



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

“Polimorfismo 62 G/A en la región 3'UTR del
gen *retn* y niveles sanguíneos de la resistina en
pacientes con diabetes tipo 2”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:
JUAN PABLO CHÁVEZ
MALDONADO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MÓNICA ESPINOZA ROJO
CODIRECTORA DE TESIS: DRA. PENÉLOPE AGUILERA HERNÁNDEZ

CHILPANCINGO, GRO., JUNIO DE 2009.

Polimorfismo 62 G/A en la Región 3'UTR del Gen *retn* y
Niveles Sanguíneos de Resistina en Pacientes con Diabetes
Tipo 2.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero y en el Laboratorio de Patología Vascular Cerebral del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suarez". México D. F.

Bajo la dirección de:

Dra. Mónica Espinoza Rojo

y codirección de la

Dra. Penélope Aguilera Hernández

La asesoría de:

Dr. Donaciano Flores Robles.

Dr. Alfonso Bernabé Carreño.

MC. Eduardo Martínez Sandoval.

Con la colaboración del:

Instituto de Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suarez" de la

Ciudad de México.

Esta investigación se desarrolló con el financiamiento del fondo PFI 3.2

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis: Dra. Mónica Espinoza Rojo, a mi codirectora de Tesis: Dra. Penélope Aguilera Hernández.

A mis sinodales: Dr. Donaciano Flores Robles, Dr. Alfonso Bernabé Carreño y M. en C. Eduardo Martínez Sandoval.

Q.B.P. Héctor Manuel Cornejo Ortega

Bióloga Paola Ramírez Macedo y Q.B.P. Anahy del Carmen Barales M.

Laboratorio de Patología Vasculare Cerebral del Instituto de Neurología y Neurocirugía
"Manuel Velazco Suárez"

Índice	Página
Resumen	i
Abstract	ii
Introducción	1
Materiales y Métodos	3
Resultados	5
Discusión y Conclusiones	12
Referencias	18

RESUMEN

La resistina es una hormona de origen protéico, secretada principalmente por el tejido adiposo. En ratones, su sobreexpresión provoca una disminución en la sensibilidad a la insulina; mientras que su neutralización mediante anticuerpos anti resistina favorece la sensibilidad a la insulina y consecuentemente un incremento en la captación de glucosa. Dichos estudios sugieren un posible papel de la resistina en el metabolismo de la glucosa. Se han reportado al menos 2 polimorfismos en la región 3'UTR del gen de la resistina que se han relacionado con la presencia de diabetes tipo 2. **Objetivo.** Determinar la asociación del polimorfismo 62 G/A localizado en la región 3'UTR del gen de resistina con el riesgo de padecer diabetes tipo 2 en individuos originarios de Chilpancingo, Guerrero. **Métodos.** Se incluyeron 192 muestras de pacientes con diagnóstico previo de diabetes tipo 2 y 195 muestras de individuos sanos. La genotipificación del polimorfismo se realizó mediante discriminación alélica, utilizando PCR en Tiempo Real. La concentración de resistina en plasma se determinó mediante la técnica de ELISA. **Resultados.** La variante alélica GG fue predominante (79.84%) sobre las variantes G/A y AA (19.90 y 0.26%, respectivamente). El nivel de resistina en la circulación sanguínea fue mayor en individuos sanos comparado con el de los individuos diabéticos. La asociación entre los genotipos analizados y la presencia de diabetes mostró que los portadores del alelo de riesgo (A) tienen 1.5 veces más riesgo de desarrollar diabetes, comparado con los portadores del alelo silvestre (G). Sin embargo, dicha asociación no fue estadísticamente significativa, debido a que en los intervalos de confianza se incluye el valor nulo (IC95% 0.88-2.56). **Conclusiones.** El nivel de resistina en suero esta alterado en pacientes diabéticos, sin embargo el polimorfismo 62 G/A en la región 3'UTR del gen de la resistina no se asocia con la presencia de diabetes. Son necesarios más estudios, donde se involucre un tamaño de muestra mayor, para poder establecer el papel fisiopatológico que tiene los polimorfismos del gen de la resistina con la susceptibilidad a la diabetes.

Palabras clave: Resistina, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, polimorfismo 62 G/A

ABSTRACT.

Resistin is a proteic hormone secreted mainly by adipose tissue. It has been suggested a possible role of the resistin in the glucose metabolism. In mouse models, resistin overexpression produce a diminished sensitivity to insulin; conversely, the neutralization by antibodies anti-resistin favored the insulin sensitivity and consequently the glucose captation. Polymorphisms in the 3'UTR region of the gene of this hormone have been reported to associate with type 2 diabetes. **Objective.** The primary aim of the present study was to investigate the putative impact of the the resistin 3'UTR 62 G/A polymorphism on type 2 diabetes risk. **Methods.** Polymorphism genotypification was performed by allelic discrimination using Real Time PCR. Resistin concentrations was carried out through an ELISA assay. **Results.** The variant GG was predominant (79.84%) upon the variant G/A and AA (19.90 and 0.26%, respectively). Level of resistin was higher in healthy individuals than in diabetic patients. Association of genotype and diabetes showed a value of OR 1.5 (IC95% 0.88-2.56) for individuals with the allele A. However, this association was not significative. **Conclusion.** Resistin is altered in diabetics; nevertheless, no association was found between the resistin 3'UTR 62 G/A polymorphism and the presence of diabetes. It is necessary complementary studies to establish the pathophysiological role of polymorphism of resistin gen in diabetes.

Key words: Resistin, insulin resistance, type 2 diabetes, 3'UTR 62 G/A polymorphism.

INTRODUCCIÓN

La incidencia de la diabetes mellitus tipo 2 (DT2) ha incrementado de manera importante en los últimos años, afectando a más de 100 millones de personas a nivel mundial, y se espera un incremento de hasta 300 millones de pacientes para el 2025. Las complicaciones crónicas, junto con otros factores de riesgo y enfermedades asociadas, le confieren una alta tasa de morbimortalidad, que limita la calidad y la esperanza de vida¹.

La DT2 es una enfermedad multifactorial, en cuya etiología interactúan factores genéticos y ambientales². Se caracteriza por resistencia a la insulina (RI) en el músculo, hígado y tejido adiposo; así como una función alterada de las células β del páncreas³. Un incremento en la demanda metabólica de insulina, debido a la resistencia a ésta en varios tejidos, usualmente antecede al desarrollo de hiperglicemia. Existe, por consiguiente, un periodo de glicemia normal o cerca de lo normal, en el cual las células β pancreáticas compensan la hiperglicemia por medio de una hipersecreción de insulina. Sin embargo, este periodo de compensación es seguido por una falla en las células β para secretar suficiente insulina, originándose de esta manera la DT2⁴.

La obesidad es un estado metabólico que se ha relacionado con la presencia de DT2. Se ha sugerido que la secreción alterada de moléculas por parte de los adipocitos en la obesidad, conduce al desarrollo de RI. Los adipocitos secretan entre otras moléculas: interleucina 6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa) y la resistina⁵.

