividades de la enzima en el extracto. Para los ensayos de actividad de todas las muestras celulares se tomaron 5 μg de extracto, que

corresponde a un punto medio de la curva de estandarización, garantizando que muestras con cantidades mayores o menores de enzima se encuentren saturadas con el sustrato PEP, y así obtener en cada caso la máxima actividad enzimática.

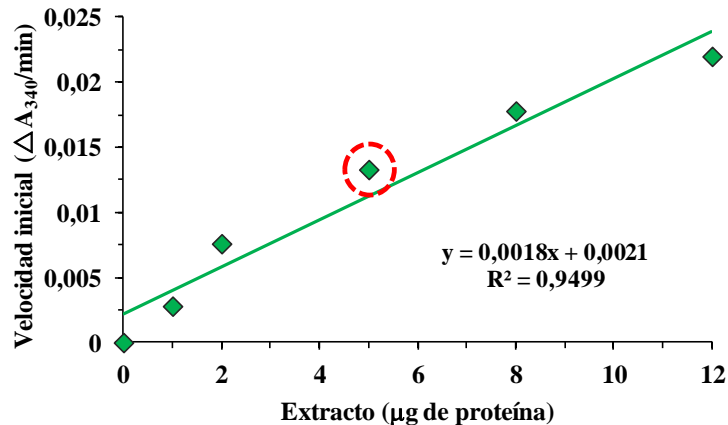


Figura 11. Optimización de la cantidad de proteína a utilizar por ensayo de actividad de piruvato quinasa. Se probaron diferentes cantidades de proteína en los extractos celulares (entre 1 y 12 μg). Se tomó como óptima para los ensayos de 100 μL una cantidad media (5 μg) en la curva de estandarización.

Una vez ajustadas las concentraciones de PEP y de extracto proteico, se realizó la medición de la actividad enzimática de PK en cada una de las muestras, utilizando las siguientes condiciones finales de reacción: Tampón e iones (Hepes KOH 20 mM pH 7,5; MgCl₂ 10 mM; KCl 50 mM), ADP 4 mM, NADH 0,5 mM, PEP 25 mM, LDH 0,022 U/L y proteína (extracto celular) 5 μg para un volumen final de ensayo de 100 μL.

Como se explicó anteriormente, la actividad enzimática de PK es proporcional a la velocidad inicial de la reacción que cataliza. La velocidad inicial se determinó por las cinéticas de reacción de cada extracto celular como se muestra en la Figura 9, y corresponde en la gráfica de la cinética, a la pendiente negativa de la recta en los

primeros minutos de la reacción, o la disminución inicial de absorbancia a 340 nm por unidad de tiempo. Usando el coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm ($6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) se determinaron las actividades específicas de PK de los diferentes extractos como se indica en Materiales y Métodos (3.3.6.2). Posteriormente fueron calculados los promedios de las actividades con sus desviaciones estándar para cada caso, empleando la prueba de múltiples comparaciones de Tukey, para la comparación de medias.

Al analizar la actividad específica promedio de los grupos de muestras de sangre periférica (Figura 12), no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$), ya que la actividad enzimática promedio de los DD fue 37 ± 16 U/mg de proteínas y la actividad correspondiente a los DS y DSCA fue 37 ± 21 y 30 ± 13 U/mg de proteínas, respectivamente. Con respecto a la SCU, la actividad promedio fue 21 ± 8 U/mg de proteínas, significativamente menor a la observada en sangre periférica ($P < 0,05$).

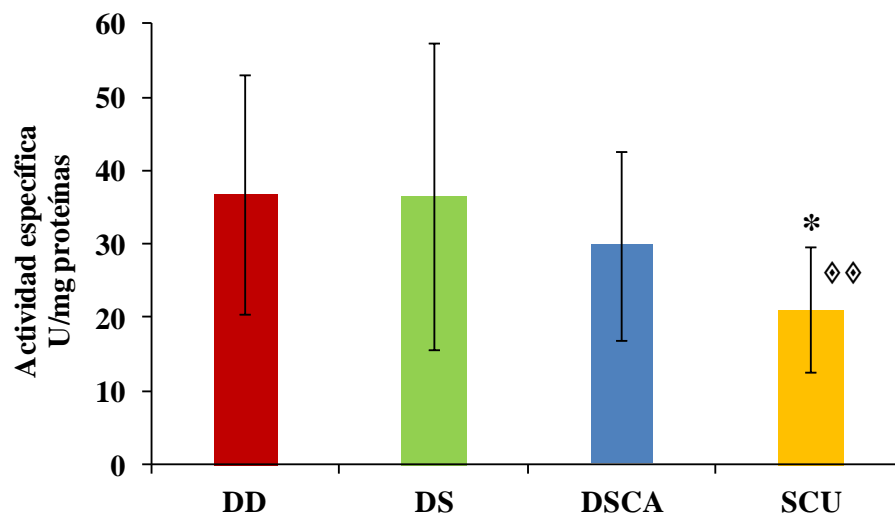


Figura 12. Actividad específica de PK en las poblaciones de sangre periférica y sangre de cordón umbilical. Se muestran los promedios con las desviaciones estándar. ANOVA ($P < 0,001$). Prueba de Tukey: *significativamente inferior a DSCA ($P < 0,05$); ♦♦significativamente inferior a DD y DS ($P < 0,01$).

En la Figura 12 también se observa que las desviaciones estándar de los promedios de actividad específica de piruvato quinasa en sangre periférica tienen valores altos, entre 13 y 21 U/mg de proteínas, y en SCU la desviación es de 8 U/mg de proteínas, por tanto, se consideró la posibilidad de la existencia de grupos de individuos con diferente actividad de PK dentro de cada muestra poblacional. Con base a este planteamiento, se estudió la distribución de los valores de actividad específica de la enzima y se formaron tres grupos diferentes para cada población, existiendo entonces, donantes con actividad enzimática más baja que el promedio (G1), intermedia o alrededor del promedio (G2) y actividad enzimática más alta que el promedio (G3) (Figura 13).

Como se observa en la Figura 13A, B y C, la actividad del G1 en los donantes de sangre periférica comprende valores entre 13 y 30 U/mg de proteínas, mientras que la actividad del G2 se encuentra en el rango de 35 a 48 U/mg de proteínas; con respecto al G3, los donantes correspondientes a este grupo presentaron una actividad específica de PK entre 51 y 80 U/mg de proteínas, con mayor variabilidad que los grupos G1 y G2. En el caso de la SCU (Figura 13D), como la actividad observada fue más baja que la de sangre periférica, los valores distribuidos por grupo fueron también menores (G1: entre 10 y 14 U/mg de proteínas; G2: entre 20 y 26 U/mg de proteínas; G3: entre 30 y 48 U/mg de proteínas).

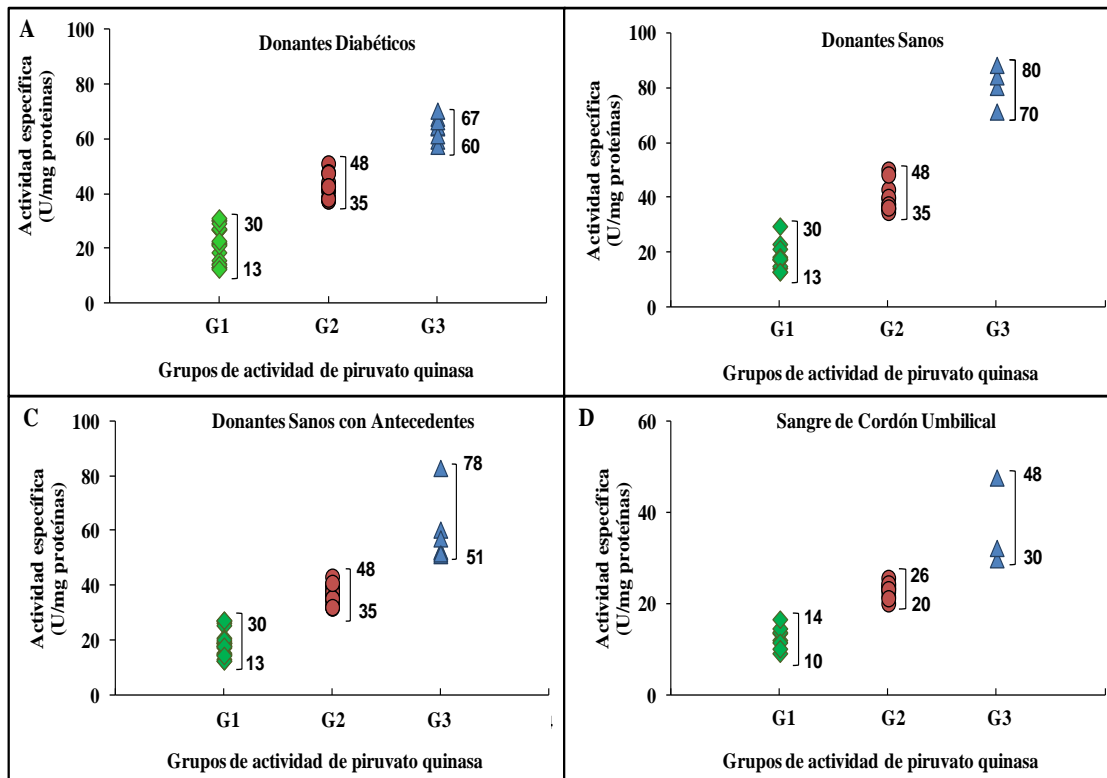


Figura 13. Distribución de los valores de actividad específica de PK en diferentes grupos dentro de cada muestra poblacional. Se determinaron tres grupos de actividad enzimática (G1, G2, G3) en cada muestra poblacional (DD, DS, DSCA y SCU), de acuerdo a su distribución alrededor del promedio general de actividad en cada caso.

En la Figura 14A se muestra un ejemplo de las cinéticas de reacción enzimática en cada grupo, correspondiente a muestras de la población de donantes sanos, presentando actividad enzimática baja (G1), intermedia (G2) y alta (G3). Las diferencias en las velocidades de reacción (pendientes de las rectas) entre grupos consecutivos es aproximadamente de dos veces.

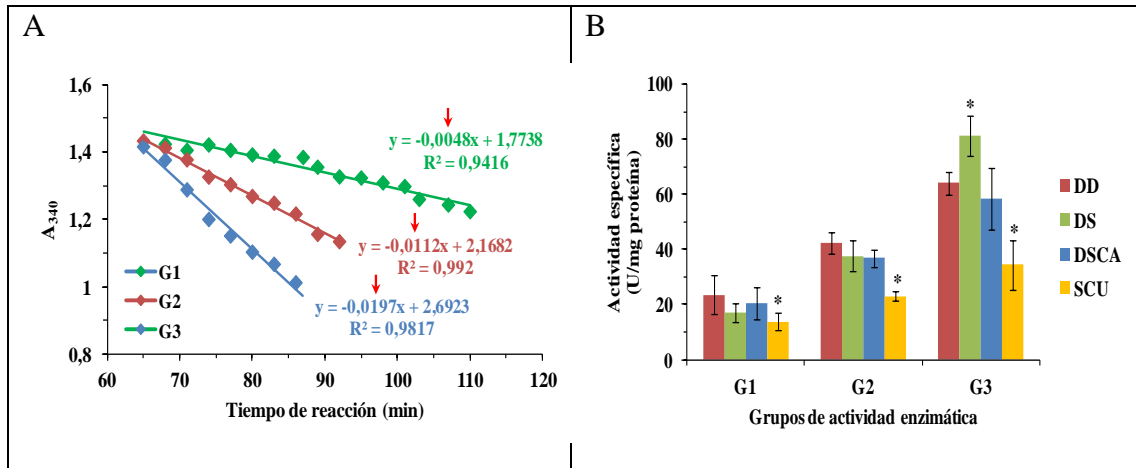


Figura 14. Cinéticas de reacción y actividad específica de PK en los diferentes grupos de cada población. A) Ejemplos de cinéticas de reacción de piruvato quinasa de donantes sanos en cada grupo de actividad enzimática. Las flechas señalan las velocidades iniciales de reacción, representadas por el valor de la pendiente. B) Actividad específica de piruvato quinasa en cada grupo de las diferentes poblaciones. *Significativamente diferentes respecto a los demás valores promedio dentro del grupo respectivo. ANOVA: $P \leq 0,0017$. Prueba de Tukey: G1 ($P < 0,05$); G2 ($P < 0,001$); G3 ($P < 0,05$). Los valores intergrupo de una misma población son todos significativamente diferentes: ANOVA ($P < 0,0001$). Tukey ($P < 0,001$).

En la Figura 14B se muestran los resultados de los promedios de actividad específica de piruvato quinasa por grupo en cada población estudiada con sus respectivas desviaciones estándar; dichas desviaciones fueron menores (2 - 11 U/mg proteínas) a las observadas en los promedios generales (13 - 21 U/mg proteínas). Los promedios de actividad específica en sangre periférica para los grupos G1 de cada población están alrededor de 20 U/mg proteínas (Figura 14B), para los grupos G2 alrededor de 40 U/mg proteínas y para los grupos G3, con una mayor variabilidad, entre 60 y 81 U/mg proteínas. Los valores promedio de actividad enzimática en los grupos de SCU fueron aproximadamente la mitad de los detectados en sangre periférica (13,8; 23; 34,5 U/mg proteínas para G1, G2 y G3, respectivamente). En los valores promedio de actividad enzimática intragrupo de las distintas poblaciones se observaron diferencias significativas solo entre los valores de SCU y los demás promedios de sangre periférica ($P < 0,05$), y entre el valor promedio de DS en G3 con

los demás promedios de actividad en dicho grupo ($P < 0,05$). Sin embargo, los valores de actividad enzimática intergrupo de una misma población fueron todos significativamente diferentes ($P < 0,001$), es decir, G1 tiene una actividad de PK significativamente más baja que G2 y G3, y G2 una actividad significativamente inferior a G3 en todas las poblaciones.

Al igual que los promedios generales de actividad enzimática (Figura 12), no se encontraron diferencias significativas entre los promedios de actividad de las distintas poblaciones de sangre periférica en un mismo grupo (a excepción de G3) (Figura 14B). Sin embargo, se detectaron algunas diferencias en la distribución de individuos en cada grupo de actividad en las distintas poblaciones. El número y porcentaje de individuos en los diferentes grupos de actividad de piruvato quinasa de cada población se muestran en la Tabla 5, y en la Figura 15 se observan las gráficas correspondientes a dichos porcentajes.

Tabla 5. Prevalencia de individuos en los diferentes grupos de actividad de PK de cada población.

Grupo de actividad	Número de muestras				% de individuos			
	DD	DS	DSCA	SCU	DD	DS	DSCA	SCU
G1	23	10	25	10	50	33	49	42
G2	15	16	19	10	33	54	37	42
G3	8	4	7	4	17	13	14	16
Total	46	30	51	24	100	100	100	100

La distribución se realizó como se indica en la Figura 13.

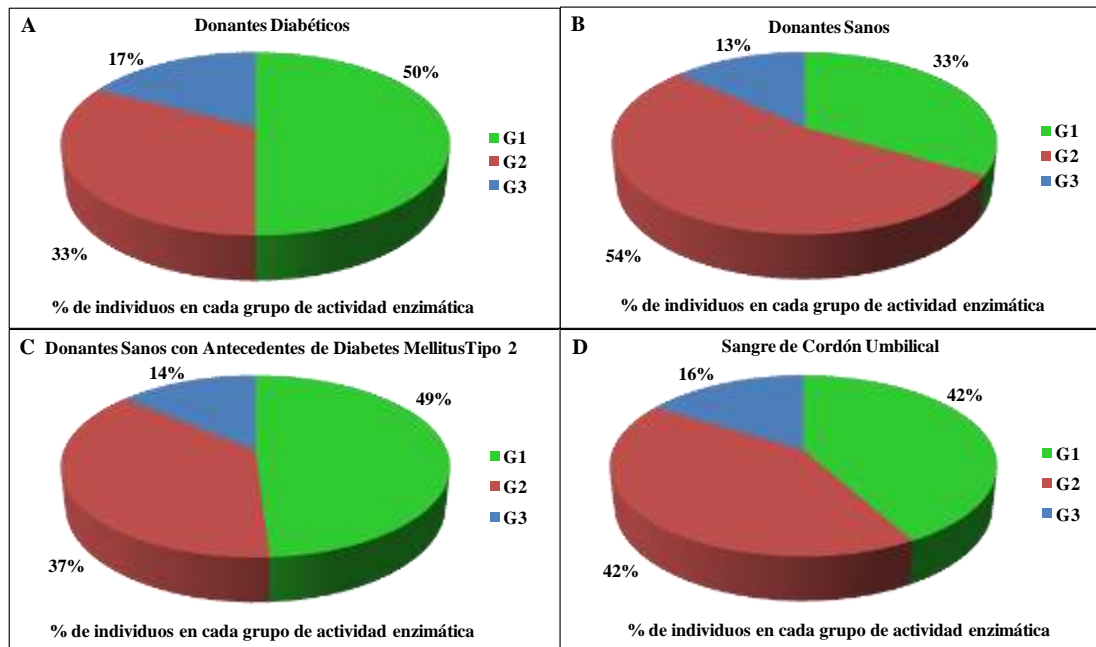


Figura 15. Distribución porcentual de los grupos de actividad enzimática en las poblaciones de DD, DS, DSCA y SCU. Se establecieron tres grupos de actividad enzimática como se indica en la Figura 13.

