



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO



FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
“DR. IGNACIO CHÁVEZ”

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**EFFECTO DE FACTORES CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS Y
GENÉTICOS SOBRE EL DESARROLLO Y PROGRESIÓN
DE LA NEFROPATÍA DIABÉTICA EN UNA POBLACIÓN
MEXICANA CON DIABETES MELLITUS TIPO 2**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN FARMACOLOGÍA BÁSICA

PRESENTA

MED. CIR. LUZ ELENA ORTEGA PIERRES

DIRECTOR

MC CLETO ÁLVAREZ AGUILAR

CO-DIRECTORA

MC ANA EDITH HIGAREDA MENDOZA

MORELIA, MICHOACÁN
MÉXICO
2005

AGRADECIMIENTOS

Con toda mi gratitud y mi respeto para todos los profesionales de la salud que de alguna manera hicieron posible la elaboración de este trabajo de investigación; muy especialmente al MC Cleto Álvarez Aguilar y a su dilecta esposa Marthita, por su hospitalidad, su paciencia, su tiempo y sus enseñanzas. A la MC Ana Edith Higareda Mendoza por su amistad, sus conocimientos y sus prácticas recomendaciones que día a día facilitaron la realización de esta tesis. A los miembros de mi Comité Académico de Evaluación, D en C Joel Edmundo López Meza, D en C Marco Aurelio Pardo Galván y el MC Juan Carlos Cortés García, por su apoyo, orientación y motivación.

Con todo mi amor a mi querido esposo, quien estuvo siempre a mi lado alentándome en esta ardua tarea. Jorge, viviré eternamente agradecida por el gran esfuerzo que hiciste con tu tiempo, tu trabajo, tu ternura, tu comprensión, tu presencia y hasta tus ahorros.

A ti Gaby, que como una madre me has apoyado, muchas gracias; sean para ti mi admiración y mi reconocimiento para esa gran mujer.

A mis hijos Jorge Hugo, Benjamín, Dafne y Jacqueline por su cariño y su confianza. A mi nieto Jorge Carlo a quien adoro, quien es una luz en mi camino, esperando sembrar en él el gusto por el estudio.

A mis padres † quienes gustosos desde el cielo siempre me han acompañado. A mis hermanas Conchita y Lupilla por sus sabios consejos y porque algún día, creyeron en mí. A mi prima Lulucita por los ánimos y recomendaciones que atinadamente me brindó.

A todos mis maestros del Posgrado por su dedicación y sus enseñanzas. Siempre los recordaré con gratitud. A mis compañeras Elisa, Paty y Aída por el gran esfuerzo que hicieron para que juntas lográsemos hacer realidad este gran “reto”.

Al personal de la Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica del IMSS, muy especialmente a la D en C Anel Gómez García y al Lic. Carlos Gómez Alonso por sus invaluable aportaciones para la preparación de este documento. A los doctores Manuel Ledesma Ramírez y Jesús Ramírez Enríquez por su colaboración y sus consejos. Al

personal del Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital General Regional No. 1 del IMSS, con especial gratitud para el QFB Primo Fletes, la Dra. Geraldina y la QFB Pilar Martínez por sus extraordinarios esfuerzos en la toma de las muestras de los pacientes del presente estudio. A las enfermeras y trabajadoras sociales del 7° piso del Hospital primordialmente a Oli y Nieves de quienes aprendí mucho, esencialmente su humanismo.

A mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH Elda, Asdrúbal, Paulina, Yadira, Andrea, Poncho, Chucho, Mariana y Atziri por enseñarme a comprender eso tan sublime que se llama "Ciencia".

A mi gran maestro Pedro José Castañeda Guerrero y su familia, por haber logrado que yo vislumbrara parte de ese intrincado pero fascinante universo que son las matemáticas.

A los Laboratorios Clínicos Servimed, por permitirme realizar en sus instalaciones las pruebas de ELISA, recibiendo invaluable enseñanzas del Patólogo Clínico Carlos Bejar Lozano, la QFB Paulina Rodríguez Sánchez y el Dr. Adrián Rodríguez Cabrera. A ellos y a todo el personal del Laboratorio (médicos, químicos, técnicos, secretarías y afanadoras) mi más sincero agradecimiento.

A todos los pacientes que amablemente colaboraron para la ejecución de este protocolo de tesis. Que lo que se avanzó en el camino del conocimiento proporcione alivio para otros enfermos y redunde en su actual calidad de vida.