Se ha propuesto que la resistina es una proteína que juega un papel muy importante en la regulación de la sensibilidad a la insulina. Ha sido documentado que la concentración de resistina en suero se correlaciona positivamente con la aparición de enfermedades relacionadas con la obesidad, tales como DT2 y aterosclerosis⁶.

El gen de la resistina, denominado *retn*, está localizado en el cromosoma 19 en humanos y en el cromosoma 8 en ratones^{7,8}. *retn*, constituido por 3 intrones y 4 exones, codifica un polipéptido de 114 aminoácidos; este polipéptido es secretado a la circulación sanguínea como un hexámero, compuesto de dos subunidades triméricas, unidas por puentes

disulfuro intramoleculares^{9,10}. Stepan y colaboradores (2001) identificaron a la proteína estudiando genes que se expresan durante la diferenciación de los adipocitos, estos regulados de forma negativa en adipocitos maduros cuando son expuestos a tiazolidinedionas (TZDs), una familia de fármacos usados como tratamiento para la diabetes. La relación de la resistina con DT2 se ha observado en un modelo experimental de obesidad inducido mediante dieta. En este modelo la neutralización de la resistina empleando anticuerpos mejora la acción de la insulina¹¹. El papel de la resistina también ha sido estudiado en ratones *knockout* para *retn* y en ratones que sobreexpresaban a la resistina. En los primeros, se observó una reversión completa del fenotipo de resistencia hepática a la insulina; estos ratones exhibieron niveles de glucosa disminuidos debido a una producción reducida de glucosa hepática y por lo tanto mostraron una mayor tolerancia a la glucosa¹¹. Por otro lado, la sobreexpresión de resistina condujo a intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia, asociados con una señalización alterada de la insulina en músculo esquelético, hígado y tejido adiposo¹².

Está reportado que la expresión de resistina en humanos, es cuatro veces mayor en tejido adiposo abdominal que en tejido adiposo obtenido de músculo¹³. Sin embargo, las concentraciones plasmáticas de resistina en población general no han sido establecidas de manera definitiva. Pantsulaia y colaboradores (2007), señalan que el nivel circulante de resistina en mujeres es en promedio de 3.6 ng/mL, contra 3.1 ng/mL en hombres; en ambos grupos se tomaron en cuenta individuos sin enfermedades metabólicas como DT2, síndrome metabólico (SM), sobrepeso u obesidad¹⁴. Por otro lado, Hivert y colaboradores (2008), determinaron que la concentración de resistina se encuentra aumentada en individuos con SM, con un valor promedio de 13.6 ng/mL contra 12.3 ng/mL en personas sanas¹⁵. Otros estudios han demostrado una asociación entre la concentración de resistina en plasma y la presencia de DT2. En este sentido, Shalev y colaboradores (2004), encontraron que el porcentaje de resistina en suero de personas con DT2 es de 49.7 ng/mL, comparado con 30.7 ng/mL en sujetos sanos¹⁶; Byung-Soo y colaboradores, determinaron que la resistina se encuentra elevada hasta dos veces en pacientes con DT2¹⁷. Sin embargo Reilly y colaboradores (2005) reportaron que en pacientes con DT2 la concentración de resistina en plasma oscilaba entre 5.7-6.0 ng/mL¹⁸. Estas diferencias en la concentración de resistina reportada en pacientes con DT2, no permiten establecer una asociación definitiva.

La DT2 es una enfermedad multifactorial en la que los factores genéticos desempeñan un papel importante. Por ello se ha sugerido que la presencia de polimorfismos

de un solo nucleótido (SNPs) en *retn* pueden provocar un incremento en la expresión de la resistina y esto a la vez puede estar relacionado con el desarrollo de DT2. Hasta la fecha, se han reportado dos SNPs en la región 3'UTR *retn*: 44 G/A y 62 G/A, en ambos, existe la sustitución de una guanina por una alanina^{19,20}.

Mian-Shin Tan y colaboradores reportaron en el 2003 que la variante 62 G/A está asociada con un riesgo reducido para el desarrollo de DT2 e hipertensión. Los pacientes con DT2 portadores del genotipo GG mostraron una mayor prevalencia de hipertensión, lo que permitió sugerir que el SNP 62 G/A podría estar asociado con hipertensión, pero no con DT2²⁰. Por otra parte, en un estudio realizado en el puerto de Acapulco, Guerrero, al determinar la frecuencia genotípica del SNP 62 G/A en pacientes con DT2 y SM, se encontró que el polimorfismo se correlaciona con la presencia de DT2 e hipertensión. En este caso, la variante alélica dominante fue el genotipo GG (78%) sobre la variante AA (22%). Además, la presencia de DT2 y el genotipo AA se asociaron con hipertrigliceridemia, dislipidemias e hipercolesterolemia²¹.

El objetivo del presente trabajo fue determinar las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo 62 G/A en el *retn* en una población de la ciudad de Chilpancingo Guerrero. Adicionalmente se determinó la concentración de la resistina en suero con la finalidad de evaluar su relación con el polimorfismo y con la presencia de DT2.

MATERIAL Y METODOS

Tipo de estudio y población fuente

Se realizó un estudio de casos y controles partiendo del banco de suero y de ADN del Laboratorio de Genómica y Biología Molecular, de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, de la Universidad Autónoma de Guerrero. Se incluyeron 192 muestras de pacientes con diagnóstico previo de DT2 (diagnosticada por determinación de glucosa sérica en ayuno) y 195 muestras correspondientes a individuos sanos. Todos los participantes fueron derechohabientes del hospital del Seguro Social de la ciudad de Chilpancingo,

Guerrero que acudieron a consulta externa en el periodo comprendido del mes de noviembre de 2006 al mes de marzo de 2007.

Selección de muestras

Se hizo una selección de las muestras de suero y de ADN a partir de la base de datos, tomando en cuenta los resultados de laboratorio, de gabinete y la encuesta, para poder establecer la población de casos y controles.

Criterios de inclusión

Definición de casos

Se trabajó con muestras de pacientes con diagnóstico clínico de DT2. Los pacientes debieron radicar y ser originarios de la ciudad de Chilpancingo Guerrero.

Definición de controles

Muestras de pacientes con diagnóstico negativo de diabetes. Los pacientes debieron radicar y ser originarios de Chilpancingo Guerrero. Por cada caso se seleccionó un control.

Criterios de exclusión

Muestras sanguíneas insuficientes, con ADN degradado, o con datos confusos e incompletos en la encuesta y en la base de datos.