La mayor cantidad de DD (Figura 15A) se concentra en el G1 (50%), mientras que el porcentaje restante se divide en 33% en G2 y 17% en G3, es decir, la mayoría de los DD presentaron actividad enzimática baja. En el caso de los DS (Figura 15B) esta proporción es diferente, ya que el 54% de los DS se ubica en el G2 de actividad enzimática intermedia y el porcentaje de individuos en el G1 (33%) es mucho menor que en DD, siendo el G3 aproximadamente equivalente (13%). Los DSCA (Figura 15C), presentaron una proporción intermedia entre los DD y los DS en cuanto a los individuos en G2 (37%), pero el porcentaje en G1 (49%) o de actividad baja fue similar al de la población diabética, mientras que la proporción de individuos en G3 (14%) fue muy semejante a la de las poblaciones de DD y DS. En el caso de los donantes de SCU (Figura 13D), se observó el mismo porcentaje de individuos (42%) tanto en G1 como en G2 y para G3 se encontró un valor de 16%, muy similar al de

sangre periférica. Los porcentajes en los diferentes grupos de SCU fueron aproximadamente los esperados de acuerdo a los resultados encontrados en sangre periférica para las distintas poblaciones (DD, DS, DSCA) y considerando que es una población mixta o general donde hay un porcentaje de neonatos con las características de las tres poblaciones de sangre periférica.

Para evaluar la asociación de las diferentes actividades de *PKLR* con la DMT2 se construyeron las tablas de contingencia correspondientes y se calcularon las *odds ratios* (OR) de cada grupo de actividad para cuantificar la asociación. Los resultados del cálculo de las OR para cada grupo de actividad enzimática comparando la población de DD y DS se muestran en la Tabla 6, y las OR en relación a DS y DD comparados con DSCA se muestran en la Tabla 7. Es importante mencionar que en este análisis inicial no se consideraron los diferentes patrones de SSCP o variantes en el promotor de la enzima que existen en cada grupo de actividad enzimática. Dicho análisis se realiza más adelante.

Tabla 6. Análisis estadístico del riesgo a la diabetes mellitus en función de las actividades de PK observadas en DD y DS.

Grupo de actividad	DD-DS				
	DS (n: 30)	DD (n: 46)	OR	IC del 95%	P
G1	10	23	2,00	5,19-0,77	0,1656
G2	16	15	0,42	1,09-0,16	0,0959
G3	4	8	1,37	5,03-0,37	0,7541

Al realizar la comparación entre los tres grupos de actividad de PK en DD y DS se observa que no existen diferencias significativas ($P > 0,05$). Sin embargo, hay

la tendencia a que los DS presenten actividad enzimática intermedia (G2), y los DD actividad enzimática baja de PK (G1).

Tabla 7. Análisis estadístico del riesgo a la diabetes mellitus en función de las actividades de PK observadas en DSCA en relación a DD y DS.

Grupos de actividad	DS (n: 30)	DD (n: 46)	DSCA (n: 51)	DSCA-DS			DD-DSCA		
				OR	IC del 95%	P	OR	IC del 95%	P
G1	10	23	25	1,92	4,91-0,75	0,2455	1,04	2,31-0,47	1
G2	16	15	19	0,52	1,30-0,21	0,1724	0,81	1,88-0,35	0,6744
G3	4	8	7	1,03	3,87-0,28	1	1,32	3,99-0,44	0,7798

En el caso de los DSCA, no se observaron diferencias significativas ($P > 0,1$) en los tres grupos de actividad, cuando estos individuos fueron comparados con los DS y DD (Tabla 7). Las menores diferencias se observaron entre DD y DSCA, como se demuestra por los mayores valores de P ($0,6744 \leq P \leq 1$) y en comparación al análisis entre DS y DSCA ($0,1724 \leq P \leq 1$).

Con respecto a la SCU, estos donantes están clasificados en donantes con antecedentes familiares de DMT2 y donantes sin antecedentes familiares de la enfermedad, y según la estadística, el 12,5% de esta población sufrirá diabetes mellitus en su edad adulta. En este sentido, del número de donantes de SCU que se encuentran agrupados en el G1 con baja actividad, el 45% tiene antecedentes familiares de DMT2, mientras que en G2 o actividad enzimática intermedia, se observó un porcentaje menor (30%) con antecedentes familiares de la enfermedad. Por consiguiente, en la población de SCU, el G1 de baja actividad de piruvato quinasa es el grupo que tiene mayor relación con la diabetes mellitus, de manera

similar a la tendencia que se observa en la población diabética a tener baja actividad enzimática (Tablas 5 y 6, Figura 15).

4.6 Asociación de la actividad de piruvato quinasa con las variantes en el promotor de la enzima y su relación con la diabetes mellitus.

En primer lugar, se determinó si las diferentes actividades de piruvato quinasa estaban relacionadas con las variantes en el promotor de la enzima. Para ello, se construyeron las tablas de contingencia correspondientes considerando la población total estudiada, el muestreo no probabilístico de tipo intencional de sangre periférica (DD, DS, DSCA) y la población de SCU, ya que todas las poblaciones están distribuidas en las tres actividades enzimáticas (G1, G2 y G3) y tienen los diferentes patrones de SSCP o variantes en el promotor de PK. En la Tabla 8 se resumen los resultados obtenidos.

En el análisis estadístico de la asociación de la actividad baja de PK (G1) con los patrones de SSCP, se observa (Tabla 8) que los individuos con el patrón 1 de SSCP tienen significativamente ($P= 0,0005$) menor riesgo relativo (0,58) o 1,72 veces menor riesgo ($1/0,58 = 1,72$) a tener actividad baja (G1) respecto a los individuos que poseen los patrones 2 y 3 de SSCP. Por el contrario, los individuos que presentan el patrón 2 de SSCP tienen significativamente ($P= 0,0003$) más riesgo relativo (2,03 veces) a tener actividad baja de PK, es decir, la actividad baja de la enzima está asociada significativamente a la variante en el promotor de la enzima visualizada como el patrón 2 por el análisis de Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla (SSCP). El patrón 3 de SSCP no está asociado a la actividad baja de PK ($P= 1$).

Tabla 8. Análisis estadístico de la asociación de las actividades de PK con los patrones de SSCP o variantes en el promotor de la enzima en la población total

Grupos de actividad	Patrones de SSCP Nº Individuos		Riesgo Relativo	IC del 95%	P
	P1	P2, P3			
G1	27	41	0,58	0,42-0,80	0,0005
G2,G3	57	26			
”	P2	P1, P3	2,03	1,38-3,01	0,0003
	40	28			
”	24	59	0,61	0,06-6,59	1
	P3	P1, P2			
”	1	67	1,40	1,04-1,82	0,0304
	2	81			
G2	P1	P2, P3	0,64	0,42-0,98	0,0431
	40	20			
G1,G3	44	47	0,76	0,07-8,18	1
	P2	P1, P3			
”	19	41	1,41	1,05-1,89	0,0690
	45	46			
”	P3	P1, P2	0,47	0,21-1,05	0,0385
	1	59			
G3	2	89	2,78	0,26-29,46	0,3931
	P1	P2, P3			
G1,G2	17	6	2,78	0,26-29,46	0,3931
	67	61			
”	P2	P1, P3	2,78	0,26-29,46	0,3931
	5	18			
”	59	69	2,78	0,26-29,46	0,3931
	P3	P1, P2			
”	1	22	2,78	0,26-29,46	0,3931
	2	126			

En las tablas de contingencia se empleó el análisis exacto de Fisher

Los resultados del análisis estadístico de la asociación de la actividad intermedia de PK (G2) con los patrones de SSCP (Tabla 8) muestran que el patrón 1 de SSCP está asociado significativamente ($P= 0,0304$) a dicha actividad enzimática intermedia y los individuos con esta característica en el promotor de la enzima tienen 1,4 veces más riesgo de tener la actividad G2 respecto a los que poseen los patrones 2 y 3 de SSCP. A su vez, los que tienen el patrón 2 de SSCP muestran significativamente ($P= 0,0431$) menor riesgo relativo (0,64) o 1,6 veces ($1/0,64 = 1,6$) menos riesgo a tener actividad G2 respecto a los que poseen los patrones 1 y 3. El patrón 3 de SSCP no está asociado a la actividad intermedia de PK ($P= 1$).

El análisis estadístico de la asociación de la actividad alta de piruvato quinasa (G3) con los patrones de SSCP (Tabla 8) solo muestra que los individuos con el patrón 2 de SSCP tienen significativamente ($P= 0,0385$) menor riesgo relativo (0,47) o 2,13 veces menos riesgo ($1/0,47 = 2,13$) a tener actividad alta (G3) de PK, respecto a los individuos que presentan los patrones 1 y 3 de SSCP.

La conclusión del análisis estadístico de la asociación de las actividades enzimáticas de piruvato quinasa con las variantes en el promotor de la enzima (Tabla 8) es la siguiente: la variante en el promotor representada por el patrón 2 de SSCP está asociada a la baja actividad enzimática y la variante correspondiente al patrón 1 de SSCP está relacionada con la actividad intermedia. No se encontró asociación significativa entre el patrón 3 de SSCP y las diferentes actividades de la enzima.

Una vez establecidas las relaciones entre las actividades de piruvato quinasa y las variantes en el promotor, se determinó si las diferentes actividades de la enzima, considerando los patrones de SSCP, tenían asociación con la diabetes mellitus. El número y porcentaje de individuos en los diferentes grupos de actividad de PK de cada población con respecto a los patrones de SSCP, se muestran en la Tabla 9, y se

incluyen los resultados de SCU. En la Figura 16, se observa la gráfica correspondiente a los porcentajes de individuos en sangre periférica.

Tabla 9. Prevalencia de individuos en los diferentes grupos de actividad de PK de cada población con respecto a los patrones de SSCP.

Donante	Número de muestras									Total
	G1			G2			G3			
	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	
DD	6	17	0	6	9	0	6	2	0	46
DSCA	12	13	0	14	5	0	6	1	0	51
DS	6	4	0	13	2	1	3	0	1	30
SCU	3	6	1	7	3	0	2	2	0	24

Donante	% de individuos									Total
	G1			G2			G3			
	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	
DD	13	37	0	13	20	0	13	4	0	100
DSCA	24	25	0	27	10	0	12	2	0	100
DS	20	13	0	44	7	3	10	0	3	100
SCU	13	25	4	29	13	0	8	8	0	100

En la población de DD el mayor número de individuos se ubica en el grupo G1 de baja actividad con el patrón 2 de SSCP (37%), seguido por los individuos con el mismo patrón en G2 (20%) (Tabla 9 y Figura 16). Los DD con el patrón 1 de SSCP en G1 y G2 corresponden a 13% en ambos casos. En G3 la mayor cantidad de individuos tiene el patrón 1 de SSCP (13%). Para DS el mayor porcentaje de individuos se encuentra en G2 con P1 (44%), seguido por el porcentaje en G1 con P1 (20%). La población de DSCA presentó en G1 con los patrones P1 y P2 y en G2 con P1, aproximadamente el mismo número de individuos (24, 25 y 27%,

respectivamente) (Tabla 9 y Figura 16). En SCU (Tabla 9), al igual que la población de DS, el mayor porcentaje de neonatos se ubica en G2 con el patrón 1 de SSCP (29%), seguido por el porcentaje en G1 con P2 y P1 (25 y 13% respectivamente).

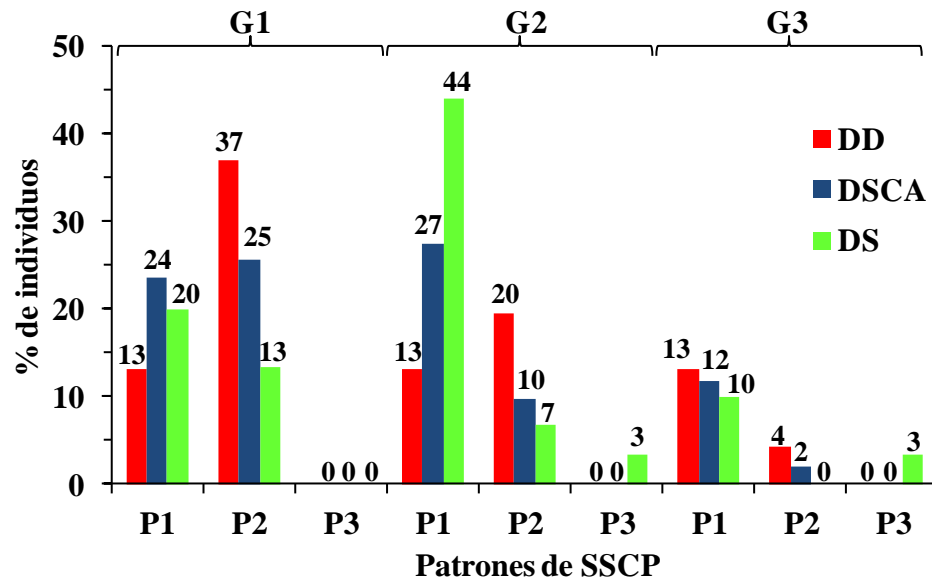


Figura 16. Distribución porcentual de los individuos en los diferentes grupos de actividad de PK con respecto a los patrones de SSCP en las poblaciones de DD, DSCA y DS. En cada grupo de actividad (G1, G2, G3) existen los patrones P1 y P2. El patrón P3 solo se encuentra en la población de DS en G2 y G3.

Para evaluar la asociación de los polimorfismos en *PKLR* detectados mediante la técnica SSCP y la actividad enzimática de PK en los donantes de sangre periférica con la diabetes mellitus, y cuya distribución fue explicada anteriormente (Tabla 9 y Figura 16), se construyeron las tablas de contingencia correspondientes y se calcularon las *odds ratios* (OR) de cada grupo de actividad con respecto a los patrones de SSCP, para cuantificar la asociación. Los resultados del cálculo de las OR con DSCA se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Análisis estadístico del riesgo a la diabetes mellitus entre DD y DS en función de las actividades de PK y los patrones de SSCP observados en ambas poblaciones.