Finalmente, agradezco a Dios el haberme permitido concluir esta etapa de mi devenir en este mundo, que indiscutiblemente va a ser de mucha utilidad primordialmente para mi persona, mi familia, la Universidad Michoacana, mi estado y mi país.

ÍNDICE

RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	5
JUSTIFICACIÓN	27
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
HIPÓTESIS	29
OBJETIVOS	30
MATERIALES Y MÉTODOS	31
Diseño del estudio	31
Población de estudio	31
Tamaño de la muestra	32
Variables a estudiar en la población de estudio	33
Demográficas	33
Clínicas	33
Bioquímicas	33
Relacionadas con daño renal	34
Determinaciones	34
Extracción del ADN genómico	35
Reacción en cadena de la polimerasa	36
Determinación de la ECA	37
Análisis estadístico	37
Definición operacional de variables	38
RESULTADOS	41
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES	59
RECOMENDACIONES	60
RECONOCIMIENTOS	61
BIBLIOGRAFÍA	62
ANEXOS	77

RESUMEN

ANTECEDENTES. En las últimas décadas, la diabetes mellitus tipo 2 (DM-2), ha tenido un alarmante incremento en su incidencia y prevalencia en todo el mundo y en México, especialmente en la población México-americana. La predisposición genética para daño renal en el paciente con DM-2 parece ser el resultado del efecto final acumulativo de múltiples factores genéticos y ambientales. Los componentes del sistema renina-angiotensina (SRA) y los polimorfismos en sus genes son un área de intensa investigación de asociación para la enfermedad renal.

OBJETIVO. Determinar si existe asociación entre la presencia del genotipo D/D del gen de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), su concentración sérica y el desarrollo de nefropatía diabética en pacientes con DM-2 en una población Mexicana.

MATERIALES Y MÉTODOS. Se realizó un estudio transversal, de casos y controles. Se incluyeron 240 sujetos mayores de 30 años, de ambos sexos, con DM-2, que constituyeron el grupo de estudio, y 230 sujetos sanos tomados de tres estudios previos de la misma línea de investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) sin DM-2, que fue el grupo control. Se midió en suero glucosa, creatinina, colesterol, triglicéridos, c-LDL, c-HDL y ECA. Se calculó la tasa de filtración glomerular (TFG). Se realizó la genotipificación del polimorfismo I/D del gen de la ECA.

RESULTADOS. La población estudiada fue homogénea en sexo y edad. El genotipo D/D se asoció como factor de riesgo para el desarrollo de nefropatía diabética en los pacientes con $TFG \geq 90$ mL/min/1.73 m² y frecuencia alélica D de 0.611; y también para el grupo de pacientes con TFG de 60-89 mL/min/1.73 m² y frecuencia alélica D de 0.559 ($\chi^2 = 7.60$ y $\chi^2 = 9.88$, $p < 0.01$ respectivamente). El análisis univariado y multivariado consistentemente asoció a la edad del sujeto, años de diagnóstico de la DM-2, obesidad y dislipidemia como factores de riesgo independientes para daño renal. La población con el genotipo D/D, tuvo concentraciones séricas mayores de la ECA (640 ± 198 vs 520 ± 113 en el I/D y 474 ± 161 ng/ml en el I/I; $p < 0.05$).

CONCLUSIONES. Hubo una tendencia predominante del genotipo D/D del gen de la ECA y una asociación directa de las variables clínicas y bioquímicas con el desarrollo de daño renal en sujetos con DM-2, en población Mexicana.

ABSTRACT

BACKGROUND. In the last decades, the type 2 diabetes (DM-2) has had an alarming increment in its incidence and prevalence in the worldwide and in Mexico, especially in the Mexican-American population. The genetic predisposition for kidney damage in the patient with DM-2 is the final result of the accumulative effect of multiple genetic and environmental factors. The renin-angiotensin system (RAS) components and its genes polymorphism represent an area of intense research for the kidney disease.

OBJECTIVE. Determine if there is an association between the D/D genotype of the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene, the serum concentration of the enzyme and the development of diabetic nephropathy in patients with DM-2 in a Mexican population.

MATERIALS AND METHODS. A cross-sectional, case-control study was carried out. 240 patients were recruited, both sexes, with age > 30 years old with DM-2 who represented the study group and 230 healthy subjects, both sexes, who were taken from three prior studies that were made in the Investigation Unit from the Mexican Institute of Social Security (IMSS) Mexico, without DM-2 called control group. Glucose, creatinine, cholesterol, triglycerides, c-LDL, c-HDL and ACE were measured in serum. The glomerular filtration rate (GFR) was calculated. The ACE gene polymorphism was determined.