Genotipificación del polimorfismo 62 G/A en la región 3'UTR del gen *retn*

El ADN genómico fue extraído de sangre periférica usando técnicas estándar. Los alelos fueron detectados empleando el termociclador de PCR en Tiempo Real ABI 7500 de Applied Biosystems utilizando el método de discriminación alélica. Las secuencia de las sondas y los oligonucleótidos iniciadores fueron diseñados por Applied Biosystems: VIC-

CAGCTCC_cCCGCAAC, FAM- CAGCTCC_tCCGCAAC, sentido GAGGCGGCTCCAGGTC y antisentido CCACGCAGGGCTCAGA. La amplificación se realizó de acuerdo a los protocolos estandarizados para sondas TaqMan proporcionados por Applied Biosystems. Las condiciones de amplificación fueron: una desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 min, seguida de 40 ciclos de 15 segundos de desnaturalización a 92 °C, 60 s de alineamiento y amplificación a 60°C y con una extensión final de 5 minutos a 72 °C.

Determinación de la concentración de resistina

La concentración de resistina se determinó mediante ensayos comerciales de ELISA, con el *Human Resistin Quantikine ELISA Kit* (R&D Systems).

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo en el programa estadístico STATA versión 10.0. Para las variables cuantitativas con distribución normal se determinó la media y desviación estándar, realizando posteriormente la diferencia de medias por la prueba de t de “*student*”. Para las variables no paramétricas se determinó mediana y rango intercuartilo. El análisis de las variables cualitativas se llevó a cabo a través del cálculo de riesgo (OR), para determinar asociaciones entre las variables y los grupos, demostrando su significancia estadística por medio de la prueba de hipótesis de X^2 e intervalos de confianza al 95%.

RESULTADOS

Descripción general de la población, mediciones clínicas y de laboratorio

Se llevó a cabo la selección de muestras de la base de datos del laboratorio de Genómica y Biología Molecular. Un total de 387 muestras cubrieron los criterios de selección, 192 fueron de pacientes con diagnóstico clínico de DT2 y 195 sin él. El promedio de edad de los grupos fue de 48.5 para los individuos control y de 52.8 para los pacientes con DT2. La distribución en cuanto a sexo fue: 130 personas del sexo femenino y 65 del sexo

masculino en el grupo control; 122 mujeres y 70 hombres para el grupo de pacientes con DT2.

El promedio del índice de masa corporal (IMC) para los sujetos control y los individuos con DT2 fue de 27.5 de 28.8 respectivamente, obteniendo diferencias estadísticamente significativas al hacer la comparación entre ambos grupos. De la misma manera, se obtuvieron diferencias significativas al comparar las variables de presión arterial sistólica y diastólica, así como en los valores obtenidos de glucosa, colesterol y triglicéridos. En el cuadro 1 se describen con detalle las características generales de la población.

Cuadro 1.- Características generales de los casos y controles.

VARIABLE	TOTAL n=387	Controles n= 195	Casos n= 192	VALOR DE p
Edad (años)	50.5±12.4	48.5±12.6	52.8±11.9	0.0008*
Sexo [n (%)]				
Femenino	252(65.1)	130(66.7)	122(63.5)	0.52§
Masculino	135(34.9)	65(33.3)	70(36.5)	
IMC (Kg./m ²)	28.18±4.77	27.57±4.62	28.1±4.85	0.01*
PA. Sistólica (mmHg)	129.77±21.2	124.92±19.2	134.69±22.0	<0.001*
PA. Diastólica (mmHg)	83.83±12.57	81.86±13.1	85.84±12.0	<0.001*
Glucosa (mg/dL)	102 (90-147)	90 (84-97)	147.5 (120-208)	<0.001◇
HbA1c (%)	5.3 (4.7-5.9)	5.1 (4.6-5.4)	5.75 (4.9-7.1)	<0.001◇
Colesterol (mg/dL)	204 (174-231)	193 (164-222)	213 (184-237)	<0.001◇
Triglicéridos (mg/dL)	174 (128-245)	165 (120-242)	178 (134-254)	0.05*

Los datos indican (%); media ± DE; mediana (rango intercuartilo). §X², * Prueba de t de Student; ◇ Prueba de Mann-Whitney. IMC: Índice de masa corporal, PA: Presión arterial, HbA1c: Hemoglobina glicosilada

Genotipificación del polimorfismo 62 G/A en la región 3'UTR del gen *retn*

Se determinaron los genotipos de la población en estudio mediante discriminación alélica En el cuadro 2 podemos observar las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo 62 G/A. Las frecuencias genotípicas del grupo control se encontraron en equilibrio génico de acuerdo

con la ley de Hardy-Weimberg ($X^2= 0.1968$). En los controles no se observó el genotipo AA y en los casos solo se encontró a un paciente portador del genotipo AA (0.26%). En ambos grupos predominó el genotipo GG, 83.08 en los controles y 76.56 en los individuos con DT2.

Cuadro 2.- Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo 62G/A en la región 3'UTR del gen *retn*

GENOTIPO	GRUPOS DE ESTUDIO					
	CONTROLES n=195		CASOS n=192		TOTAL n=387	
	N	%	N	%	N	%
GG	162	83.08	147	76.56	309	79.84
GA	33	16.92	44	22.92	77	19.90
AA	0	0	1	0.52	1	0.26
FRECUENCIAS ALELICAS						
ALELO G	0.9154		0.8802		0.8979	
ALELO A	0.0846		0.1198		0.1021	

Con la finalidad de establecer asociaciones de riesgo el genotipo fue comparado con los resultados de las mediciones bioquímicas y antropométricas realizadas a la población. En el cuadro 3 se observan los resultados de las mediciones bioquímicas y de gabinete de los individuos pertenecientes al grupo control agrupados por genotipo. Al hacer la comparación entre los genotipos, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en las variables de hemoglobina glicosilada con una mediana de 5% en los portadores del genotipo GG y de 5.3% en los portadores del genotipo GA; y en triglicéridos, con valores de mediana de 166.5 mg/dL en los portadores del genotipo GG y de 164 mg/dL en los heterocigotos. La concentración de colesterol fue mayor en los portadores del genotipo heterocigoto comparado con los portadores del genotipo GG (200 mg/dL y 188 mg/dL respectivamente), sin embargo, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en dicha variable.

Cuadro 3.- Características bioquímicas y de gabinete de los controles de acuerdo al genotipo.