Grupos de actividad DD-DS									
G1									
G2									
G3									
Patrones de SSCP	OR	IC del 95%	P	OR	IC del 95%	P	OR	IC del 95%	P
P1	0,6	0,17-2,07	0,5236	0,19	0,06-0,60	0,0057	1,35	0,31-5,87	1
P2	3,81	1,14-12,79	0,0351	3,41	0,68-17,02	0,1837	3,43	0,15-74	0,5158
P3				0,21	0,008-5,37	0,3947	0,21	0,008-5,37	0,3947

Grupos de actividad DD-DSCA									
G1									
G2									
G3									
Patrones de SSCP	OR	IC del 95%	P	OR	IC del 95%	P	OR	IC del 95%	P
P1	0,49	0,17-1,43	0,2036	0,39	0,14-1,14	0,1303	1,13	0,34-3,77	1
P2	1,71	0,72-4,09	0,2736	2,24	0,69-7,25	0,2480	2,27	0,2-25,93	0,6022

Grupos de actividad DSCA-DS									
G1									
G2									
G3									
Patrones de SSCP	OR	IC del 95%	P	OR	IC del 95%	P	OR	IC del 95%	P
P1	1,23	0,41-3,72	0,7877	0,49	0,19-1,28	0,1535	1,2	0,28-5,20	1
P2	2,22	0,65-7,58	0,2626	1,52	0,28-8,38	1	1,81	0,07-45,93	1
P3				0,19	0,008-4,84	0,3704	0,19	0,008-4,84	0,3704

En la comparación de DD con DS, el análisis estadístico mostró que la variación en el promotor de piruvato quinasa correspondiente al patrón 2 de SSCP,

unido a la baja actividad enzimática (G1) están asociados a la diabetes mellitus ($P=0,0351$) y los individuos con esta característica tienen un riesgo de 3,81 veces mayor a sufrir la enfermedad (Tabla 10, DD-DS). También se detecta una tendencia del patrón 2 de SSCP con actividad intermedia (G2) a estar relacionado con los DD ($P=0,1837$; $OR=3,41$). Asimismo, la secuencia del promotor del gen de la enzima correspondiente al patrón 1 de SSCP unido a la actividad intermedia de PK (G2) están asociados a la población de donantes sanos ($P=0,0057$), y le confieren 5,26 veces ($1/OR = 1/0,19 = 5,26$) menos riesgo a sufrir la patología en relación a la población diabética (Tabla 10, DD-DS). No se observaron correlaciones significativas en el grupo de actividad enzimática G2 con P3, e igualmente, en el grupo de actividad alta (G3) para todos los patrones de SSCP ($0,3947 \leq P \leq 1$) cuando se comparó la población de DD y DS (Tabla 10, DD-DS).

El análisis de DS y DD comparados con DSCA, no mostró correlaciones significativas ($0,1303 \leq P \leq 1$) en ninguno de los grupos de actividad enzimática con respecto a los patrones de SSCP (Tabla 10, DD-DSCA y DSCA-DS), y se demuestra que esta población con antecedentes familiares de diabetes mellitus tipo 2 guarda similitud con las poblaciones de donantes sanos y donantes diabéticos. Los DSCA con P2 y actividad baja (G1) solo presentan una tendencia ($P=0,2626$) a tener riesgo a la diabetes de 2,22 veces comparados con los DS (Tabla 10, DSCA-DS).

4.7 Correlación de la actividad enzimática de piruvato quinasa y los patrones de SSCP con los parámetros clínicos de laboratorio en los donantes diabéticos

A fin de establecer si la actividad enzimática de piruvato quinasa y los patrones de SSCP o variaciones en el promotor de la enzima estaban relacionados con los parámetros empleados en el control metabólico en individuos con DMT2, se realizaron las correlaciones entre la actividad de PK, los patrones de SSCP y los

niveles de glicemia, Hb A1c, insulina, colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, VLDL-colesterol y triglicéridos.

En la Figura 17A, B y C se observan las correlaciones de la actividad específica de piruvato quinasa con los valores de glicemia, Hb A1c e insulina de cada grupo de DD clasificados en función de la actividad enzimática, y en la Figura 17 D, E y F se muestran los gráficos de los valores promedio de glicemia, Hb A1c e insulina, de cada grupo de actividad específica de DD, respectivamente.

Cada grupo de actividad (G1, G2, G3) presenta una correlación de tendencia lineal negativa entre la actividad específica de piruvato quinasa y los valores de glicemia y Hb A1c (Figura 17 A y B). Dichas correlaciones fueron significativas según la prueba de regresión lineal (G1: $P < 0,0001$; G2: $\leq 0,0064$; G3: $P < 0,05$). La disminución de la actividad enzimática en el grupo G1 (pendientes de las rectas) por el aumento de cada mg/dL de glicemia o de Hb A1c fue de 0,0911 y de 2,4027 U/mg proteína, respectivamente. Esta disminución fue aproximadamente el doble a la observada en el grupo G2 (glicemia: 0,0389 U/mg proteína; Hb A1c: 1,4124 U/mg proteína). El Grupo G3 presentó una disminución de actividad enzimática respecto a cada mg/dL de glicemia o de Hb A1c de 0,0243 y 1,0719 U/mg proteína, respectivamente, y corresponden a valores entre 1,6 y 1,3 veces inferiores a los detectados en el grupo G2, y entre 3,7 y 2,3 veces inferiores a los detectados en el G1. Por tanto, se deduce que la mayor disminución de actividad enzimática en relación al aumento de los valores de glicemia y Hb A1c ocurre en G1 y la menor disminución se observa en G3, siendo G2 el grupo que presenta una disminución intermedia o entre G1 y G3.

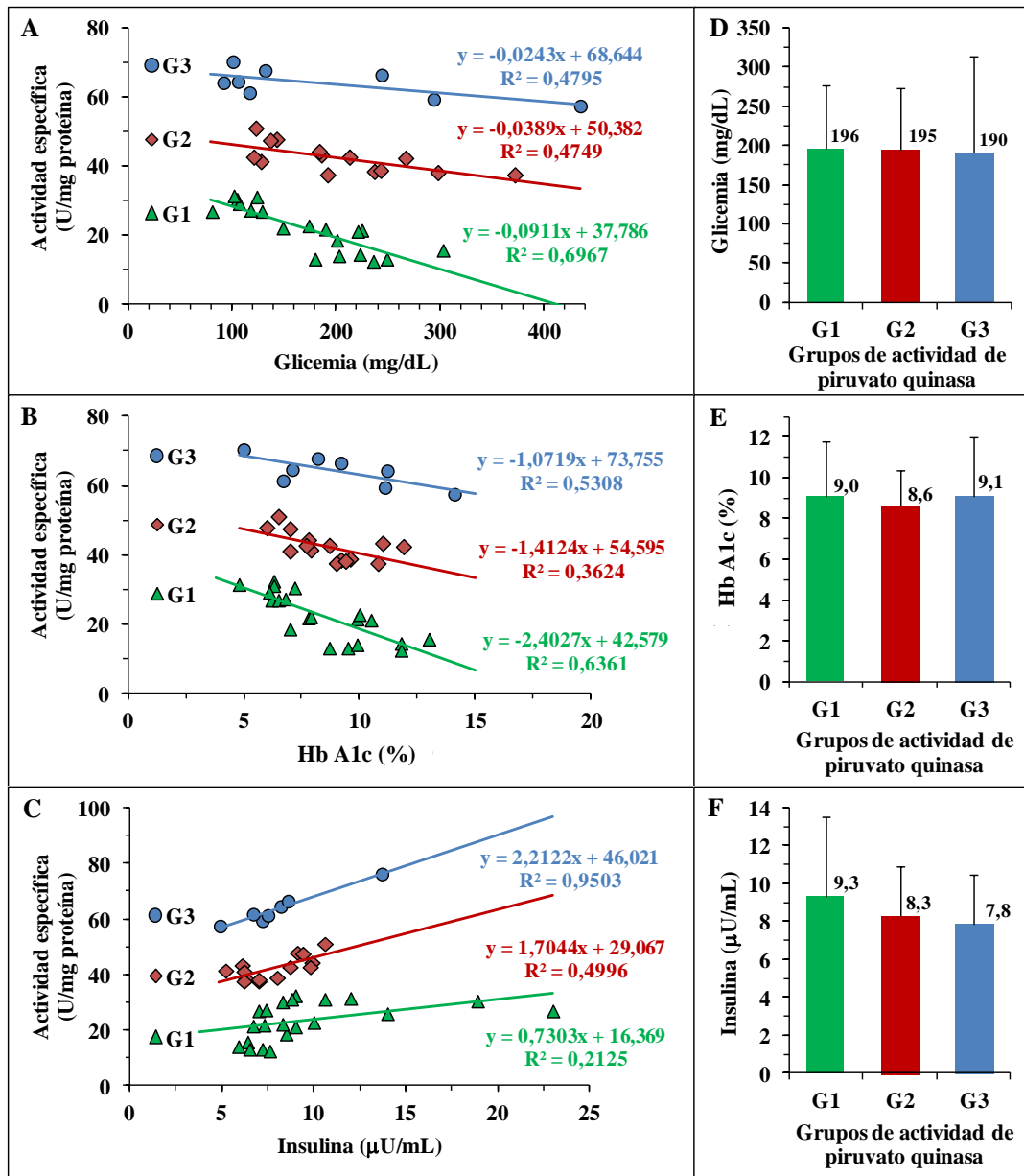


Figura 17. Correlación de la actividad de PK en los diferentes grupos de DD con los valores de glicemia, Hb A1c e insulina y promedios con la desviación estándar de los parámetros clínicos en los diferentes grupos de actividad enzimática. **A, B y C.** Correlaciones de cada grupo de actividad enzimática (G1, G2, G3) con la glicemia (A), Hb A1c (B) e insulina (C). Prueba de Regresión Lineal. Glicemia y Hb A1c: $P < 0,0001$ (G1); $P \leq 0,0064$ (G2); $P < 0,05$ (G3). Insulina: $P = 0,0355$ (G1); $P = 0,0047$ (G2); $P = 0,0002$ (G3). **D, E y F.** Promedios y desviaciones estándar de glicemia (D), Hb A1c (E) e insulina (F) en los diferentes grupos de actividad. Prueba de Tukey: $P \geq 0,5686$.

Estos resultados están de acuerdo con los valores promedio de actividad enzimática encontrados en cada grupo poblacional de DD (Figura 14B). El G1, de menor actividad promedio de piruvato quinasa (23 ± 7 U/mg proteína), fue el que presentó también la mayor disminución de actividad enzimática con el aumento de glicemia y Hb A1c, mientras que el G3, de mayor actividad promedio (64 ± 4 U/mg proteína), fue el grupo que presentó la menor disminución de actividad de la enzima con el aumento de los correspondientes parámetros clínicos.

Con la insulina plasmática (Figura 17C), la actividad específica de piruvato quinasa guardó una correlación lineal positiva y significativa en los grupos G1, G2 y G3 ($P= 0,0355$; $P= 0,0047$, $P= 0,0002$, respectivamente). Por cada $\mu\text{U/mL}$ de la hormona circulante, la actividad enzimática aumentó $0,7303$ U/mg proteína en G1, mientras que en G2 el aumento fue de $1,7044$ U/mg proteína y en G3 de $2,2122$ U/mg proteína. La actividad enzimática en G2 y G3 por cada $\mu\text{U/mL}$ de insulina es 2,3 y 3 veces mayor, respectivamente, en relación a G1, lo que significa que la hormona ejerce el menor efecto en G1 y el mayor efecto en G3, presentando un efecto intermedio en G2.

Los promedios totales de glicemia (Figura 17D), Hb A1c (Figura 17E) e insulina (Figura 17 F) en cada grupo de actividad enzimática de los DD no mostraron diferencias significativas entre los grupos ($P \geq 0,5686$). Los valores promedio de glicemia estuvieron entre 196 ± 81 mg/dL para G1 y 190 ± 124 mg/dL para G3, los valores de Hb A1c entre $8,6 \pm 1,7$ % para G2 y $9,1 \pm 2,9$ % para G3, y los valores promedio de insulina oscilaron entre $7,8 \pm 2,7$ $\mu\text{U/mL}$ para G3 y $9,3 \pm 4,3$ $\mu\text{U/mL}$ para G1. Sin embargo, al calcular los promedios de los parámetros clínicos en los diferentes grupos considerando los patrones de SSCP se detectaron algunas diferencias significativas. En la Figura 18A y B se muestran los resultados para la glicemia y Hb A1c, respectivamente. Los valores promedio de glicemia con el patrón 1 de SSCP en G1 y G2 (G1: 217 ± 52 mg/dL; G2: 229 ± 65 mg/dL) fueron

significativamente superiores ($0,0003 \leq P \leq 0,031$) a los valores promedio de glicemia de los individuos que poseían el patrón 2 de SSCP (G1: 158 ± 54 mg/dL; G2: 149 ± 41 mg/dL). En el grupo G3 se observó que los individuos con P2 de SSCP tenían un promedio de glicemia de 269 ± 35 mg/dL, significativamente superior ($P = 0,0003$) a los que poseían el P1 de SSCP (110 ± 15 mg/dL). A su vez, este promedio de glicemia en G3(P1) es significativamente inferior ($0,0003 \leq P \leq 0,0489$) a todos los demás promedios del carbohidrato y se encuentra dentro de valores normales.

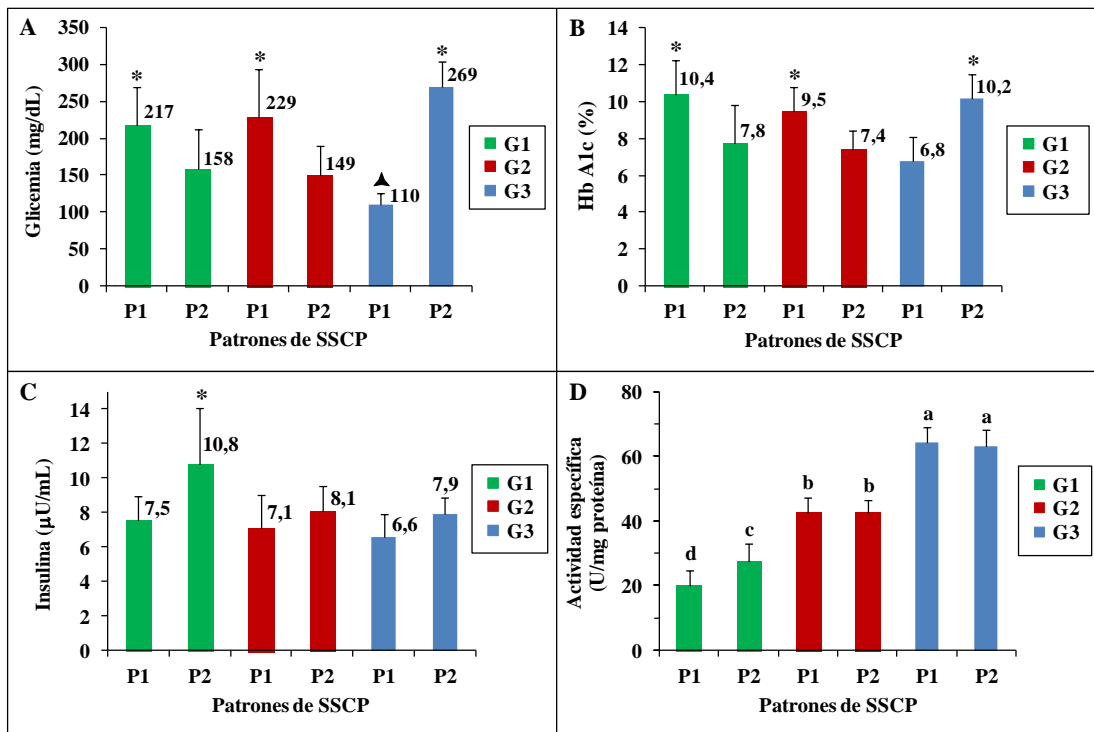


Figura 18. Valores promedio y desviación estándar de glicemia, Hb A1c, insulina y actividad de PK en los diferentes grupos de actividad enzimática de DD de acuerdo a los patrones de SSCP. A) Valores promedio de glicemia. Prueba t Student: *Significativamente superior ($0,0003 \leq P \leq 0,031$) a G1(P2), G2(P2) y G3(P1). ▲ Significativamente inferior a todos los valores ($0,0003 \leq P \leq 0,0489$). B) Valores promedio de Hb A1c. Prueba t Student: *Significativamente superior ($0,0143 \leq P \leq 0,05$) a G1(P2), G2(P2) y G3(P1). C) Valores promedio de insulina. Prueba t Student: *Significativamente superior ($0,0083 \leq P \leq 0,0369$) a G1(P1), G2(P1) y G3(P1). D) Valores promedio de actividad enzimática. Prueba de Tukey: letras distintas indican que son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Valores normales: Glicemia (70-110 mg/dL); Hb A1c (4,5-6,5 %).