RESULTS. The study group was homogenous by sex and age. The D/D genotype was a risk factor for the development of diabetic nephropathy in the patients with GFR \geq 90 mL/min/1.73 m² and an allelic frequency of 0.611; and in patients with GFR 60-89 mL/min/1.73 m² and an allelic frequency of 0.559, ($\chi^2= 7.60$ y $\chi^2= 9.88$, $p < 0.01$ respectively). Consistently the univariate and multivariate assay associated the subject age, years of DM-2 diagnosis, obesity and dyslipidemia like independent risk factors for kidney damage. The D/D genotype population had the highest serum ACE concentrations (640 \pm 198 vs 520 \pm 113 in I/D y 474 \pm 161 ng/ml in I/I, $p < 0.05$).

CONCLUSIONS. There was a predominant tendency of the D/D genotype of the ACE gene and a direct association of the clinical and biochemical variables with the development of kidney damage in subjects with DM-2.

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus tipo 2 (DM-2), es un padecimiento crónico, hereditario, de etiología múltiple (1). Es una enfermedad poligénica, compleja (2-6) en la que los factores ambientales y nutricionales juegan un papel fundamental para el desarrollo de esta patología. Su incidencia y prevalencia han aumentado tanto en México (7) como a nivel mundial (4, 8, 9, 10, 11). En nuestro país, constituye un problema de Salud Pública ya que ocupa el primer lugar como causa de muerte entre las enfermedades crónico-degenerativas (12, 13). Existen poblaciones en las que se ha observado un incremento alarmante en su presentación como lo son los Hispano-americanos (especialmente México-americanos), Afro-americanos, Amerindios, nativos de Alaska y de las islas Polinesias (8). Entre los indios Pima de Arizona (14), quienes viven en reservas protegidas por el gobierno estadounidense, que ingieren dietas altas en carbohidratos, llevan una vida sedentaria y presentan gran tendencia a la obesidad, cerca del 50% de la población adulta, presenta DM-2. En contraste, los indígenas de las zonas montañosas del norte de la República Mexicana que corresponden a los Amerindios pero radicados del Río Bravo hacia abajo, que llevan a cabo una actividad física intensa, ingieren dietas bajas en calorías y presentan un índice de masa corporal (IMC) normal, tienen una prevalencia de DM-2 similar a la que se observa en el resto de los mexicanos, que es de 8.2% (12). Kumate y cols. en México, reporta una prevalencia entre 6.5 y 14% enfatizando que actualmente se observan casos de DM-2 en personas cada vez más jóvenes (7). El riesgo general de presentarla a nivel mundial es de 5 – 10% antes de los 65 años (1). Aún cuando se tengan datos de la prevalencia, cabe hacer notar que existe un número igual de pacientes no diagnosticados. En cuanto a su incidencia, en México, se presentan 180 nuevos casos por 100,000 habitantes por año (4, 9).

Una de las complicaciones microangiopáticas a largo plazo que deteriora la calidad de vida del paciente diabético, es la presentación de nefropatía que lo conduce al desarrollo de insuficiencia renal (15). La DM-2, es la causa más común

de enfermedad renal en etapa terminal (ERET) a nivel mundial (15). Lo anterior se debe a los siguientes hechos: 1) un aumento en su prevalencia e incidencia; 2) la esperanza de vida es mayor; 3) cambios en el estilo de vida (sedentarismo e ingesta de dietas inadecuadas) (15).

En México, la insuficiencia renal se presenta aproximadamente en el 40% de los casos de DM-2 (8). En función del trasfondo étnico, se encuentran los índices más altos (60%) en los indios Pima de Arizona (8) y los más bajos (15%) en la población caucásica (3, 11, 16, 17). La prevalencia de tasas de enfermedad renal crónica y la necesidad de terapia de reemplazo renal (diálisis peritoneal 90%, hemodiálisis 7% y/o trasplante renal 3%) en la República Mexicana, parece ser similar o mayor que la encontrada en los países industrializados (18), con los concernientes riesgos y costos para el individuo y el país, ya que esto ocurre en plena madurez y conlleva al sujeto a dejar de ser productivo convirtiéndose en una carga familiar, además de que, desafortunadamente, la insuficiencia renal terminal y la aterosclerosis lo llevan a la muerte prematura (19). El promedio de edad al morir de un paciente con DM-2 en México, es de 59 años, mientras que para la población general es de 75 años (20).