VARIABLES	CONTROLES			Valor de P
	GG n=162	GA n=33	AA n=0	
Edad (años)	49.1±12.7	46.0±11.9		0.2*
Sexo n (%)				
Femenino	108(67)	22(67)		1.0§
Masculino	54(33)	11(33)		
IMC (Kg/m ²)	27.8±4.5	26.2±4.6		0.7*
PA. Sistólica (mmHg)	125.0±19.0	124.4±20.3		0.8*
PA. Diastólica (mmHg)	81.9±13.0	81.3±13.8		0.8*
Glucosa (mg/dL)	91 (85-96)	90 (83-98)		0.8◇
HbA1c	5 (4.5-5.4)	5.3 (5-5.5)		0.006
Colesterol (mg/dL)	188 (162-221)	200 (172-224)		0.4
Triglicéridos (mg/dL)	166.5 (120-244)	164 (118-217)		0.03*

Los datos indican n (%); media ± DE; mediana (rango intercuartilo). §X², * Anova de una sola vía: ◇ Prueba de Kruskal-Walis. IMC: Índice de masa corporal, PA: Presión arterial, HbA1c: Hemoglobina glicosilada

En el cuadro 4 se observan las características bioquímicas y de gabinete de los casos (individuos con DT2) de acuerdo a su genotipo. La concentración de colesterol fue mayor en los individuos portadores del genotipo GG, seguido del GA y AA, con valores de mediana de 213 mg/dL, 210 mg/dL y 183 mg/dL respectivamente, encontrándose que los valores de mediana en los portadores del genotipo GG y GA se están por arriba de lo normal. Con respecto a la variable de triglicéridos, los valores también se encontraron por arriba de lo normal en los portadores del genotipo GG y GA (175 mg/dL y 205.5 mg/dL respectivamente). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en dichas variables al analizarlas de acuerdo al genotipo. Únicamente la concentración de hemoglobina glicosilada es estadísticamente diferente entre los diferentes genotipos.

Cuadro 4. Características generales de los casos de acuerdo al genotipo.

VARIABLES	CASOS			Valor de P
	GG n=147	GA n=44	AA n=1	
Edad (años)	53.4±12.0	50.4±11.5	61	0.3*
Sexo n (%)				
Femenino	87(59.2)	35(79.6)	---	0.03§
Masculino	60(40.8)	9(20.4)	1(100)	
IMC (Kg/m ²)	28.5±4.6	29.4±5.6	32.4	0.5*
PA. Sistólica (mmHg)	134.7±22.4	134.8±20.9	123	0.9*
PA. Diastólica (mmHg)	85.7±11.8	86.0±12.9	83	0.7*
Glucosa (mg/dL)	146 (119-206)	168.5 (120-223.5)	139 (139-139)	0.4◇
HbA1c	5.6 (4.8-6.9)	6.3 (5.4-7.9)	4.8 (4.8-4.8)	0.002
Colesterol (mg/dL)	213 (184-237)	210 (182.5-229.5)	183 (183-183)	0.5◇
Triglicéridos (mg/dL)	175 (133-238)	205.5 (157-309.5)	82 (82-82)	0.1*

Los datos indican: n (%); media ± DE; mediana (rango intercuartilo). §X², * Anova de una sola vía; ◇ Prueba de Kruskal-Wallis. IMC: Índice de masa corporal, PA: Presión arterial, HbA1c: Hemoglobina glicosilada

Al asociar el polimorfismo 62 G/A con la presencia de DT2, se observó que los individuos portadores del alelo de riesgo AA tienen 1.5 veces más riesgo de desarrollar DT2 en comparación con los individuos que portan el alelo silvestre GG. Sin embargo, el valor de razón de momios (RM) obtenido no es significativo debido a que en el intervalo de confianza está incluido en valor nulo, Ver cuadro 5.

Cuadro 5.- Asociación del polimorfismo 62G/A en la región 3'UTR del gen *retn* en la población de casos y controles.

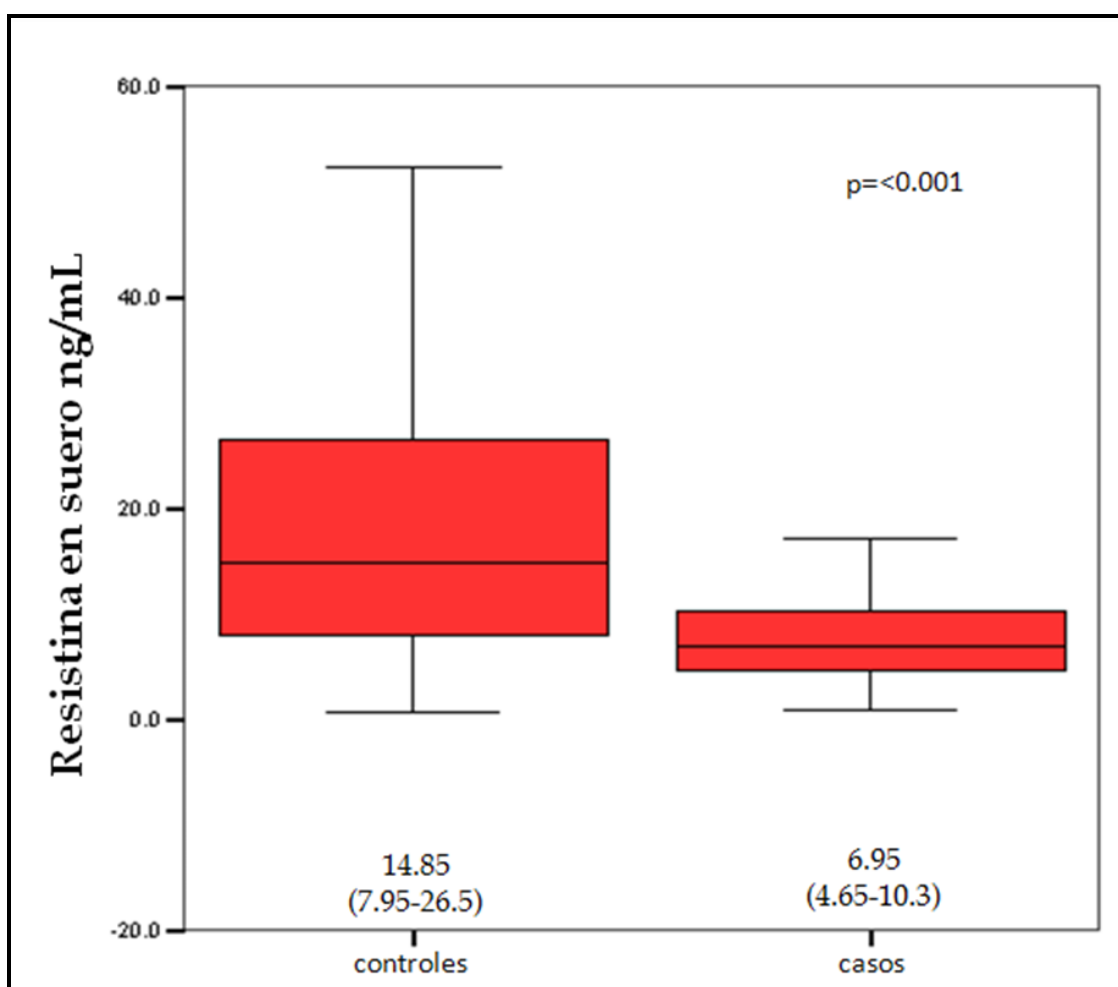
GENOTIPO	Controles		Casos		RM†	IC 95%
	n	%	n	%		
GG	158	82.29	143	75.66	1.0*	
GA + AA	33	7.19	45	24.34	1.5	0.88-2.56

* Categoría de referencia. † Razón de momios no ajustada.

Determinación de la concentración de resistina en suero en las poblaciones de casos y controles.