Los resultados de los valores promedio de Hb A1c, con base a los patrones de SSCP en los diferentes grupos de actividad enzimática, fueron similares a los obtenidos con la glicemia. En la Figura 18B se observa que los promedios de Hb A1c en los grupos G1 y G2 con el patrón 1 de SSCP (G1: $10,4 \pm 1,8$ %; G2: $9,5 \pm 1,3$ %) fueron significativamente superiores ($0,0143 \leq P \leq 0,05$) a los detectados en los individuos con el patrón 2 de SSCP en el promotor de piruvato quinasa (G1: $7,8 \pm 2$ %; G2: $7,4 \pm 1$ %). En G3, el promedio de Hb A1c con P1 ($6,8 \pm 1,3$ %) fue significativamente inferior ($P= 0,042$) al promedio con P2 ($10,2 \pm 1,3$ %).

Por otra parte, el valor promedio de insulina en G1 con el patrón 2 de SSCP ($10,8 \pm 3,3$ $\mu\text{U/mL}$) (Figura 18C) fue significativamente superior ($0,0083 \leq P \leq 0,0369$) a los promedios de insulina con el patrón 1 en todos los grupos de actividad enzimática (G1: $7,5 \pm 1,4$ $\mu\text{U/mL}$; G2: $7,1 \pm 1,9$ $\mu\text{U/mL}$; G3: $6,6 \pm 1,3$ $\mu\text{U/mL}$). Igualmente, los individuos con P2 de SSCP en G2 y G3 tienen la tendencia a tener mayor valor promedio de insulina (G2: $8,1 \pm 1,5$ $\mu\text{U/mL}$; G3: $7,9 \pm 1$ $\mu\text{U/mL}$) que los que poseen el patrón 1 de SSCP (G2: $7,1 \pm 1,9$ $\mu\text{U/mL}$; G3: $6,6 \pm 1,3$ $\mu\text{U/mL}$).

En este punto es importante observar que G1 y G2 con el patrón 2 de SSCP (Figura 18 A, B y C) tienen menores valores promedio de glicemia y Hb A1c, y a su vez, mayores promedios de insulina que G1 y G2 con el patrón 1 de SSCP. El G3 se comporta de manera diferente, el subgrupo con P2 tiene los mayores valores promedio de glicemia, Hb A1c e insulina al compararse con el G3(P1) (Figura 18A, B y C). También es importante mencionar que el valor promedio de insulina en G1 con el patrón 2 de SSCP o grupo asociado a la Diabetes ($10,8 \pm 3,3$ $\mu\text{U/mL}$) (Figura 18C) es superior al valor promedio observado en el grupo control de DS ($9,0 \pm 2,9$ $\mu\text{U/mL}$) (Tabla 1), por lo que podría considerarse cierta tendencia al hiperinsulinismo en los individuos con actividad baja de piruvato quinasa y patrón 2 de SSCP en el promotor del gen de la enzima. Asimismo, en la Figura 18D se observa que el grupo G1(P2) de baja actividad enzimática y con hiperinsulinismo tiene significativamente

($P < 0,05$) mayor valor promedio de actividad que el G1(P1), el cual posee menor valor promedio de insulina. Los grupos G2 y G3 no presentaron diferencias significativas en los valores promedio de actividad enzimática de acuerdo a los patrones de SSCP en cada grupo (Figura 18D). Igualmente, los valores promedio de insulina fueron semejantes en estos grupos, aunque con una tendencia a mayores promedio de insulina en los subgrupos con P2, como se mencionó anteriormente (Figura 18C).

Los análisis de las correlaciones de la actividad de piruvato quinasa con los parámetros del perfil lipídico se muestran en las Figuras 19 y 20. El colesterol (Figura 19A) guardó una correlación lineal negativa y significativa con la actividad enzimática en los tres grupos de actividad ($0,0016 \leq P \leq 0,0341$). La disminución de actividad por cada mg/dL de colesterol fue aproximadamente similar en los tres grupos (0,0762 a 0,1038 U/mg proteína), pero el G1 fue el que presentó significativamente ($P < 0,01$) el mayor promedio de colesterol (206 ± 45 mg/dL) comparado con el promedio de G2 (152 ± 35 mg/dL) y G3 (143 ± 12 mg/dL). No se observó una correlación significativa entre la actividad de piruvato quinasa y la concentración de HDL-col (Figura 19C) ($0,5344 \leq P \leq 0,9140$), sin embargo, el grupo G1 fue significativamente el de menor promedio de HDL-col (40 ± 7 mg/dL) (Figura 19D) en comparación con G2 (52 ± 9 mg/dL) y G3 (50 ± 12 mg/dL) ($0,01 < P < 0,05$).

El LDL-col, al igual que el colesterol, presentó correlaciones lineales negativas con la actividad específica de piruvato quinasa ($0,001 \leq P \leq 0,0153$) (Figura 19E), con una disminución de actividad similar en los tres grupos por cada mg/dL de LDL-col (0,0856 a 0,1334 U/mg proteína). El mayor promedio de LDL-col se encontró en G1 (124 ± 43 mg/dL) (Figura 19F), presentando G2 un valor de 81 ± 38 mg/dL y G3 de 67 ± 17 mg/dL con diferencias significativas con G1 ($P < 0,01$).

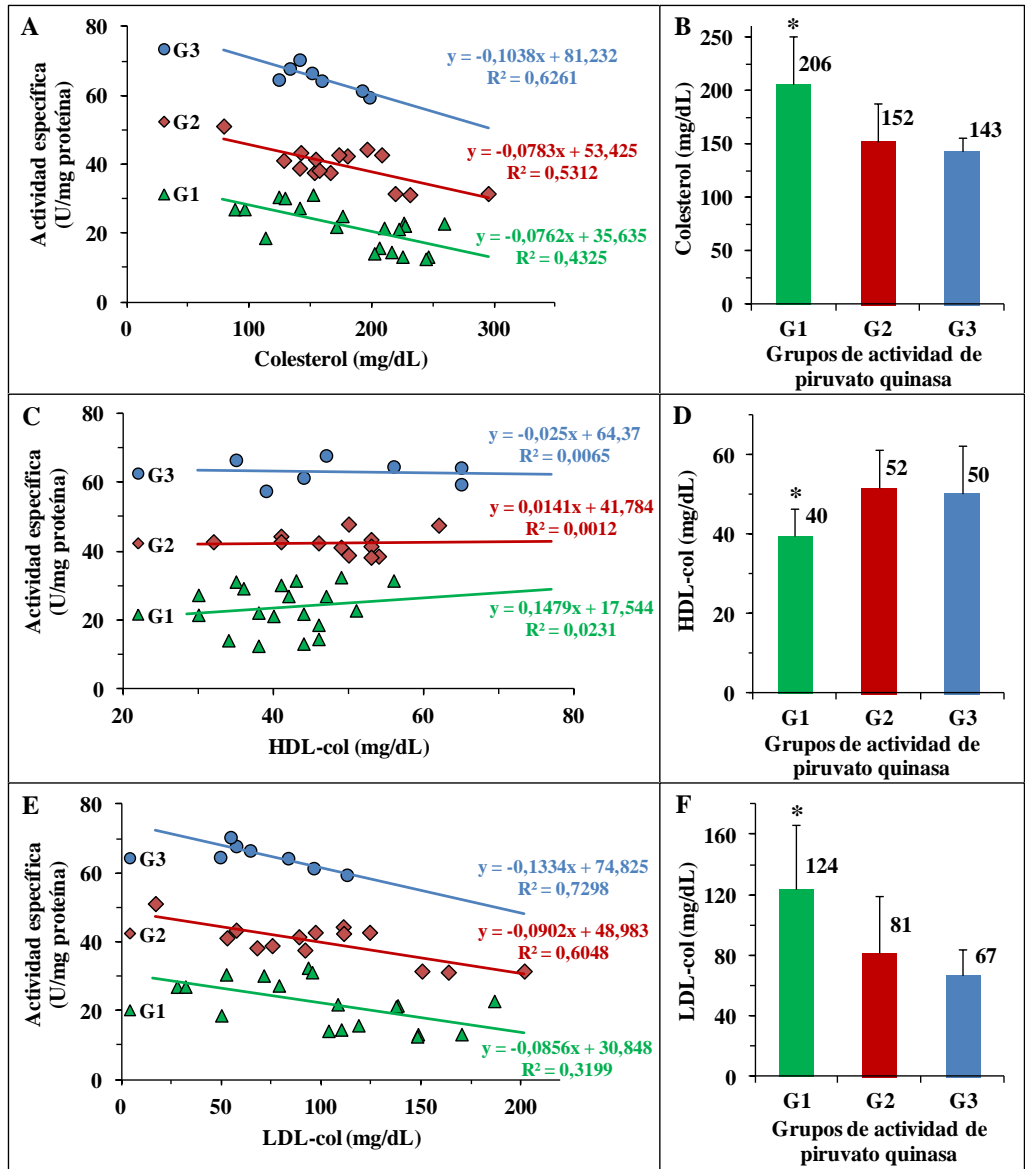


Figura 19. Correlación de la actividad de PK en los diferentes grupos de DD con los valores de colesterol, HDL-col y LDL-col, y promedios con la desviación estándar de estos parámetros clínicos en los diferentes grupos de actividad enzimática. A, C, E: Prueba de Regresión Lineal. **A)** Correlación con el colesterol: $0,0016 \leq P \leq 0,0341$. **C)** Correlación con HDL-col: $0,5344 \leq P \leq 0,9140$. **E)** Correlación con LDL-col: $0,001 \leq P \leq 0,0153$. **B)** Promedios de colesterol: ANOVA ($P = 0,0028$). Tukey: *Significativamente más alto que G2 y G3 ($P < 0,01$). **D)** Promedios con HDL-col.: ANOVA ($P = 0,0006$). Tukey: *Significativamente más bajo que G2 y G3 (G1-G2: $P < 0,001$; G1-G3: $P < 0,05$). **F)** promedios de LDL-col: ANOVA ($P = 0,0011$). Tukey: *Significativamente más alto que G2 y G3 ($P < 0,01$).

Valores normales: Colesterol < 200 mg/dL; HDL-col > 40 mg/dL; LDL-col < 100 mg/dL.

El VLDL-col (Figura 20A) y los triglicéridos (Figura 20C) solo presentaron correlación lineal negativa y significativa con la actividad enzimática en el grupo G1 ($P= 0,0112$; $P= 0,0166$, respectivamente), y se observó una tendencia también lineal negativa en los grupos G2 y G3 ($0,2487 \leq P \leq 0,3291$). Los promedios de ambos parámetros (Figura 20B y 20D) fueron significativamente mayores ($P < 0,05$) en G1 (VLDL: 37 ± 14 mg/dL; Triglicéridos: 194 ± 64 mg/dL) comparados con los promedios en G2 (VLDL: 25 ± 10 mg/dL; Triglicéridos: 133 ± 53 mg/dL).

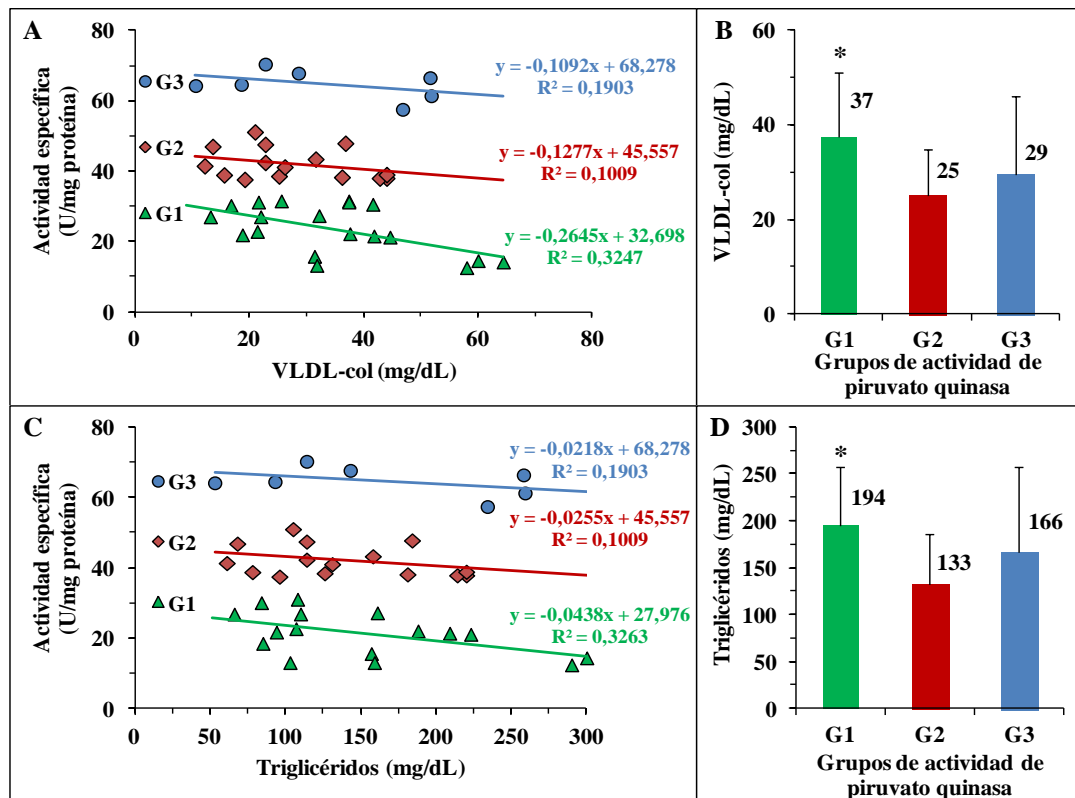


Figura 20. Correlación de la actividad de PK en los diferentes grupos de DD con los valores de VLDL-col y triglicéridos, y promedios con la desviación estándar de estos parámetros clínicos en los diferentes grupos de actividad enzimática. A, C: Prueba de Regresión Lineal. A) Correlación con VLDL: G1 ($P= 0,0112$), G2 ($P= 0,2611$), G3 ($P= 0,3291$). C) Correlación con triglicéridos: G1 ($P= 0,0116$), G2 ($P= 0,2487$), G3 ($P= 0,3279$). B) Promedios de VLDL: ANOVA ($P= 0,0451$). Tukey: *Significativamente más alto que G2 ($P < 0,05$). D) Promedios de triglicéridos: Prueba t Student: *Significativamente más alto que G2 ($P= 0,0081$).

Valores normales: Triglicéridos <150 mg/dL; VLDL-col < 35 mg/dL.

Los valores promedio con la desviación estándar de los parámetros del perfil lipídico, de acuerdo a los patrones de SSCP de donantes diabéticos en los diferentes grupos de actividad se muestran en la Figura 21. En general, se observa que los valores promedio de colesterol, LDL-col, VLDL-col y triglicéridos en todos los grupos de actividad enzimática, son más altos en los subgrupos con el patrón 2 de SSCP (Figura 21A, C, D, E), y el valor más alto en todos los casos, lo tiene el subgrupo G1 con P2 ubicado en la actividad baja de piruvato quinasa o subgrupo asociado a la diabetes mellitus. A su vez, el valor promedio más bajo de HDL-col (38 ± 6 mg/dL) (Figura 21B) se observa en dicho subgrupo [significativamente inferior ($0,0018 \leq P \leq 0,0081$) a G1(P1) y G2(P1, P2)]. Para colesterol y LDL-col (Figura 21A, 21C), los valores promedio de los subgrupos G1(P2) y G2(P2) (217 ± 37 y 136 ± 34 mg/dL; 187 ± 43 y 112 ± 38 mg/dL, respectivamente) fueron significativamente superiores ($0,0001 \leq P \leq 0,0389$ o $0,0408$) a los valores de los subgrupos con el patrón 1 de SSCP en G2 y G3 (133 ± 40 y 59 ± 37 mg/dL; 175 ± 33 y 89 ± 34 mg/dL, respectivamente). También se observa que el subgrupo con P1 en G1 tiene tendencia a tener valores promedio de colesterol y LDL-col superiores a los mismos subgrupos en G2 y G3.

Los resultados con VLDL-col y triglicéridos fueron similares a los de colesterol y LDL-col. Los valores promedio de los subgrupos G1(P2) y G2(P2) (39 ± 14 y 195 ± 69 mg/dL; 34 ± 9 y 170 ± 43 mg/dL, respectivamente) fueron, en este caso, significativamente superiores ($0,0018 \leq P \leq 0,0259$) a los valores de los subgrupos con el patrón 1 de SSCP en G1 y G2 (22 ± 5 y 112 ± 27 mg/dL; 20 ± 6 y 102 ± 28 mg/dL, respectivamente).