Las estimaciones económicas en todo el mundo indican que el costo para la salud de una persona con diabetes, es 2.5 veces mayor que para una persona sin ésta; este costo se incrementa con la presencia de complicaciones. En EUA, para 1995 el costo del tratamiento de un paciente con diabetes durante un período de tres años, se estimó en 10,500 dólares; mientras que para un sujeto con diabetes y con enfermedad coronaria e hipertensión arterial, se incrementó a 44,500 dólares (21). Los costos anuales en el país se estiman en 15 millones de dólares para el control metabólico, 85 millones de dólares en servicios de salud y 330 millones de dólares por costos indirectos (20). Este mismo año, otra estimación sobre el costo fijo de atención ambulatoria de la diabetes mellitus determinó que el costo anual promedio por paciente era de 708 dólares, lo que corresponde a un costo anual

total de 2,618 millones de dólares. Esto representó el 15.48% del gasto en salud (21).

Una de las herramientas importantes que sostiene la revolución en Genética Médica, es la capacidad de visualizar diferentes secuencias directamente en el ADN. Cuando son estudiadas en el contexto de una población, estas diferencias en las secuencias del ADN, son llamadas polimorfismos, es decir, la existencia simultánea de distintos alelos en una población para un *locus* determinado; éstos pueden ocurrir en regiones codificantes (exones) o en regiones no codificantes (intrones) de los genes. Por convención, se dice que un *locus* es polimórfico cuando la variabilidad afecta a más del 1% de la población (3, 22, 23).

La habilidad de detectar polimorfismos, ha hecho posible el estudio de sujetos con enfermedades crónicas comunes en los cuales los patrones de la herencia son complejos, tales como la diabetes mellitus, aterosclerosis, obesidad e hipertensión arterial sistémica (4, 23, 24). En la DM-2 está implicado más de un gen (carácter poligénico de la enfermedad) (8).

En los últimos años, se han venido estudiando una serie de polimorfismos para tratar de elucidar, al menos en parte, la naturaleza hereditaria de este trastorno metabólico, que incluyen a estos polimorfismos como factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad o de alguna de sus complicaciones.

El sistema renina angiotensina (SRA) juega un papel importante en la fisiopatología de la enfermedad renal en la DM-2, es por ello que se estudian varios polimorfismos de algunos de los componentes de este sistema que son de gran interés, como lo es el polimorfismo inserción/delección (I/D) del gen de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). La presencia (inserción) o ausencia (delección) de elementos de repetición *Alu* de 287 pares de bases (pb) en el intrón 16 que caracteriza su región polimórfica, determina el genotipo. La inserción (I) equivalente a 490 pb, y la delección (D) de 190 pb son utilizadas para caracterizar

el polimorfismo inserción/delección (I/D), inserción/inserción (I/I), delección/delección (D/D) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El alelo D/D sirve como marcador de riesgo para el desarrollo y progresión de nefropatía diabética y se acompaña de concentraciones mayores de ECA plasmática, lo que puede proporcionar la base para una relación entre la actividad constitutiva del sistema y el desarrollo de daño vascular renal en algunos sujetos, y explica el 47% de la varianza fenotípica de las cifras de ECA (25-27). Los individuos homocigotos para el alelo de delección (D/D) poseen concentraciones más altas de ECA plasmáticas y riesgo aumentado de nefropatía diabética, cardiopatía isquémica, hipertrofia de ventrículo izquierdo, hiperglucemia, muerte repentina y/o prematura (28).

Estudios previos (25, 29), demuestran la asociación entre el alelo D (D/D) del gen de la ECA y concentraciones en sangre mayores a las normales de la enzima, lo que incrementa el riesgo de desarrollar nefropatía en estos pacientes. Así mismo, se han realizado ensayos en varios países como Francia (30-34); Japón (35-37); China (38, 39); India (40); Turquía (41, 42); Estados Unidos (14, 43,); Brasil (44); Italia (45); Hong Kong (46); España (47); México (48) entre otros, cuyos resultados han sido controversiales ya que algunos autores reportan que sí existe tal asociación, como lo es entre los franceses, japoneses e hindúes, mientras que para los turcos existe asociación con la DM-2, pero no con la progresión a nefropatía diabética y entre los brasileños, no se ha demostrado ningún tipo de asociación.