Se determinó la concentración de resistina en 342 muestras de suero, pertenecientes a 171 individuos con DT2 y a 171 individuos no diabéticos. Se encontró que la concentración de resistina en individuos control fue en promedio de 14.85 ng/mL, lo que representa aproximadamente el doble de la concentración de esta hormona con respecto a los individuos con DT2 (6.95 ng/mL), ver figura 1.

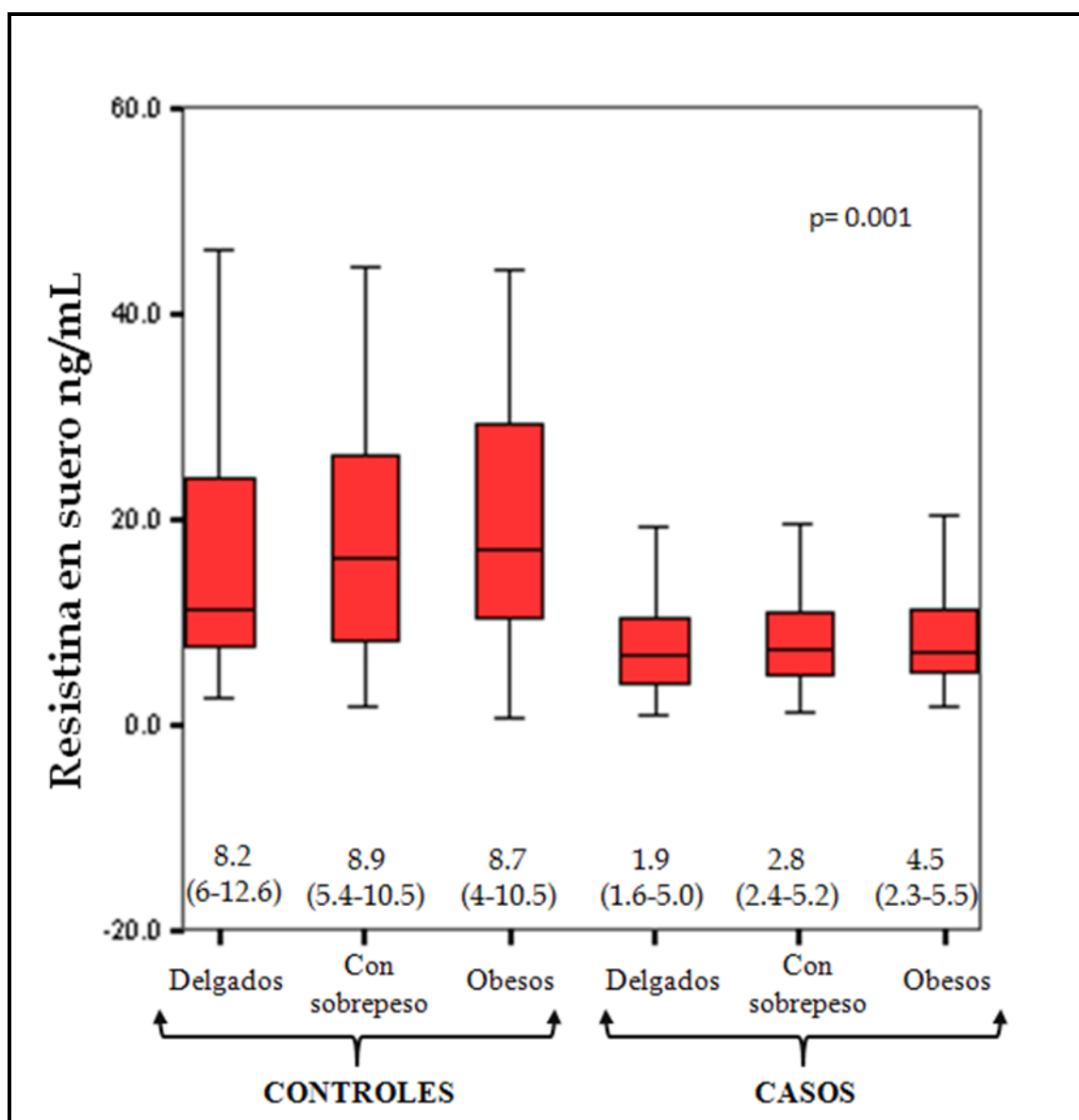
Figura 1.- Concentración de resistina en la población de casos y controles.



Los datos indican mediana y rango intercuartil

Debido a que la resistina es una molécula ligada a la obesidad, se realizó el análisis de la concentración de ésta de acuerdo al IMC. En cada uno de los grupos de estudio se establecieron tres subgrupos: delgados, sobrepeso y obesos. En la figura 2 se muestran los valores de mediana y rango intercuartil de la concentración de resistina de acuerdo al IMC. Se observó una tendencia a la alza de la concentración de resistina a medida que incrementa el IMC.

Figura 2.- Concentración de resistina de acuerdo al índice de masa corporal.



Los datos indican mediana y rango intercuartil

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Se realizó un estudio de casos y controles en la población de Chilpancingo Guerrero, en el cual relacionamos el polimorfismo 62 G/A en la región 3'UTR del gen de la resistina con la presencia de DT2. En el análisis de las características generales de la población, se observó que en el grupo de individuos con DT2 los valores de presión arterial diastólica y sistólica se encuentran dentro del rango normal. Sin embargo, se puede observar que existe una tendencia hacia el aumento, por lo cual se puede pronosticar que a medida que evoluciona la enfermedad, el paciente diabético normotenso puede desarrollar hipertensión arterial en el futuro. Además, los valores de presión arterial son significativamente más altos en los casos que en los controles. Esto puede estar asociado a que los pacientes con DT2 cursan con diversas alteraciones relacionadas con obesidad y resistencia a la insulina, las cuales se ha establecido tienen como consecuencia el desarrollo de hipertensión arterial²².

Otra característica importante de los pacientes con DT2 es que cursan con alteración en el metabolismo lipídico. Esta alteración se ve reflejada en nuestro estudio, ya que los valores de triglicéridos y colesterol se encuentran por arriba de los normales en el grupo de pacientes con DT2; mientras que los individuos sanos presentan valores dentro de los estándares normales.

Genotipificación del polimorfismo 62 G/A localizado en la región 3'UTR del gen *retn*, que codifica para la resistina.

Varios grupos de investigación han propuesto que ciertas variantes en el gen de la resistina predisponen al desarrollo de la resistencia a la insulina y posteriormente a la DT2. En un estudio realizado por Engert y colaboradores en el año 2002, con individuos no diabéticos en la ciudad de Québec en Canadá; identificaron 2 SNPs en la región 5'-flanqueante del gen de la resistina (-537 y -420), asociados con incremento en el índice de masa corporal²³. Un análisis genético de la resistina en población japonesa demostró que el SNP -420 G/G está asociado con DT2 y que podría acelerar la aparición de la enfermedad hasta por 4.9 años²⁴. En contraste, diversos estudios en población obesa de Japón demostraron que los SNPs -638 G/A, -420 C/G y -358 G/A, no confieren una asociación con obesidad o con resistencia a la insulina, a pesar de que los SNPs si están asociado con el nivel

de la resistina^{25,26}. Mian-Shin Tan y colaboradores en el 2003 identificaron que el SNP 62 G/A está asociado con una disminución en el riesgo de desarrollar DT2 e hipertensión en población china²⁰.