En general se observa que el grupo G1(P2) con mayor riesgo a la DMT2 tiene todos los valores del perfil lipídico alterados respecto a los valores del rango normal: valores altos de colesterol, LDL-col, VLDL-col y triglicéridos y valor bajo de HDL-col (Figuras 19 y 20).

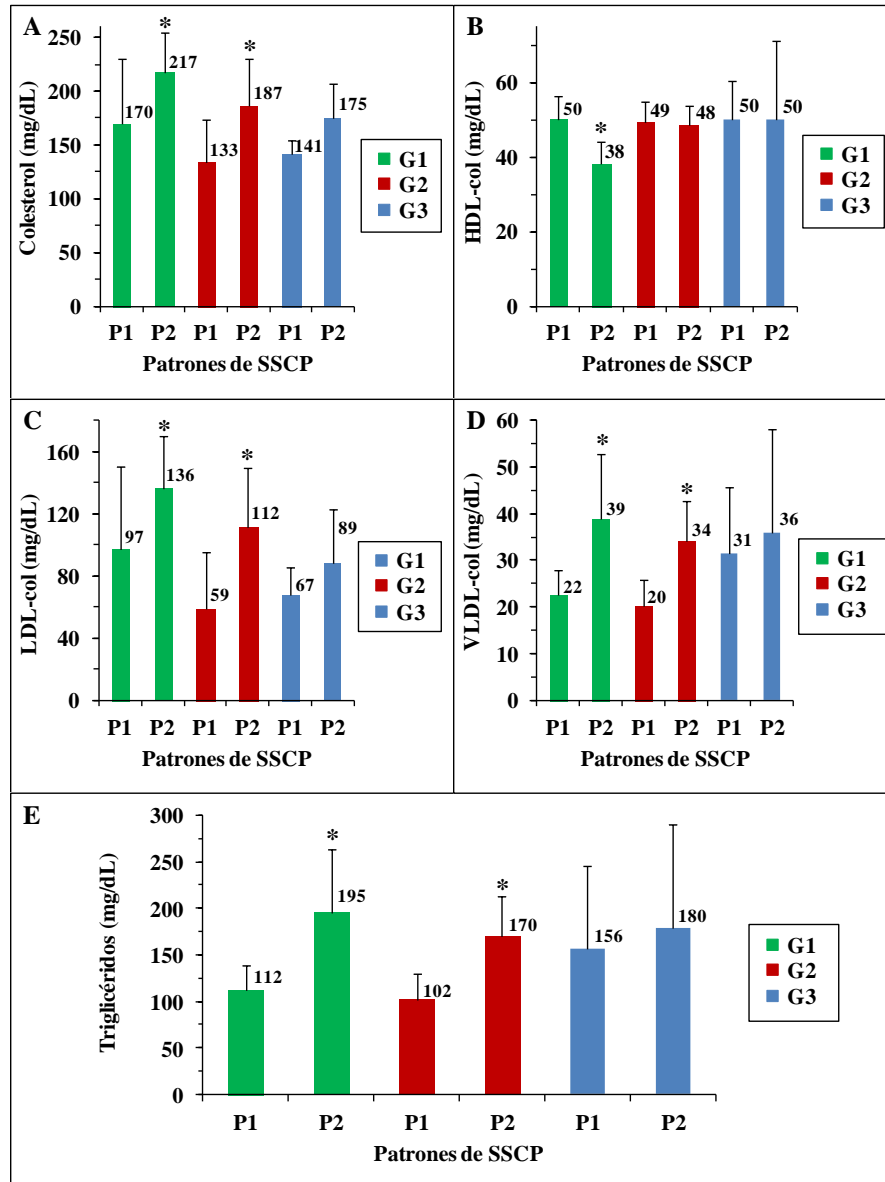


Figura 21. Valores promedio y desviación estándar de los parámetros del perfil lipídico en los diferentes grupos de actividad enzimática de DD de acuerdo a los patrones de SSCP. Se aplicó la Prueba t de Student en todos los casos. **A)** Valores promedio de colesterol. *Significativamente superior ($0,0001 \leq P \leq 0,0408$) a G2(P1) y G3(P1). **B)** Valores promedio de HDL-col. *Significativamente inferior ($0,0018 \leq P \leq 0,0081$) a G1(P1) y G2(P1 y P2). **C)** Valores promedio de LDL-col. *Significativamente superior ($0,0001 \leq P \leq 0,0389$) a G2(P1), G3(P1). **D)** Valores promedio de VLDL-col. *Significativamente superior ($0,0018 \leq P \leq 0,0259$) a G1(P1), G2(P1). **E)** Valores promedio de triglicéridos. *Significativamente superior ($0,0018 \leq P \leq 0,0259$) a G1(P1), G2(P1). Los valores deseables o normales de los parámetros lipídicos se especifican en las Figuras 19 y 20.

4.8 Correlación de la actividad enzimática de piruvato quinasa y los patrones de SSCP con los años de evolución y manifestación de la diabetes mellitus

En el análisis de los años de evolución de la enfermedad en los pacientes diabéticos se observa (Figura 22A) que el promedio de años en todos los grupos de actividad con el patrón 1 de SSCP (1 a 10 años) es inferior al promedio de años con el patrón 2 de SSCP (14 a 23 años). Los subgrupos G1(P1) y G2(P1) tuvieron un promedio de años con la enfermedad significativamente inferior a los demás subgrupos ($0,0001 \leq P < 0,05$). Sin embargo, en este aspecto lo más importante es determinar la edad a la cual se manifiesta la enfermedad en cada caso. En la Figura 22B se muestran los resultados del promedio de edad en cada subgrupo a la cual comienzan los primeros síntomas de la diabetes mellitus.

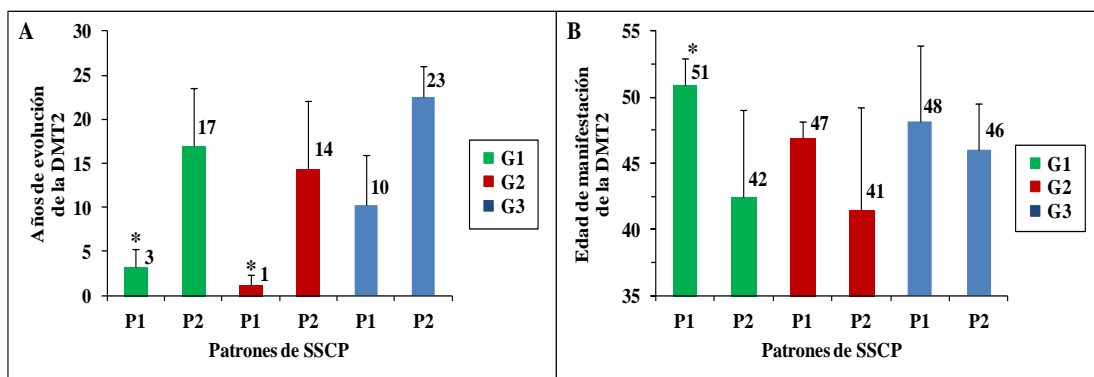


Figura 22. Correlación de la actividad enzimática de PK y los patrones de SSCP con la edad de la manifestación de la diabetes mellitus y años de evolución de la enfermedad. **A)** Años de evolución de la DMT2. *Significativamente inferior a todos los valores con P2. ANOVA ($P < 0,0001$). Tukey ($0,0001 \leq P < 0,05$). **B)** Edad de manifestación de la DMT2. *Significativamente superior a G1(P2). Prueba t Student ($P= 0,0338$).

En general, los subgrupos de actividad enzimática con el patrón 2 de SSCP tienen la tendencia a un comienzo más temprano de la enfermedad (41 a 46 años) en relación a los que poseen el patrón 1 de SSCP (51 a 48 años). En este sentido, el promedio de edad donde comienzan los síntomas de la diabetes en el G1(P2) (42 años), o subgrupo de mayor riesgo, es significativamente inferior ($P= 0,0338$) al promedio de G1(P1) (51 años).

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que en la población venezolana existe una alteración en la región promotora del gen *PKLR* que está asociada a la diabetes mellitus tipo 2. Con el uso de la técnica Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla (SSCP), se encontraron al menos tres variantes genéticas en el promotor de *PKLR*, y dos de ellas, correspondientes a los patrones 1 y 2 de SSCP, son las de mayor frecuencia y comunes en las cuatro poblaciones venezolanas estudiadas (DS, DD, DSCA y SCU de neonatos); siendo el patrón 2 de SSCP el más prevalente en la población diabética (61 %) y el que corresponde a la variante que está asociada a la diabetes mellitus tipo 2, con un riesgo de 6,22 veces mayor a sufrir la enfermedad en comparación con la población de DS (Tablas 2 y 3, Figura 8). La variación representada por el patrón 1 de SSCP es la más común en la población de donantes sanos (73%) y se encuentra relacionada con dicha población, confiriéndole 4,35 veces menos riesgo a sufrir la patología y posiblemente representa a la secuencia consenso y más prevalente en la población venezolana; igualmente, es el patrón más abundante en la población de DSCA (63 %) y en la SCU de los neonatos (50%). Los análisis estadísticos demuestran que los DSCA tienen más riesgo a la diabetes (~2 veces) que la población de DS, y no se encontró asociación de la variante menos común, y correspondiente al patrón 3 de SSCP, con alguna de las poblaciones y la diabetes. Por tanto, la técnica de SSCP podría utilizarse para detectar las variaciones descritas en el promotor de *PKLR* y el riesgo asociado con estas variantes para desarrollar diabetes mellitus, sobre todo, en los individuos con antecedentes familiares de la enfermedad.

Actualmente, el análisis de la región promotora de un gen, no es un estudio común en el diagnóstico molecular de las enfermedades y como resultado de esto, los

estudios de mutaciones en los promotores son escasos, por considerarse complejos de analizar, además de necesitar ensayos funcionales para probar la relación del polimorfismo en el promotor y una determinada enfermedad (De Vooght y Van Solinge, 2009). Ejemplos de enfermedades causadas por mutaciones en promotores son las β -talasemias (Hardison y cols., 2002), el síndrome de Benard-Soulier (Ludlow y cols., 1996) y la hemofilia (Reijnen y cols., 1992).

Los trabajos que han relacionado el riesgo a la DMT2 con polimorfismos en la región promotora del gen *PKLR* son escasos, pero el interés ha sido creciente ya que variaciones en esta región podrían afectar el proceso de transcripción y la expresión final de la piruvato quinasa, además de que este gen se encuentra en una región altamente polimórfica. Investigaciones relacionadas con el presente trabajo son los estudios hechos por Wang y cols. (2002) en una población de caucásicos del norte de Europa; analizaron la región promotora, exones e intrones circundantes y la región 3' no traducible de *PKLR* y estudiaron la asociación de cinco SNPs, un polimorfismo de inserción-delección, y un polimorfismo de repetición de trinucleótidos en pacientes con DMT2 y sujetos control de la misma población. Los resultados mostraron que variantes en el gen *PKLR* estaban asociadas con el incremento del riesgo a sufrir diabetes. Igualmente, en Venezuela se realizó un trabajo por Lugo (2011) para estudiar los cambios en el promotor proximal de los genes de la PKL y PKM de pacientes con DMT2 en comparación con donantes sanos. Los análisis de SSCP permitieron identificar dos haplotipos alterados en la secuencia del promotor de PKM y uno en el promotor de PKL para el grupo diabético.

Otras investigaciones, al igual que los análisis realizados en este trabajo, han utilizado la SCU de neonatos para estudiar variantes en promotores genéticos de enzimas y proteínas relacionadas con el metabolismo de la glucosa que podrían estar asociadas a la diabetes mellitus. En este sentido, Nones y cols. (2011), estudiaron el promotor proximal del gen de la glucoquinasa (*GCK*) en muestras de sangre de

cordón umbilical y demostraron que es altamente polimórfico, ya que la región estudiada presentó una alta variabilidad con tres alteraciones principales, las cuales podrían estar relacionadas con la DMT2. En otro estudio de sangre periférica y SCU (Torres, 2013) se detectó una región entre las posiciones -510 y +284 del gen *SLC2A2* que codifica al transportador de glucosa 2, y se encontraron cuatro polimorfismos en el promotor del gen, detectados en las diferentes poblaciones estudiadas; los resultados obtenidos demostraron estadísticamente que dos de los cuatro polimorfismos estaban asociados con un aumento del riesgo para sufrir diabetes mellitus.

En este trabajo, además de la detección de las variantes génicas en el promotor de *PKLR*, se analizó la actividad específica de PK para tratar de establecer la relación entre dichas variantes y la funcionalidad de la enzima. Se determinó que la actividad de piruvato quinasa tiene un rango amplio de valores en las diferentes poblaciones (Figura 12); posiblemente esta característica está relacionada al carácter poligenético de la DMT2, lo cual implicaría que diversos polimorfismos génicos podrían influir sobre la actividad de PK, además de las condiciones ambientales. Las actividades enzimáticas promedios encontradas en las diferentes poblaciones de sangre periférica (30 ± 13 a 37 ± 21 U/mg de proteínas) (Figura 12) son similares a las actividades (43 ± 8 a 53 ± 5 U /mg de proteínas) reportadas previamente por Luis y Martínez (2004); en dicho trabajo, también determinaron la existencia de dos poblaciones diabéticas genéticamente diferentes, un grupo tenía actividades de PK dentro de los valores normales de los DS, mientras que el otro grupo presentó actividades menores con respecto a la población control de DS.

De manera similar a lo reportado por Luis y Martínez (2004), las poblaciones analizadas en este trabajo parecen contener sub-poblaciones con distintas actividades de PK. En este sentido, la distribución de la actividad enzimática en tres grupos diferentes [baja (G1), intermedia (G2) y alta (G3)] de acuerdo al promedio de cada

población (Figuras 13 y 14), permitió demostrar que la actividad de PK está asociada con las variantes genéticas en el promotor de *PKLR*, sugiriendo que dichas variantes tienen efectos biológicos o están relacionadas con ellos. La actividad baja de la enzima es prevalente en la población de DD (50%) y la actividad media es más frecuente en la población de DS (54%) (Tabla 5, Figura 15). Los DSCA tienen similitud con la población de DD, con una prevalencia de la actividad baja de PK (49%) y la población de neonatos tiene igual prevalencia para la actividad baja y alta de la enzima (42%), siendo una población intermedia respecto a las demás, posiblemente porque representa a individuos con las características genéticas de las otras tres poblaciones (DD, DS, DSCA). La actividad alta de PK es la menos prevalente en todas las poblaciones (13-17%), de la misma forma que lo es la variante correspondiente al patrón 3 de SSCP.

Considerando a la población total, se demostró que la actividad baja de PK (G1, prevalente en los DD) está asociada a la variante del promotor de *PKLR* correspondiente al patrón 2 de SSCP (variante asociada a la DMT2); los individuos con dicha variante en el promotor tienen un riesgo 2,03 veces superior a tener actividad baja de PK en relación a los individuos que tienen las variantes correspondientes a los patrones 1 y 3 de SSCP (Tabla 8). Igualmente, se demostró que la variación representada por el patrón 1 de SSCP está asociada a la actividad intermedia de PK, o actividad prevalente en los DS; los individuos con esta variante tienen 1,4 veces más riesgo a tener dicha actividad intermedia de PK, antes que la actividad baja o alta de la enzima (Tabla 8). No se encontró asociación de la variante correspondiente al patrón 3 de SSCP con las diferentes actividades de PK, aunque se observó una tendencia a estar relacionada con la actividad alta; posiblemente se necesitan mayor número de muestras para encontrar alguna asociación, ya que es la variante menos frecuente en las poblaciones.

Después de demostrar la asociación entre las diferentes actividades de PK y las variaciones en el promotor de *PKLR*, también se requería demostrar la asociación de ambas variables con la diabetes mellitus. Por tanto, los análisis estadísticos determinaron que los individuos con actividad baja de PK y la variante en el promotor de *PKLR* correspondiente al patrón 2 de SSCP [G1(P2)] están asociados significativamente a la DMT2, con un riesgo de 3,81 veces mayor a sufrir la patología en relación a la población de DS (Tabla 10, DD-DS), y además, el subgrupo G1(P2) es prevalente en la población diabética (37%) (Tabla 9, Figura 16). Igualmente, los individuos con G2(P1) o actividad intermedia de PK y la variante del promotor de *PKLR* correspondiente al patrón 1 de SSCP están asociados a la población de DS, con una prevalencia en dicha población de 44% (Tabla 9, Figura 16), y un riesgo menor de 5,3 veces de sufrir de DMT2 en relación a la población diabética (Tabla 10, DD-DS). Los DSCA tienen aproximadamente la misma prevalencia (24-27%) de los subgrupos G1(P1), G1(P2) y G2(P1), por lo tanto, es una población con tendencias similares a la población diabética en los subgrupos de actividad baja de la enzima y similares a la población de DS en los subgrupos de actividad intermedia de PK. En SCU la prevalencia de G1(P2) (25%), o subgrupo asociado a la diabetes, es similar a la prevalencia de G2(P1) (29%) que corresponde al subgrupo asociado a la población sana, y nuevamente se refleja que esta población tiene características de las otras poblaciones.

No hay estudios hasta los momentos que correlacionen la actividad enzimática de PK con variaciones genéticas en el promotor del gen. Sin embargo, en la población venezolana se han hecho algunos trabajos dedicados a analizar la actividad enzimática de PK en pacientes diabéticos comparados con un control de donantes sin diabetes, que apoyan los resultados obtenidos en este trabajo sobre la relación de la variante en el promotor correspondiente al patrón 2 SSCP con la baja actividad enzimática y su prevalencia en la población diabética.

En un estudio de perfiles polipéptidos en células sanguíneas de pacientes con DM, se observó la disminución de un polipéptido con peso molecular compatible con la enzima PK (Adán y cols., 2002). Por otro lado, Luis y Martínez (2004), evidenciaron menores promedios de las actividades específicas de la PK en los extractos de células sanguíneas totales de los pacientes con DMT2 en relación a los obtenidos en el grupo control. Tomando estos reportes en conjunto, se planteó que al menos en un grupo significativo de pacientes con DM, la enzima PK podría estar menos expresada. En este sentido, Lugo (2011) sugirió que una posible explicación a la menor expresión de PK en pacientes con DM podría ser las alteraciones en los promotores proximales de los genes de las diferentes isoenzimas de la PK, ya que afectarían la unión de factores transcripcionales indispensables para la actividad de la ARN polimerasa. Los resultados obtenidos en el presente trabajo parecen corroborar dichos planteamientos, ya que se demuestra la asociación entre la variante en el promotor representada por el patrón 2 de SSCP y la baja actividad enzimática de PK, (ambas prevalentes en diabéticos), y además, la asociación de los individuos con esta variante en el promotor de *PKLR* y actividad baja de PK con la diabetes mellitus.

Al correlacionar los parámetros de laboratorio más importantes empleados en el control metabólico en individuos con DMT2 (glicemia, Hb A1c e insulina) con las diferentes actividades de PK y los patrones de SSCP, se demuestra que el valor promedio de insulina en los individuos con actividad baja de PK y patrón 2 de SSCP [G1(P2)], o individuos con mayor riesgo a la enfermedad (Figura 18C), es superior al valor promedio de todos los subgrupos, y significativamente superior a los promedios de insulina con el patrón 1 en todos los grupos de actividad enzimática. Al mismo tiempo, los individuos con actividad media y alta de PK y patrón 2 de SSCP [G2(P2) y G3(P2)] tienen también la tendencia a tener mayores valores de insulina que los individuos con la variante correspondiente al patrón 1 de SSCP en dichos grupos, por lo que podría considerarse una relación entre el patrón 2 de SSCP y mayores valores de insulina, principalmente en los individuos G1(P2) con el riesgo más alto a la

DMT2 (Figura 18C), y cuyo valor promedio de insulina ($10,8 \pm 3,3 \mu\text{U/mL}$) es superior al valor promedio del grupo control de DS ($9,8 \pm 2,6 \mu\text{U/mL}$) (Tabla 1), sugiriendo una tendencia al hiperinsulinismo en este subgrupo. Igualmente, también se encontró (Figura 18C) que los valores promedio de insulina en todos los subgrupos ($6,6-8,1 \mu\text{U/mL}$) a excepción de G1(P2) son inferiores al promedio de la población sana lo que podría indicar una cierta tendencia a la disfunción de las células β -pancreáticas en los individuos de estos subgrupos.

Los mayores valores de insulina en los subgrupos con actividad baja e intermedia de PK y patrón 2 de SSCP (Figura 18C), explicarían a su vez los menores valores de glicemia y Hb A1c detectados en estos subgrupos (Figuras 18A y 18B), comparados con los valores de insulina que tienen los individuos con el patrón 1 de SSCP. Por otra parte, el valor alto de insulina en G1(P2) (Figura 18C) explicaría también la mayor actividad de PK en los individuos con estas características, en comparación con los individuos que igualmente tienen baja actividad enzimática pero el patrón 1 de SSCP (Figura 18D).

También es interesante notar que los efectos de la hiperinsulinemia en G1(P2) sobre la disminución de la glicemia y Hb A1c y el aumento de la actividad de PK son relativos, ya que en el grupo G1 es donde la insulina ejerce la menor estimulación sobre la actividad específica de la enzima (Figura 17C). La actividad específica de PK aumenta sólo $0,73 \text{ U/mg}$ de proteínas por cada $\mu\text{U/mL}$ de la hormona en el grupo G1, en comparación a un aumento en G2 y G3 de $1,7$ y $2,2 \text{ U/mg}$ de proteínas, respectivamente; en relación con este efecto hormonal, se detecta que la actividad específica de PK disminuye en G1 de 2 a 3 veces más que en G2 y G3 con el aumento de cada mg/dL de glicemia y Hb A1c (Figuras 17A y 17B). Una posible explicación sería que la variante P2 en el promotor de *PKLR* está disminuyendo la acción estimuladora de hormona sobre la transcripción del gen y ello tendría un efecto importante para tener valores de glicemia y Hb A1c superiores a los valores

normales. Por otra parte, la variante P2 tendría una alta contribución a la sintomatología diabética en estos individuos ubicados en el subgrupo G1(P2). Esta condición provocaría la resistencia a la acción de la insulina a nivel de la glucólisis, originándose una mayor producción de la hormona (hiperinsulinismo) para tratar de revertir dicha resistencia, mediante su efecto estimulador en la expresión de *PKLR* y/o incorporación de glucosa a las células, según se ha reportado para la acción de la insulina sobre la expresión de PK y metabolismo de la glucosa (Yamada y Noguchi, 1999).

Por otra parte, es de suponer que a pesar de estar presente la variación correspondiente al P2 de SSCP en el promotor de *PKLR* asociada a la baja actividad de PK, hay otras variantes genéticas que contribuyen a suprimir este efecto, puesto que hay individuos que tienen el patrón 2 de SSCP pero con actividad intermedia y alta de PK, así como también, deben existir otras variantes diferentes a la variación correspondiente a P2 de SSCP que contribuyen a la baja actividad enzimática, ya que hay individuos con el patrón 1 de SSCP que tienen actividad baja de PK (Figura 18). Estas explicaciones igualmente son aplicables a las poblaciones de DS, DSCA y SCU, puesto que hay individuos que tienen el patrón 2 de SSCP con actividad baja, intermedia y alta de PK y no sufren de diabetes mellitus, e individuos con el patrón 1 de SSCP que tienen actividad baja de PK. Algunos de los aspectos que pueden afectar la actividad final de PK diferentes a las variaciones en el promotor de la enzima podrían ser variaciones en los factores de transcripción involucrados en la expresión de PK, de igual forma que se ha descrito para la diabetes tipo MODY y su relación con las variaciones en el factor de transcripción HNF-1 α (Wang y cols., 2000a; Shih y cols., 2001).

Todas las posibilidades descritas anteriormente sugieren la existencia de polimorfismos genéticos que influirían en la actividad de PK y podrían estar en desequilibrio de ligamiento con la variante en el promotor de *PKLR* relacionada con

el P2 de SSCP, y por esa razón, individuos con dicho patrón no tienen actividad baja de PK. En este sentido, se ha reportado que polimorfismos en el gen que codifica al transportador de glucosa 2 y el gen que codifica al complejo proteico de sulfonilurea (SUR1) están en desequilibrio de ligamiento y asociados al desarrollo de DMT2 (Laukkanen y cols., 2005; Kilpeläinen y cols., 2007); ambos genes se encuentran relacionados con el metabolismo de la glucosa y secreción de insulina por las células β -pancreáticas y algunos polimorfismos en cualquiera de los dos genes influyen sobre la secreción de la hormona. También en estos trabajos determinaron a un haplotipo que contenía cuatro polimorfismos en desequilibrio de ligamiento en el gen del transportador de glucosa 2 relacionados con diabetes mellitus (rs5393, rs5394, rs5400, rs5404), y dos de esos polimorfismos en el promotor del gen, protegían a los individuos para el desarrollo de la patología o una sintomatología severa. Este podría ser el caso de los individuos diabéticos que tienen el patrón 2 de SSCP pero con actividad intermedia y alta de PK, o los individuos que tienen dicho patrón en las poblaciones analizadas que no sufren de diabetes mellitus.

Otra posibilidad que no puede descartarse es que la resistencia a la insulina y el hiperinsulinismo en el subgrupo G1(P2) se deba a otra condición diferente a la variante P2 en el promotor *PKLR* ya descrita. Por ejemplo, una interacción deficiente de la hormona con su receptor, provocaría una disminución de los posteriores eventos de señalización, y por lo tanto, todas las funciones de la hormona se verían afectadas, incluyendo el efecto sobre los procesos de transcripción genética y traducción de proteínas, entre ellos los de PK. Con esta condición, en la mayoría de los tejidos no hepáticos se vería afectado el ingreso de glucosa al disminuir los transportadores de glucosa a la membrana, ya que son activados por la insulina, mientras que en el hígado, el ingreso de glucosa disminuiría dramáticamente debido a la inhibición de las actividades de las enzimas glucoquinasa, fosfofructoquinasa-1 (PFK-1) y piruvato quinasa, enzimas claves reguladoras de la glucólisis y controladas por la insulina

mediante reacciones de fosforilación-desfosforilación, donde están involucradas la proteína quinasa A (PKA) y fosfofructoquinasa-2 (PFK-2) (King, 2015).

Aunque los promedios de los parámetros del perfil lipídico de la población diabética no fueron significativamente diferentes a los promedios de la población sana (Tabla 1), se hicieron los análisis de correlación de dichos parámetros con la actividad específica de PK y las variantes en el promotor de *PKLR* en la población de DD, con la finalidad de observar si había diferencias en los parámetros lipídicos de acuerdo a estas variables relacionadas con el metabolismo de la glucosa. En este sentido, se demostró que la actividad de piruvato quinasa también tiene correlación con los parámetros lipídicos en la población de DD (Figuras 19 y 20). El colesterol, VLDL-col, LDL-col y triglicéridos tienen correlaciones lineales negativas con la actividad específica de PK, y para el grupo G1, de baja actividad enzimática y donde se encuentra el subgrupo G1(P2) de mayor riesgo a la diabetes, todas las correlaciones son significativas, además de tener los promedios de estos parámetros significativamente más altos con relación a los grupos G2 y G3 de actividad enzimática intermedia y alta. En el grupo G1 los valores de dichos parámetros son superiores a los valores considerados normales, en cambio, los grupos G2 y G3 tienen los valores en el rango normal a excepción de los triglicéridos en G3. El valor de HDL-col en G1 (40 mg/dL) se encuentra en el límite del valor normal y es significativamente más bajo que en los grupos G2 y G3 (≥ 50 mg/dL). Los resultados muestran que el grupo G1 de mayor riesgo a sufrir de diabetes mellitus tiene alterado el perfil lipídico, indicando fallas en el metabolismo de los lípidos y lipoproteínas.

Al realizar el análisis de los parámetros lipídicos en relación a la actividad enzimática de PK pero considerando las variantes en el promotor de *PKLR*, se demostró que el subgrupo G1(P2) de mayor riesgo a sufrir de diabetes mellitus, es el responsable para que los valores del perfil lipídico del grupo G1 se encuentren fuera del rango normal. Los valores promedio de colesterol, LDL-col, VLDL-col y

triglicéridos en todos los grupos de actividad enzimática, son más altos en los subgrupos con el patrón 2 de SSCP (Figura 21), y el subgrupo G1 con P2 ubicado en la actividad baja de piruvato quinasa o subgrupo asociado a la diabetes mellitus tiene los valores más altos fuera del rango normal en relación a todos los subgrupos. A su vez, el valor promedio más bajo de HDL-col (38 mg/dL) lo tiene dicho subgrupo.

El índice de Triglicéridos/HDL-col es un marcador de resistencia insulínica y del predominio de las LDL pequeñas y densas, altamente aterogénicas, el valor normal debe ser menor a 3,5 (Brites y cols., 2013). El subgrupo que tiene el mayor índice de resistencia insulínica es el G1(P2), con un valor de 5,13, seguido por G3(P2) con un índice de 3,6 y G2(P2) con 3,54. Todos los subgrupos que tienen la variante correspondiente al patrón 1 de SSCP tienen índices inferiores a 3,5 (2,1 a 3,1). Los resultados de la relación del perfil lipídico con la actividad de PK y las variantes en el promotor de *PKLR* de los DD, demuestran que los individuos que tienen la variante en el promotor de *PKLR* correspondiente al patrón 2 de SSCP tienen resistencia a la insulina en diferentes grados. Los individuos con el mayor nivel de resistencia a la hormona son los del subgrupo G1(P2) de baja actividad enzimática o de mayor riesgo a la diabetes; los subgrupos G2(P2) y G3(P2) de actividad de PK media y alta tienen un nivel de resistencia similar y menor a G1(P2). Asimismo, el índice de Castelli o de Riesgo Cardiovascular (Colesterol total/HDL-col, debe ser $\leq 4,5$) (Brites y cols., 2013) predice que el subgrupo G1(P2) con un índice de 5,7 tiene un alto riesgo de enfermedad cardiovascular y de eventos coronarios fatales.

El mayor desorden metabólico del subgrupo G1(P2), determinado por los componentes genéticos y seguramente también ambientales, debe ser la causa de que la diabetes mellitus se manifieste significativamente a una edad más temprana (42 años) que los individuos en el mismo grupo G1 pero con el patrón 1 de SSCP (51 años) (Figura 22). También se observa en el grupo G2 la tendencia de los individuos

con el P2 de SSCP (tienen un nivel de resistencia a la insulina) a tener síntomas de la enfermedad a una edad inferior a los que poseen el patrón 1 de SSCP.

Los resultados de la alteración del perfil lipídico en el grupo de individuos con mayor riesgo a la diabetes están de acuerdo con la condición de dislipidemia muy frecuente y conocida en pacientes con diabetes. Las alteraciones lipídicas que son reportadas como características de los individuos diabéticos consisten en aumento de los niveles plasmáticos de triglicéridos, de las VLDL-col, disminución de la concentración de HDL-col, persistencia de IDL-col en el plasma en ayunas y presencia de LDL-col modificadas (LDL pequeña y densa, LDL oxidada y LDL glicada, entre otras) (Brites y cols., 2013).