En este estudio obtuvimos que en la población total el genotipo GG del gen *retn* fue más frecuente (79.84%), seguido del heterocigoto (19.90%) y por último el genotipo homocigoto para A (0.26%), el cual solo se encontró en una ocasión en el grupo de los pacientes con DT2. Frecuencias similares fueron encontradas en población china y alemana^{20,27}.

En el análisis de genotipificación encontramos que nuestra población de estudio tiene una distribución genotípica similar a la encontrada en población china y alemana^{20, 27}. El genotipo GG del gen *retn* fue más frecuente (79.84%), seguido del heterocigoto (19.90%) y por último el genotipo homocigoto para A (0.26%). Sin embargo, estos resultados difieren de los reportados por Fierro Torres y colaboradores (2006) en una población del Puerto de Acapulco. Estos autores encontraron una alta frecuencia del genotipo GG (78%) seguido del genotipo AA (22%)²¹.

En el análisis de asociación encontramos que del genotipo AA no está relacionado con la presencia de DT2. Estos resultados concuerdan con los hallazgos en población alemana, en donde los sujetos con DT2 (n= 384) presentan una frecuencia genotípica similar a la de los individuos aparentemente sanos (n= 434)²⁷. Adicionalmente, este grupo encontró que el polimorfismo 62 G/A no está asociado con DT2, pero si con hipertensión²⁷.

Sin embargo, nuestros resultados difieren de lo que se detectó en población china²⁰. Estas discrepancias pudieran ser explicadas por variantes genéticas o polimorfismos localizados en otras regiones del gen, y/o condiciones ambientales de las poblaciones estudiadas.

Discrepancias también fueron encontradas con respecto a los hallazgos de Fierro Torres y colaboradores (2006). Este grupo reportó una asociación del polimorfismo 62 G/A con la presencia de DT2 y síndrome metabólico; encontraron que los individuos que portan el alelo AA tienen cuatro veces más riesgo de presentar diabetes, en comparación con los individuos que portan el alelo silvestre²¹. Estas diferencias, así como las halladas en la

distribución genotípica puede deberse a que Fierro-Torres y colaboradores (2006) identificaron el polimorfismo mediante PCR convencional y RFLPs, mientras que nosotros lo identificamos mediante PCR en tiempo real. Este último método, es altamente sensible y totalmente automatizado, por lo que existe un menor margen de error al momento de hacer la identificación.

En conclusión en nuestro estudio, no se encontró asociación entre el polimorfismo 62 G/A en la región 3'UTR del gen de la resistina con la presencia de DT2. Aunque el valor de RM obtenido nos indica que los individuos portadores del alelo A tienen el riesgo de desarrollar DT2, los intervalos de confianza nos definen que la asociación no es estadísticamente significativa. Se requiere desarrollar un estudio con un tamaño de muestra mayor.

Determinación de la concentración de resistina en suero

Desde el descubrimiento de la resistina, se ha sugerido que esta proteína tiene relación con el desarrollo de resistencia a la insulina. Existen modelos experimentales en los que se ha demostrado una relación directa entre el nivel incrementado de resistina en circulación y obesidad, estableciendo así un vínculo entre la obesidad y la resistencia a la insulina. Sin embargo a pesar de existir esta clara relación en modelos experimentales, los resultados de estudios en humanos no han sido contundentes. En estos estudios, no se encuentra una asociación de la concentración de resistina en sangre con la presencia de DT2²⁸.

Se han realizado diversos estudios donde se mide la expresión del mensajero del gen de la resistina en tejidos^{29, 30} y la concentración de la proteína en humanos^{31,32}. Sin embargo, ninguno de esos estudios ha determinado de manera precisa el nivel de la proteína en circulación, lo cual podría ayudar a explicar sus efectos sistémicos.

En el presente trabajo, al determinar el nivel de resistina en suero en nuestra población de estudio, no encontramos diferencias entre los individuos delgados y obesos, tanto en los casos como en los controles. Estos resultados son contrarios a los reportados por Degawa-Yamauchi y colaboradores (2003), quienes demostraron una relación directa entre la concentración de resistina en circulación y obesidad³³. Al contrario, nuestros resultados

concuerdan con los hallazgos de Heilbronn y colaboradores (2004) quienes encontraron que los valores de resistina no fueron diferentes entre individuos no obesos (4.1 ± 1.7), obesos (4.2 ± 1.6) y sujetos diabéticos (3.7 ± 1.2)³⁴.

En el presente estudio también encontramos que dependiendo del IMC, los pacientes con DT2 poseen de un 55 a un 76% menos proteína circulante que los individuos no diabéticos. Este resultado nos permite visualizar que las concentraciones de resistina en pacientes diabéticos comparadas con los sanos están alteradas³⁴.

La disminución en el valor de resistina en pacientes con DT2 puede ser causada por el trasfondo genético³⁵. Es probable que en pacientes con DT2 se induzca la sobreexpresión de genes que regulan la expresión de la resistina. Tal es el caso de los genes que codifican para los receptores activados del peroxisoma proliferador alfa y gama (PPAR γ y PPAR α). Estos receptores tienen un papel muy importante en la regulación del metabolismo y oxidación de los ácidos grasos, así como en la regulación de la expresión de proteínas como la adiponectina y resistina.³⁶ Lindi y colaboradores (2002) identificaron un SNP en el gen que codifica para el PPAR γ . En dicho estudio encontraron que la sustitución de una prolina por una alanina en la posición 12 (Prol12Ala) confiere 2 veces más riesgo de desarrollar DT2 en una población europea. Los portadores de la variante alanina 12 también presentaron mayor susceptibilidad a la pérdida de peso en comparación con los portadores del alelo silvestre. Es decir, la variante polimórfica está asociada con el desarrollo de DT2 y con una disminución del grado de obesidad, hecho que se ve reflejado con una mayor oxidación lipídica³⁷.

En ese mismo estudio, los autores propusieron que el SNP Prol12Ala podría estar relacionado con una mayor expresión de adiponectina. Ellos observaron que el SNP presente en el gen que codifica para el PPAR γ incrementaba la oxidación lipídica y esto a su vez se traducía en un menor grado de obesidad³⁷. Tomando en cuenta que la adiponectina tiene propiedades anti-inflamatorias, ésta puede regular de forma negativa a la resistina, al inhibir factores de transcripción importantes en la respuesta inflamatoria como el factor nuclear kappa beta, el cual es uno de los principales factores que regula de manera positiva la expresión de resistina³⁸. Por lo anterior, no descartamos que en nuestra población de estudio estén influyendo variantes polimórficas en otros genes no tomadas a consideración, como es el caso del SNP Prol12Ala en el gen del PPAR γ .