El descontrol en el perfil lipídico por alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos se puede explicar por los efectos de la insulina sobre enzimas que regulan el metabolismo de los lípidos y lipoproteínas. La dislipidemia en el subgrupo G1(P2) debe estar relacionada con el alto nivel de resistencia a la insulina en este subgrupo. Si la variante en el promotor de *PKLR* (P2 de SSCP) es responsable de la resistencia a la hormona por disminución del funcionamiento de la glucólisis, entonces también es responsable indirectamente de la dislipidemia. La insulina tiene una acción inhibitoria sobre la lipoproteína lipasa (LPL) de los adipocitos, la cual cataliza la liberación de ácidos grasos a la circulación, la condición de resistencia a la hormona del G1(P2) debe disminuir este efecto inhibitorio sobre la LPL, y el resultado es un aumento de la actividad de la enzima y de ácidos grasos libres. Por otra parte, los hepatocitos en el hígado permanecen sensibles a la insulina y la condición de hiperinsulinismo en G1(P2) debida a la resistencia hormonal estimula la síntesis de las proteínas apo B100, componentes de la lipoproteínas VLDL. Esta respuesta, en combinación con la mayor llegada de ácidos grasos libres al hígado, determina el aumento en la tasa de síntesis y secreción de VLDL, e incluso condiciona la formación de un tipo de VLDL enriquecidas en triglicéridos. Las

VLDL nativas, podrían ser remodeladas por la vía de la proteína transportadora de colesterol esterificado (CETP), generando VLDL ricas en colesterol, las cuales serían reconocidas e internalizadas por los macrófagos, o catabolizadas a IDL y posteriormente a LDL, lipoproteína que también es remodelada vía CETP, generando así LDL relativamente enriquecidas en triglicéridos, las cuales representan un buen sustrato para la lipasa hepática (LH), resultando de esta manera LDL pequeñas y densas. El resultado final es un aumento de colesterol, LDL-col, VLDL-col y triglicéridos por causa de la resistencia a la insulina y la condición de hiperinsulinismo. Por otro lado, los niveles de HDL-col se ven afectados y disminuidos debido al aumento de la actividad de la CETP, la obesidad del paciente y la hipertrigliceridemia, lo cual lleva a un aumento de actividad de la LH, enzima capaz de catabolizar a las HDL (Brites y cols., 2013).

No hay estudios que correlacionen la actividad de PK con los parámetros que evalúan el perfil lipídico. Sin embargo, en la década de los 90 se documentó que en el hígado de ratas que han sido alimentadas con una dieta alta en carbohidratos que contiene ácidos grasos poliinsaturados, disminuyen los niveles del ARNm de PKL y la actividad de la enzima en 60 y 70%, respectivamente (Jump y cols., 1994; Iritani y cols., 1995), y además, los ácidos grasos poliinsaturados inhiben los efectos estimulatorios de la insulina y glucosa sobre dichos parámetros (Liimatta y cols., 1994). En este sentido, no se puede descartar que los mayores niveles de ácidos grasos en G1(P2) también contribuyan a una inhibición de la actividad de PK por un control negativo sobre elementos de respuesta en el promotor de *PKLR*.

El hecho de que este trabajo implicó un estudio genético sobre la diabetes mellitus y que es una enfermedad que tiene un componente hereditario además del ambiental, la población de donantes sanos usada como control no debía contener a individuos con antecedentes familiares de diabetes mellitus. En este sentido, también se incluyó dentro del estudio a una población de donantes sanos con antecedentes

familiares de la enfermedad a manera de comparar y observar las diferencias entre ambas poblaciones sanas y la población diabética. En forma general, los resultados obtenidos muestran que la población diabética tiene mayor similitud o menor diferencia en las variantes del promotor de *PKLR* y actividad de PK con la población de DSCA que con la población de DS, y además no se detectó el patrón 3 de SSCP en ninguna de las dos poblaciones. Por tanto, el componente genético relacionado con la piruvato quinasa y asociado a la diabetes está con mayor frecuencia en la población de DSCA que en la población de DS, y ello implica un mayor riesgo a padecer la enfermedad en esta población con antecedentes, además de la dificultad cada vez mayor para encontrar individuos totalmente libres de tener una relación con la diabetes mellitus.

De los resultados obtenidos con los DSCA se deduce que en investigaciones relacionadas con la determinación de variables asociadas a diabetes mellitus, los donantes empleados como grupo control deben clasificarse en función de los antecedentes familiares, principalmente en estudios sobre DMT2, ya que además del componente ambiental, tiene una relación más estrecha con los antecedentes familiares y la descendencia que la DMT1; de igual manera se conoce que existe una alta frecuencia de DM entre familiares de pacientes diagnosticados con esta enfermedad (ADA, 2013).

Las muestras de SCU representan a una población general y en los análisis de las variantes genéticas se detectaron los mismos patrones que en las poblaciones de sangre periférica, incluyendo el patrón 3 de SSCP encontrado solo en DS (Figuras 6, 7 y 8). Las prevalencias de dichos patrones reflejan que son una combinación de las poblaciones de sangre periférica, es decir, neonatos que serán: sanos, sanos con antecedentes familiares de diabetes y diabéticos. Por lo tanto, la estandarización de esta técnica en SCU permite la detección de variantes en el promotor de *PKLR* asociadas a la diabetes mellitus a temprana edad y el riesgo genético a sufrir la

patología, permitiendo tomar a tiempo las medidas correctivas. Igualmente, la técnica de detección de polimorfismos en SCU asociados a la diabetes mellitus representa un aporte para el control de calidad de células madre obtenidas a partir de SCU y utilizadas en diversas terapias.

Algunas investigaciones genéticas en SCU han llegado a la misma conclusión que la obtenida en este trabajo. En los estudios realizados por González y cols. (2009) demostraron que el análisis de regiones génicas correspondientes a los promotores de los genes de PKM y PKL, puede dar información de gran utilidad para la selección de donaciones de sangre de cordón umbilical para terapia celular. Mientras que Torres (2013), demostró que la metodología desarrollada en su estudio puede ser aplicable en muestras de SCU, detectándose polimorfismos en el promotor del gen de GLUT2, que según los análisis de asociación pueden estar implicados en aumentar el riesgo para desarrollar la diabetes mellitus.

Los análisis de SCU también demuestran que la actividad promedio de PK es de 21 ± 8 U/mg de proteínas, significativamente menor a la observada en sangre periférica y representando aproximadamente la mitad de la actividad de los DS (Figura 12). Al igual que en sangre periférica se determinaron tres grupos de actividad (baja, media y alta) (Figuras 13 y 14) y la mayor cantidad de neonatos con antecedentes familiares de diabetes mellitus están ubicados en el grupo G1 de actividad baja de la enzima, es decir, serían individuos con alto riesgo a padecer la enfermedad en edad adulta; este hecho guarda relación con la población diabética en el sentido de que el mayor número de individuos están ubicados en actividad baja de la enzima y es el grupo con mayor riesgo. En este sentido, los parámetros bioquímicos de actividad enzimática también serían útiles en SCU para pronosticar el riesgo a padecer diabetes mellitus en edad adulta.

Los resultados reportados por Casanova y Cantero (2010) sobre la actividad de PK en muestras de SCU fueron similares a los encontrados en este trabajo y también determinaron una actividad de la enzima más baja que en sangre periférica. Las diferencias encontradas entre las actividades enzimáticas de sangre periférica y SCU podrían explicarse por las diferencias que existen en la composición celular entre ambas muestras. Por ejemplo, en la actividad de PK de un extracto celular total de sangre periférica tiene una alta contribución la PK eritrocitaria, mientras que los eritrocitos de SCU contienen casi exclusivamente hemoglobina fetal, por lo tanto, debería haber mayor actividad enzimática de PK en humanos adultos que en SCU.

Existen reportes sobre la determinación de algunos parámetros bioquímicos en SCU que también sugieren diferencias con el funcionamiento celular adulto. En uno de estos trabajos estudiaron las diferencias en el ritmo de actividad enzimática en sangre materna y fetal, para ello, determinaron la actividad de las enzimas hexosaminidasa (Hex), fosfatasa alcalina total y β galactosidasa (Peleg y cols., 2000). Concluyeron que la actividad enzimática fetal no es específica de una clase determinada de enzimas y depende del desarrollo del feto, con una transmisión deficiente del control del ritmo enzimático por parte de la madre. Otro trabajo implica a la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y está relacionado indirectamente con PK al compartir el piruvato como un componente común en ambas reacciones enzimáticas. El aumento de lactato y de la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) en SCU han sido ampliamente reportados en casos de hipoxia de diversos grados e incluso se encuentran entre los predictores valiosos de hipoxia, únicamente superados por la actividad de isoenzimas de creatina quinasa (Esqué y cols., 1985). En este caso, el aumento de la actividad de LDH debería estar relacionado con una disminución de la actividad de PK en SCU.

Los resultados de este trabajo demostraron que existe una alteración en el promotor del gen *PKLR* asociada a baja actividad enzimática y que a su vez tiene una

fuerte asociación con la diabetes mellitus, con una contribución importante en el riesgo a sufrir la patología, independientemente de que existan otras variantes génicas involucradas, por lo tanto, el gen *PKLR* podría ser un fuerte candidato para ser utilizado como uno de los posibles marcadores genéticos para detectar predisposición a la diabetes mellitus. Con esta condición se podrían aplicar medidas preventivas y desarrollar nuevos tratamientos dirigidos a mejorar la calidad de vida del paciente con DM tipo 2.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. CONCLUSIONES:

- Utilizando la técnica SSCP, se detectaron tres patrones genéticos diferentes en la región amplificada de *PKLR*, dos de ellos presentes en todas las poblaciones estudiadas y el tercer patrón sólo en DS y SCU.
- El patrón P2 es prevalente en la población de DD, se demostró que está asociado a la baja actividad enzimática de PK (G1) y ambos mostraron una alta asociación con la DMT2. Los individuos con la característica G1(P2) tienen un riesgo aumentado a la enfermedad, con tendencia al hiperinsulinismo y alteración en todos los parámetros del perfil lipídico, todo lo cual puede ser consecuencia de la condición de resistencia a la insulina. Estos individuos presentaron los primeros síntomas de la DMT2 a una edad más temprana.
- El patrón P1 fue el más prevalente en la población de DS, está asociado a la actividad enzimática intermedia de PK (G2) y a su vez, ambos tienen asociación con la población de DS. Los individuos con la característica G2(P1) tienen menos riesgo a sufrir la patología.
- Los DSCA presentaron resultados intermedios, entre la población de los DD y DS y tienen mayor riesgo a sufrir de diabetes mellitus que la población de DS, sugiriendo que es necesario clasificar a los donantes sin diabetes, con y sin antecedentes familiares de la enfermedad, para realizar análisis genéticos.
- La metodología desarrollada demostró ser aplicable en muestras de SCU. Esta técnica ofrece el conocimiento a temprana edad del riesgo genético a sufrir la patología, permitiendo tomar a tiempo las medidas correctivas, además podría ser un aporte para el control de calidad de células madre obtenidas de dicha muestra y utilizadas en diversas terapias.

- La variante en el promotor de *PKLR* representada por el patrón 2 de SSCP, está fuertemente asociada a la diabetes mellitus, por lo cual constituye uno de los posibles marcadores genéticos para detectar predisposición a esta patología, y con ello, aplicar las medidas preventivas o desarrollar nuevos tratamientos.

2. RECOMENDACIONES

A continuación se plantean algunas consideraciones a seguir en la línea de trabajo:

- Para validar las variaciones genéticas encontradas en el promotor del gen *PKLR* como marcadores moleculares de la diabetes mellitus, y su efecto sobre la actividad enzimática de la piruvato quinasa, es necesario realizar el estudio a gran escala en la población.
- Realizar la secuenciación de los productos de PCR amplificados para establecer la posición y tipo de variación observada en la secuencia estudiada.
- Es importante explorar el análisis de polimorfismos hacia la secuencia codificante del gen *PKLR* para ver los efectos sobre el procesamiento del ARNm o en la secuencia de la proteína traducida.
- El análisis debe ser extendido a otros genes candidatos para desarrollar diabetes y tratar de establecer la asociación entre los diferentes polimorfismos intergénicos y su relación con la patología.

BIBLIOGRAFÍA

- Adán C, Araujo L, Ferreras A, Bandeira E, Ramírez N, Salas J, Cayama E, Triana J, Triana Alonso F. (2002). Alteración de patrones polipeptídicos en leucocitos de pacientes con Diabetes Mellitus. *Acta Científica Venezolana, LII Convención Anual de AsoVAC*. p 50.
- American Diabetes Association (ADA)*. (2010). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 33: S62-69.
- American Diabetes Association*. (2013). Aspectos genéticos de la diabetes. Disponible en: <http://www.diabetes.org/es/informacion-basica-de-la-diabetes/aspectos-genticos-de-la-diabetes.html#sthash.vrebmTDU.dpuf>
- American Diabetes Association (ADA)*. (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 37(1): S81-90.
- American Diabetes Association (ADA)*. (2016). Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*. 39(1):S13–22.
- An ZW, Xie LL, Cheng H, Zhou Y, Zhang Q, He XG, Huang HS. (2009). A silver staining procedure for nucleic acids in polyacrylamide gels without fixation and pretreatment. *Anal Biochem*. 391(1): 77-79.
- Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD). (2013). Epidemiología de la diabetes tipo 2 en Latinoamérica. En: *Guías ALAD sobre el Diagnóstico, Control y Tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2 con Medicina Basada en Evidencia*. Capítulo 1, p: 17-23.

- Brites F, Meroño T, Boero L, Menafrá M, Gómez L. (2013). Lípidos y Lipoproteínas. Características, Fisiología y Acciones Biológicas. Fisiopatología y Diagnóstico Bioquímico de las Dislipemias. *Curso de Capacitación de Posgrado a Distancia Síndrome Metabólico y Riesgo Vascular*. FEPREVA. Buenos Aires, Argentina.
- Brownlee M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 414(6865): 813-820.
- Casanova D, Cantero V. (2010). Actividad de piruvato quinasa y estructura del promotor del gen *PKLR* en células de SCU. *Trabajo de investigación presentado para optar al título de Médico Cirujano*. Universidad de Carabobo Sede Aragua.
- Chalkley SM, Hettiarachchi M, Chisholm DJ, Kraegen EW. (2002). Long-term high-fat feeding leads to severe insulin resistance but not diabetes in Wistar rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 282(6):E1231-1238.
- Cipriani A, Galvis L, Lugo J. (2006). Análisis comparativo de la expresión de actividades enzimáticas en células sanguíneas de pacientes con diabetes tipo 2 e individuos sanos. *Trabajo de investigación presentado para optar al título de Médico Cirujano*. Universidad de Carabobo Sede Aragua.
- Da Silva Xavier G, Leclerc I, Salt IP, Doiron B, Hardie DG, Kahn A, Rutter GA. (2000). Role of AMP-activated protein kinase in the regulation by glucose of islet beta cell gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97:4023–4028.
- Das SK, Elbein SC. (2007). The search for type 2 diabetes susceptibility loci: the chromosome 1q story. *Curr Diab Rep*. 7(2): 154-64.

- De Vooght K, Van Solinge W. (2009). Gene promoter analysis in molecular diagnostics: do or don't? *Expert Rev Mol Diagn.* 9(5): 403-405.
- Delaney M, Cutler CS, Haspel RL, Yeap BY, McAfee SL, Dey BR, Attar E, Kao G, y cols. (2009). High-resolution HLA matching in double-umbilical-cord-blood reduced-intensity transplantation in adults. *Transfusion.* 49(5): 995-1002.
- Esqué MT, Baraibar R, Figueras J, Maurí E, Moretones MG, Padula C, Posa J, Zuásnabar MA. (1985). Multicenter study of asphyxia neonatorum. *Ann Esp Pediatr.* 23(8): 542-550.
- Fajans SS, Bell GI, Bowden DW, Halter JB, Polonsky KS. (1994). Maturity-onset diabetes of the young. *Life Sci.* 55: 413–422.
- Fajans SS, Bell GI, Polonsky KS. (2001). Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med.* 345: 971-980.
- Gasser RB, Hu M, Chilton NB, Campbell BE, Jex AJ, Otranto D, Cafarchia C, Beveridge I, Zhu X. (2006). Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for the analysis of genetic variation. *Nat Protoc.* 1(6): 3121-3128.
- González C, González G, Hernández O. (2009). Análisis de promotores para piruvato quinasa en células madre y su potencial uso en terapia de diabetes mellitus. *Trabajo de investigación presentado para optar al título de Médico Cirujano.* Universidad de Carabobo Sede Aragua.
- Groop L, Forsblom C, Lehtovirta M, Tuomi T, Karanko S, Nissén M, Ehrnström BO, Forsén B, y cols. (1996). Metabolic consequences of a family history of

NIDDM (the Botnia study): evidence for sex-specific parental effects. *Diabetes*. 45: 1585-1593.

Hardison RC, Chui DHK, Giardine B, Riemer C, Patrinos GP, Anagnou N, Miller W, Wajcman H. (2002). HbVar: a relational database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations at the globin gene server. *Human mutation*. 19(3): 225-233.

Imamura K, Noguchi T, Tanaka T. (1986). En Markers of Human Neuroectodermal Tumors (Staal GE, Van Veelen CWM, eds). p: 191-222.

Imamura M, Maeda S. (2011). Genetics of type 2 diabetes: the GWAS era and future perspectives. *Endocr J*. 58(9): 723-739.

International Diabetes Federation (IDF). (2015). IDF Diabetes Atlas. Seventh edition. p: 86.

Iritani N, Fukuda H, Tada K, Itoh A, Noguchi T. (1995). Diet differentially regulates glucokinase and L-type pyruvate kinase gene expression in rat liver. *J Nutr*. 125: 2945–2952.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, y cols. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 418: 41-49.

Jump DB, Clarke SD, Thelen A, Liimatta M. (1994). Coordinate regulation of glycolytic and lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res*. 35(6): 1076-1084.

- Kadowaki T, Kadowaki H, Mori Y, Tobe K, Sakuta R, Suzuki Y, Tanabe Y, Sakura H, y cols. (1994). A subtype of diabetes mellitus associated with a mutation of mitochondrial DNA. *N Engl J Med.* 330: 962-8.
- Kilpeläinen TO, Lakka TA, Laaksonen DE, Laukkanen O, Lindström J, Eriksson JG, Valle TT, Hämäläinen H, y cols. (2007). Physical activity modifies the effect of SNPs in the SLC2A2 (GLUT2) and ABCC8 (SUR1) genes on the risk of developing type 2 diabetes. *Physiol Genomics.* 31: 264–272.
- King H, Aubert RE, Herman WH. (1998). Global burden of diabetes, 1995–2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care.* 21: 1414–1431.
- King M. (2015). Introducción a las Actividades de Insulina. Disponible en: <http://www.themedicalbiochemistrypage.com/es/insulin-sp.php>
- Koblas T, Harman SM, Saudek F. (2005). The application of umbilical cord blood cells in the treatment of diabetes mellitus. *Rev Diabet Stud.* 2(4): 228-234.
- Laukkanen O, Lindström J, Eriksson J, Valle TT, Hämäläinen H. (2005). Polymorphisms in the SLC2A2 (GLUT2) gene are associated with the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes. The Finnish Diabetes Prevention Study. *Diabetes.* 54: 2256-2260.
- Le Roith D, Quon MJ, Zick Y. (2003). Molecular and cellular aspects of insulin resistance: Implications for diabetes. En: Signal Transduction and Human Disease. Editor: Finkel, T., Gutkind, J. S. Hoboken, New Jersey Wiley-Interscience, p: 171-200.

- Liimatta M, Towle HC, Clarke S, Jump DB. (1994). Dietary polyunsaturated fatty acids interfere with the insulin/glucose activation of L-type pyruvate kinase gene transcription. *Mol. Endocrinol.* (8): 1147–1153.
- Lin Y, Sun Z. (2010). Current views on type 2 diabetes. *J Endocrinol.* 204(1): 1-11.
- Liu M, Han ZC. (2008). Mesenchymal stem cells: biology and clinical potential in type 1 diabetes therapy. *J Cell Mol Med.* 12(4): 1155-1168.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1995). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Biol Chem.* 193: 265-275.
- Ludlow LB, Schick BP, Budarf ML, Driscoll DA, Zackai EH, Cohen A, Konkle BA. (1996). Identification of a mutation in a GATA binding site of the platelet glycoprotein Ib promoter resulting in the Bernard-Soulier syndrome. *J Biol Chem.* 271: 22076–22080.
- Lugo E. (2011). Alteraciones moleculares en los promotores de los genes de piruvato quinasa L y M de pacientes diabéticos tipo 2 y donantes sanos. *Trabajo de Grado presentado para optar al título de Magíster en Ciencias Biomédicas, Mención Bioquímica y Biología Molecular.* Universidad de Carabobo Sede Aragua.
- Luis A, Martínez M. (2004). Actividad de la enzima piruvato kinasa en células sanguíneas de pacientes con diabetes mellitus. *Trabajo de investigación presentado para optar al título de Licenciado en Bioanálisis.* Universidad de Carabobo Sede Aragua.

- Lyssenko V, Jonsson A, Almgren P, Pulizzi N, Isomaa B, Tuomi T, Berglund G, Altshuler D, y cols. (2008). Clinical risk factors, DNA variants, and the development of type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 359: 2220-2232.
- Malcovati M, Valentini G. (1982). AMP- and fructose 1,6-bisphosphate-activated pyruvate kinases from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 90:170-179.
- Metzger BE, Gabbe SG, Persson B, Buchanan TA, Catalano PA, Damm P, Dyer AR, Leiva A, y cols. (2010). International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care.* 33: 676-682.
- Ministerio del Poder Popular para la Salud. (2014). Anuario de Mortalidad año 2012. [Boletín]. Caracas: Autor.
- Nones R, Flores J, García D, Triana-Alonso F. (2011). Variantes del promotor proximal del gen para Glucocinasa en muestras de sangre de cordón umbilical. *Avances en Ciencias de la Salud.* 1: 4-10.
- Ogden RC, Adams DA. Electrophoresis in agarose and acrylamide gels. *Methods Enzymol.* 152: 61-87.
- Peleg L, Wilf-Miron R, Goldman B, Ashkenazi I. (2000). Differences in rhythms of enzymatic activity of maternal and fetal blood. *Chronobiol Int.* 17(2): 221-228.
- Permutt MA, Hattersley A. (2000). Searching for type 2 diabetes genes in the post genome era. *Trends Endocrinol Metab.* 11: 383-393.

- Poulsen P, Kyvik KO, Vaag A, Beck-Nielsen H. (1999). Heritability of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance--a population-based twin study. *Diabetologia*. 42: 139-145.
- Prokopenko I, Zeggini E, Rayner NW, Groves CJ, Hanson RL, Mitchell BD, Jia W, Ng MC, y cols. (2008). Putative association signals identified through high-density LD mapping of the replicated T2D linkage region on chromosome 1q are not confirmed in large scale follow-up studies. *Diabetes*. 57(1): A332.
- Puerta C, Urueña C. (Eds). (2005). *Prácticas de Biología Molecular*. Bogotá, Colombia: Editorial pontificia Universidad Javeriana. Colección Biblioteca del Profesional.
- Reijnen MJ, Sladek FM, Bertina RM, Reitsma PH. (1992). Disruption of a binding site for hepatocyte nuclear factor 4 results in hemophilia B Leyden. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 89(14): 6300–6303.
- Saltiel AR, Kahn CR. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 414(6865): 799-806.
- Sambrook J., Russell D. (2001). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* . (3th ed). USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Shih DQ, Screenan S, Munoz KN, Philipson L, Pontoglio M, Yaniv M, Polonsky KS, Stoffel M. (2001). Loss of HNF-1 α function in mice leads to abnormal expression of genes involved in pancreatic islet development and metabolism. *Diabetes*. 50: 2472–80.

- Taylor SI. (1992). Lilly Lecture: molecular mechanisms of insulin resistance. Lessons from patients with mutations in the insulin-receptor gene. *Diabetes*. 41: 1473–1490.
- Torres D. Identificación de variaciones genéticas en la región promotora del gen de *glut2* relacionadas con Diabetes mellitus tipo 2. *Trabajo de Grado presentado para optar al título de Magíster en Ciencias Biomédicas, Mención Bioquímica y Biología Molecular*. Universidad de Carabobo Sede Aragua.
- Tuomi T. (2005). Type 1 and type 2 diabetes: what do they have in common? *Diabetes*. 54(2): S40-45.
- Van Haeften TW, Dubbeldam S, Zonderland ML, Erkelens DW. (1998). Insulin secretion in normal glucose-tolerant relatives of type 2 diabetic subjects. Assessments using hyperglycemic glucose clamps and oral glucose tolerance tests. *Diabetes Care*. 21: 278–282.
- Wallace KJ, Wallis RH, Collins SC, Argoud K, Kaisaki PJ, Ktorza A, Woon PY, Bihoreau MT, Gauguier D. (2004). Quantitative trait locus dissection in congenic strains of the Goto-Kakizaki rat identifies a region conserved with diabetes loci in human chromosome 1q. *Physiol Genomics*. 19:1–10.
- Wang H, Antinozzi PA, Hagenfeldt KA, Maechler P, Wollheim CB. (2000a). Molecular targets of a human HNF1 alpha mutation responsible for pancreatic beta-cell dysfunction. *The EMBO Journal*. 19: 4257–4264.
- Wang H, Chu W, Das SK, Ren Q, Hasstedt SJ, Elbein SC. (2002). Liver pyruvate kinase polymorphisms are associated with type 2 diabetes in northern European Caucasians. *Diabetes*. 51(9): 2861-5.

- Wang H, Maechler P, Antinozzi PA, Hagenfeldt KA, Wollheim CB. (2000b). Hepatocyte nuclear factor 4alpha regulates the expression of pancreatic beta-cell genes implicated in glucose metabolism and nutrient-induced insulin secretion. *J Biol Chem.* 275: 35953–35959.
- Willer CJ, Bonnycastle LL, Conneely KN, Duren WL, Jackson AU, Scott LJ, Narisu N, Chines PS, y cols. (2007). Screening of 134 single nucleotide polymorphisms (SNPs) previously associated with type 2 diabetes replicates association with 12 SNPs in nine genes. *Diabetes.* 56(1): 256-64.
- Yamada K, Noguchi T. (1999). Nutrient and Hormonal Regulation of Piruvate Kinase Gene Expression. *Biochem J.* 337(1): 1-11.
- Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, y cols. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.* 108: 1167–1174.
- Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature.* 414: 782–787.

ANEXO A

CONSENTIMIENTO INFORMADO

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO

Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Carabobo (BIOMED-UC)

Consentimiento para Participar en un Estudio de Investigación

Título del Proyecto: Actividad enzimática de piruvato quinasa y alteraciones moleculares del promotor proximal del gen *PKLR* en células sanguíneas de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y en sangre de cordón umbilical

No. de ID del Participante _____

1. PROPÓSITO: El BIOMED-UC, va a desarrollar un estudio de investigación denominado: Actividad enzimática de piruvato quinasa y alteraciones moleculares del promotor proximal del gen *PKLR* en células sanguíneas de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y en sangre de cordón umbilical. El propósito de este estudio es determinar si existen parámetros que puedan ser utilizados como marcadores de diagnóstico temprano de la enfermedad. Nos gustaría solicitarle que participe en este proyecto de investigación que incluirá aproximadamente 150 personas.

2. PROCEDIMIENTOS: Si usted está de acuerdo, le pediremos permiso para tomar una muestra de sangre (12 ml) de su antebrazo utilizando una aguja. Adicionalmente, necesitamos sus datos personales y clínicos, tales como antecedentes personales y familiares patológicos, tiempo de evolución de la enfermedad (en caso de ser diabético), complicaciones y tipo de tratamiento. Su sangre será utilizada para aislar ADN y proteínas, e identificar si existen alteraciones en ellos que estén directamente relacionados con la diabetes mellitus.

3. RIESGO PARA EL PARTICIPANTE: La sangre le será extraída de su antebrazo con una aguja por un bioanalista con experiencia. El riesgo de que pueda salir lastimado durante la colecta de la sangre es mínimo, pero es posible que sienta algún dolor o incomodidad cuando le extraigan la sangre de su antebrazo; después puede presentarse algún moretón o hinchazón, y con muy poca probabilidad, infección en el sitio donde se extrajo la sangre. Puede sentir desfallecimiento cuando se le esté tomando la muestra, pero esto es poco común y la sensación pasará rápidamente.

4. BENEFICIOS POTENCIALES: Entre los posibles beneficios que pueden derivarse de su participación en el estudio se incluye la entrega de análisis de laboratorio como hematología completa, glicemia, colesterol total, triglicéridos, insulina y hemoglobina glicosilada, los cuales le serán realizados sin costo alguno. Adicionalmente, si encontramos parámetros que puedan ser utilizados como marcadores de diagnóstico temprano de diabetes, representaría un beneficio para usted y su familia.

5. COSTOS Y COMPENSACION: No hay costo para usted por participar en el estudio.

6. CUIDADOS MÉDICOS POR LESIONES RELACIONADAS CON LA INVESTIGACION: Si usted es lastimado como resultado directo de formar parte de este proyecto de investigación, recibirá atención médica para esa lesión. La atención médica se le proporcionará sin costo alguno. Usted recibirá la atención médica necesaria pero no una compensación monetaria por la lesión que el procedimiento de extracción de sangre le pueda ocasionar.

7. CONFIDENCIALIDAD DEL INDIVIDUO: Toda la información relacionada con este proyecto será confidencial. Los documentos de esta investigación serán mantenidos en las oficinas del BIOMED-UC en Maracay, Venezuela. Los datos pueden ser revisados por el

CBIIB-UC	
Protocolo N°:	CBIIB(UC)-20124
Fecha Aprobación:	27/05/12
Fecha Expiración:	25/05/13
Verificado por:	MDF

Comité de Ética del BIOMED-UC. Nosotros mantendremos los documentos en privado hasta donde sea legalmente posible.

8. PARTICIPACION VOLUNTARIA: Usted puede decidir no formar parte del estudio, o puede dejar este estudio en cualquier momento sin consecuencias negativas, o modificación del trato médico que estuviera recibiendo por parte de nuestro Centro.

9. PUNTOS DE CONTACTO: Si usted quiere conversar con alguien sobre este estudio o si tiene alguna(s) pregunta(s) acerca de sus derechos como participante, por favor contacte a la Prof. Ledia Triana en el BIOMED-UC, al 0243-2425822.

10. CONSENTIMIENTO DEL ADULTO: Su firma en este formulario indica que se le ha explicado el estudio y que ha decidido formar parte del mismo sin costo alguno para usted. Adicionalmente, su firma indica que ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Usted debe saber que cualquier pregunta que pueda formular en el futuro le será respondida por uno de los investigadores del estudio. A usted se le proporcionará una copia de este consentimiento para que disponga de esta información.

Es posible que después de que completemos las pruebas de laboratorio con sus muestras de sangre, quede un remanente de las mismas. ¿Qué desea Ud. que hagamos con los remanentes de sus muestras de sangre? Coloque sus iniciales en una sola una opción:

_____ Después de completar el estudio, destruyan todas las muestras restantes.
Iniciales

_____ Después de completar el estudio, las muestras restantes pueden ser utilizadas para cualquier propósito científico siempre que este propósito científico sea aprobado por la Junta de Revisión Institucional y que mi muestra no sea identificada con mi nombre sino sólo con un número. También entiendo que no habrá compensación por el uso futuro de mi(s) muestra(s).
Iniciales

Si cambia de opinión, en cualquier momento, y desea que se destruyan las muestras de sangre remanentes contacte a la Prof. Ledia Triana 0243-2425822.

Nombre del Participante: _____ Edad _____

Firma del Participante: _____ Fecha _____

Si el Participante es analfabeto, el proceso de consentimiento debe tener un testigo adulto.

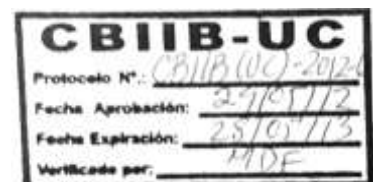
Nombre del Testigo: _____ Edad _____

Firma del Testigo: _____ Fecha _____

Nombre del Investigador: _____

Firma del Investigador: _____ Fecha _____

Nota: Copias firmadas de este Formulario de Consentimiento tienen que ser: a) guardadas en un archivo del Investigador Principal, b) entregadas al participante, c) incluidas en el registro médico del paciente (cuando corresponda).



ANEXO B

FICHA CLÍNICA

No. de ID del Participante _____

DATOS PERSONALES

Edad: _____	Antecedentes familiares de DM: Si _____ No _____	Tiempo de evolución de la enfermedad: _____
Presenta alguna patología asociada a la enfermedad: Si _____ No _____ Indique cual:	Tipo de tratamiento: Hipoglicemiante oral: Insulina:	

RESULTADOS DE PRUEBAS DE LABORATORIO

Hematología completa:

Hb	Hto	RBC	CHCM	WBC	%Seg	%Linf	%Mid

Química sanguínea

Glicemia	Colesterol	Trig.	HDL-c	LDL-c	VLDL	Insulina	Hb A1c