Por otra parte, Rajala y colaboradores (2004), examinaron la relación existente entre la resistina, la insulina y la glucosa, encontrando que en individuos sanos, el nivel del ARNm y la proteína resistina incrementaron hasta un 20 y 25 %, en respuesta a la hiperinsulinemia e hiperglicemia, respectivamente³⁹. Estos hallazgos son apoyados por reportes previos en ratas, en donde la administración de glucosa y de insulina incrementa el nivel de mensajero de resistina⁴⁰. Estos datos sugieren una regulación de la resistina por insulina y glucosa. En nuestro estudio, los pacientes con DT2 tienen un déficit en la utilización de la glucosa, presentan resistencia a la insulina y atraviesan por periodos de disminución en la producción de insulina, lo que podría explicar la disminución en la concentración de resistina circulante.

En el estudio realizado por Rajala y colaboradores (2004), se demostró que el nivel de ARNm de resistina es reducido debido a la administración de leptina en modelos experimentales³⁹. La leptina disminuyó la concentración de insulina, glucosa y triglicéridos en forma paralela a la disminución en el nivel de resistina circulante. En estudios realizados en humanos, se ha observado que la terapia con insulina, incrementa la concentración de leptina en pacientes con DT1 y DT2⁴¹. Por lo tanto, es posible que la leptina, ejerza un efecto antagónico en la regulación de la expresión de la resistina, traduciéndose en un nivel disminuido de la proteína en circulación en individuos con DT2 que no son controlados con insulina.

Dentro de las aportaciones del presente trabajo, podemos mencionar que comprobamos que el polimorfismo 62 G/A en la región 3'UTR del gen *retn* no se encuentra asociado con la presencia de diabetes en nuestra población. Además, se comprobó que dicho polimorfismo no está relacionado con un nivel incrementado de resistina en circulación. Finalmente, también se demostró que el nivel de proteína en suero está alterado en el estado diabético.

En conclusión, la concentración de resistina en suero se encuentra disminuida en individuos con DT2 comparados con individuos sanos. Aun cuando existe evidencia a favor y en contra de la relación de la resistina con la resistencia a la insulina en los modelos de ratones, hacen falta estudios en humanos. Dado que existe una regulación de la expresión del gen de resistina por moléculas como leptina y adiponectina, las cuales también se ven

alteradas en los individuos con DT2, estos estudios son necesarios para poder establecer con precisión la relación entre la resistina y DT2.

REFERENCIAS

- 1 **Permuntt M. Alan, Wasson Jonothan And Cox Nancy.** Genetic Epidemiology Of Diabetes. *J. Clin. Invest.* 2005;115 (6): 1431-1439.
- 2 **Guzmán Juárez Nora.** Revisión De Las Características Clínicas, Metabólicas Y Genéticas De La Diabetes Mellitus.2003; 28 (2):14-23.
- 3 **Jazet I.M., Pijil H. Meinders A. E.** Adipose Tissue As An Endocrine Organ: Impact On Insulin Resistance. *The Journal Of Medicine.* 2003;61(6):194-212.
- 4 **Kasuga Masato.** Insulin Resistance And Pancreatic B Cell Failure. . *J. Clin. Invest.* 2006;116(7):1756-1760.
- 5 **Kahn B Barbara And Jeffrey S.** Obesity An Insulin Resistance. *J. Clin. Invest.* 2000; 106(4): 472-481
- 6 **Muredach P. Reilly, Michael Lehrke, Megan L. Wolfe, Anand Rohatgi, Mitchell A. Lazar, Daniel J. Rader.** Resistin Is An Inflammatory Marker Of Atherosclerosis In Humans. *Circulation.* 2005;111:932-939.
- 7 **Tilg Herbert And Moschen R. Alexander.** Adipocytokines: Mediators Lining Adipose Tissue, Inflammation And Immunity. *Nature.* 2006; 6:772-783.
- 8 **Jerzy Beltowski.** Adiponectin And Resistin- New Hormones Of White Adipose Tissue. *Medscimonit.* 2003;9(2)55-61.
- 9 **Graveleau Christophe, G. Zaha Vlad, Mohajer Arash, R. Banerjee Ronadip, Dudley-Rucker Nicole, M. Steppan Claire, Et Al.** Mouse And Human Resistins Impair Glucose Transport In Primary Mouse Cardiomyocytes, And Oligomerization Is Required For This Biological Action. *Jbc* 2005;280(36):31679-31685.
- 10 **Cristiana Bertolani, Sancho-Bru P., Failli P., Bataller R., Aleffi S., Defranco R., Et Al.** Resistin As An Intrahepatic Cytokine. *The American Journal Of Pathology.* 2006; 169(6):2042-2053.
- 11 **Steppan, C.M., Bailey, S.T., Bhat, S.** The Hormone Resistin Links Obesity To Diabetes. *Nature* 2001;409: 307-312.
- 12 **Shanshan Pang And Yingying Le.** Role Of Resistin In Inflammation And Inflammation-Related Diseases. *Cellular And Molecular Immunology.* 2006;3(1):29-34.
- 13 **Graveleau Christophe, G. Zaha Vlad, Mohajer Arash, R. Banerjee Ronadip, Dudley-Rucker Nicole, M. Steppan Claire, Et Al.** Mouse An Human Resistins Impair Glucose Transport In Primary Mouse Cardiomyocytes, And Oligomerization Is Required For This Biological Action. *Jbc* 2005;280(36):31679-31685.
- 14 **Pantsulaia I., Livshits G., Trofimov S And Kobylansky E.** Genetic And Environmental Determinants Of Circulating Resistin Level In A Community-Based Sample. *European Journal Of Endocrinology* 2007;156: 129-135
- 15 **Hivert M.-F., Sullivan L.M., Fox C.S., Nathan D.M., D'Agostino R.B., Wilson P.W., Meigs J.B.** Associations Of Adiponectin, Resistin, And Tnfa With Insulin Resistance. *The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2008;93:8 3165-3172
- 16 **Shalev A, Patterson NB, Hirshberg B, Et Al.** Resistin Serum Levels In Type 1 Diabetes Pre- And Post-Islet Transplantation. *Metabolism.* 2004;53:403-404.
- 17 **Byung-Soo Youn, Kang-Yeol Yu, Hong-Je Park, Nam-Seok Lee, Sung-Shik Min, Moon-Yeon Youn, Et Al.** Plasma Resistin Concentrations Measured By Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using A Newly Developed Monoclonal Antibody Are Elevated In Individuals With Type 2 Diabetes Mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 150-156, 2004.
- 18 **Rielly M.P., Lehrke M., Wolfe M.L., Rohatgi A., Lazar M.A., Rader D.J.** Resistin Is A Inflammatory Marker Of Atherosclerosis In Humans. *Circulation.* 2005;111:932-939.
- 19 **Belgin Súsleyici Duman, Penbe Cagatay, Hüsrev Hatemi And Melek Öztürk.** Association Of Resistin Gene 3'-Untranslated Region EX4-44G→A Polymorphism With Obesity- And Insulin-Related Phenotypes In Turkish Type 2 Diabetes Patients. *Rev Diabet Stud* 2007; 4(1):49-55
- 20 **Mian-Shin Tan, Chang Shu-Ying, Chang Dao-Ming, C.-R. Jack Tsai And Lee Yau-Jiunn.** Association Of Resistin Gene 3'-Untranslated Region +62 G/A Polymorphism With Type 2 Diabetes And Hypertension In A Chinease Population. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:1258-1263.
- 21 **Fierro Torres A.** Detección Del Polimorfismo +62G/A En La Región 3'UTR Del Gen De La Resistina En Pacientes Con Síndrome Metabólico Y Diabetes. Tesis Para Obtener El Grado De Maestría.

Universidad Autónoma De Guerrero, Facultad De Ciencias Químico Biológicas. Maestría En Ciencias Biomédicas. Julio Del 2006.

²² **López Alvarenga JC, González-García LT.** Enfermedades Asociadas Con La Obesidad. Revista De Endocrinología Y Nutrición 2001;9(2):77-85

²³ **Engert, J. C., Vohl, M. C., Williams, S. M.** 5' Flanking Variants Of Resistin Are Associated With Obesity. Diabetes 2002; **51**:1629-1634.

²⁴ **Osawa, H., Yamada, K., Onuma, H.** The G/G Genotype Of A Resistin Single-Nucleotide Polymorphism At -420 Increases Type 2 Diabetes Mellitus Susceptibility By Inducing Promoter Activity Through Specific Binding Of Sp1/3. Am. J. Hum. Genet. 2004; **75**: 678-686

²⁵ **Osawa, H., Onuma, H., Murakami, A.** Systematic Search For Single Nucleotide Polymorphisms In The Resistin Gene: The Absence Of Evidence For The Association Of Three Identified Single Nucleotide Polymorphisms With Japanese Type 2 Diabetes. Diabetes 2002; **51**: 863-866.

²⁶ **Ochi, M., Osawa, H., Onuma, H.** The Absence Of Evidence For Major Effects Of The Frequent SNP +299G>A In The Resistin Gene On Susceptibility To Insulin Resistance Syndrome Associated With Japanese Type 2 Diabetes. Diabetes Res. Clin. Pract. 2003;**61**: 191-198.

²⁷ **Gouni-Berthold I., Giannakidou E., Faust M., Kratzsch J., Berthold H. K., Krone W.** Resistin Gene 3'-Untranslated Region +62G→A Polymorphism Is Associated With Hypertension But Not Diabetes Mellitus Type 2 In A German Population. Journal Of Internal Medicine 258; 6: 518 - 2005

²⁸ **Osawa H., Tabara Y., Kawamoto R., Ohashi J., Ochi M., Onuma H., Et Al.** Plasma Resistin, Associated With Single Nucleotide Polymorphism-420, Is Correlated With Insulin Resistance, Lower HDL Cholesterol, And High-Sensitivity C-Reactive Protein In The Japanese General Population. Diabetes Care 2007; 30:1501-1506.

²⁹ **Maria Bokarewa, Ivan Nagaev, Leif Dahlberg, Ulf Smith, And Andrej Tarkowski.** Resistin, An Adipokine With Potent Proinflammatory Properties. The Journal Of Immunology, 2005, 174: 5789-5795.

³⁰ **Jurgen Janke, Stefan Engeli, Kerstin Gorzelniak, Friedrich C. Luft, And Arya M. Sharma.** Resistin Gene Expression In Human Adipocytes Is Not Related To Insulin Resistance. Obesity Reserch. 2002; 10: 1-5.

³¹ **Gerber M., Boettner A., Seidel B., Lammert A., Bar J., Schuster E., Et Al.** Serum Resistin Levels Of Obese And Lean Children And Adolescent: Biochemical Analysis And Clinical Relevance. J Clin Endocrinol Metab 2005;90(8):4503-4509.

³² **Bahr M.J., Ockenga J., Boker K. H., Manns M.P., Tietge U.J.** Elevated Resistin Levels In Cirrhosis Are Associated With The Proinflammatory State And Altered Hepatic Glucose Metabolism But Not With Insulin Resistance. Am J Physiol Endocrinol Metab 2006;291:E199-E206.

³³ **Degawa-Yamauchi M., Bovenkerk, J. E. Juliar B. E., Watson W., Kerr K., Jones R., Et Al.** Serum Resistin (FIZZ3) Protein Is Increased In Obese Humans. J Clin Endocrinol Metab 2003;88: 5452-5455.

³⁴ **Heilbronn L. K., Rood J., Janderova L., Albu J. B., Kelley D. E., Ravussin E, Smith R.S.** Relationship Between Serum Resistin Concentrations And Insulin Resistance In Nonobese, Obese, And Obese Diabetic Subjects. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89: 1844-1848.

³⁵ **Menzaghi C., Coco A., Salvemini L., Thompson R., De Cosmo S., Doria A.** Heritability Of Serum Resistin And Its Genetic Correlation With Insulin Resistance-Related Features In Nondiabetic Caucasians. J Clin Endocrinol Metab 2006;91:2792-2795.

³⁶ **Boden Guenther, Laasko Markku.** Lipids And Glucose In Type 2 Diabetes. 2004; 27: 2253-2259

³⁷ **Lindi V.I., Uusitupa M.I., Lindstro J., Louheranta A, Eriksson J.G., Valle T.** Association Of The Pro12Ala Polymorphism In The PPAR- γ 2 Gene With 3-Year Incidence Of Type 2 Diabetes And Body Weight Change In The Finnish Diabetes Prevention Study. Diabetes 2002;51:2581-2586.

³⁸ **Lehrke M, Reilly P. M., Millington S .C., Iqbal N., Rader D. J., Lazar M. A.** An Inflammatory Cascade Leading To Hyperresistinemia In Humans. Plos Med. 2004;**1**, E45.

³⁹ **Rajala MW., Qi Y., Patel HR., Takahashi N., Banerjee R., Pajvani UB., Et Al.** Regulation Of Resistin Expresión And Circulatin Levels In Obesity, Diabetes And Fasting. Diabetes 2004;53:1671-1679.

⁴⁰ **Rajala MW, Lin Y, Ranalletta M, Yang XM, Qian H, Gingerich R, Barzilai N, Scherer PE:** Cell Type-Specific Expression And Coregulation Of Murine Resistin And Resistin-Like Molecule-Alpha In Adipose Tissue. Mol Endocrinol. 2003;16:1920-1930.

⁴¹ Nagasaka S, Ishikawa S, Nakamura T, Et Al. Association Of Endogenous Insulin Secretion And Mode Of Therapy With Body Fat And Serum Leptin Levels In Diabetic Subjects. *Metabolism* 1998;47(11):1391-6.