ANTECEDENTES

Diabetes mellitus tipo 2 (DM-2)

a) Definición

La diabetes mellitus tipo 2 (DM-2), es un padecimiento crónico, hereditario, de etiología múltiple, conocido desde la antigüedad (6,000 a 3,000 a. C.) en las culturas de China, India y Japón. En los últimos 40 años se han propuesto diferentes definiciones quedando aceptada en el ámbito mundial, en 1979, la del Grupo Nacional de Datos de Diabetes (NDDG, National Diabetes Data Group) de los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos que establece que la diabetes es un grupo de alteraciones genéticamente heterogéneas que comparten en común la intolerancia a la glucosa (1).

La Norma Oficial Mexicana (12) a la letra dice: la diabetes mellitus, comprende a un grupo heterogéneo de enfermedades sistémicas, crónicas, de causa desconocida, con grados variables de predisposición hereditaria y participación de diversos factores ambientales que afectan al metabolismo intermedio de carbohidratos, proteínas y grasas que se asocian fisiopatológicamente con una deficiencia en la cantidad, cronología de secreción y/o en la acción de la insulina. Estos defectos traen como consecuencia una elevación anormal de la glucemia después de cargas estándar de glucosa e incluso en ayunas, conforme existe mayor descompensación de la secreción de insulina.

b) Factores de riesgo

En la génesis de la DM-2 además de los aspectos hereditarios, influyen en forma importante los factores ambientales y el estilo de vida en el que se desarrolla el individuo susceptible, debido a una menor actividad física (sedentarismo), una sobrealimentación con dietas inadecuadas ricas en carbohidratos, que conducen a

la hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos con mayor proporción de obesidad visceral abdominal, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, dislipidemias e hipertensión arterial sistémica, todos éstos, componentes del síndrome metabólico (49); edad (> de 50 años), historia familiar de diabetes, las mujeres con diabetes gestacional y/o el antecedente de productos macrosómicos (peso al nacimiento ≥ 4 kg) (50), prematuridad (18, 51-53), ingesta elevada de sal (54, 55) tabaquismo, alcoholismo, estrés, factores hormonales, abuso de algunos medicamentos por ejemplo glucocorticoides y el trasfondo étnico de la población estudiada, todos estos considerados como factores de riesgo (1, 2, 8, 9, 11) para la presentación de DM-2. Por todo lo anterior, a la DM-2 se le considera una enfermedad multifactorial.

Los mexicanos somos el producto del mestizaje de etnias indígena $34.1 \pm 1.9\%$, caucásica $67.2 \pm 2.1\%$ y negra $3.2 \pm 1.5\%$ (56); la raza indígena y la negra exhiben una mayor tendencia al desarrollo de DM-2 lo que, aunado a los factores de riesgo antes mencionados, son los responsables del incremento en el número de casos de DM-2 que se presentan sobretodo en la población México-americana.

c) Complicaciones

Este trastorno metabólico resulta de una combinación de deficiencia y/o resistencia a la insulina que conduce a una variedad de complicaciones agudas y crónicas. Las complicaciones agudas incluyen hiperglucemia sintomática que puede desarrollar coma hiperosmolar no cetósico, hipoglucemia que puede evolucionar a coma hipoglucémico y en raras ocasiones, cetoacidosis diabética. Actualmente, debido a los avances tecnológicos de las unidades de terapia intermedia e intensiva, éstas se manejan en los hospitales con buenos resultados. Las complicaciones crónicas ocurren usualmente 10 ó 15 años después del inicio de la enfermedad y abarcan repercusiones microangiopáticas en las que existe un daño en la célula endotelial (57, 58) que conduce a la aparición de nefropatía, retinopatía, neuropatía; macroangiopáticas en la que la aterosclerosis es la

responsable de un evento vascular cerebral y/o infarto del miocardio, así como la enfermedad vascular periférica que puede conducirlos a amputaciones (3, 5, 59, 60). Estas complicaciones crónicas, son las responsables de la mala calidad de vida, causando la muerte de estos pacientes de manera prematura. Afortunadamente puede evitarse su progresión si se lleva a cabo un estricto control de la glucemia.

NEFROPATÍA DIABÉTICA

La nefropatía diabética es una enfermedad glomerular que explica la mayor reducción de la expectativa de vida de los pacientes diabéticos (61); es una de las complicaciones a largo plazo que conduce a la insuficiencia renal en etapa terminal (IRET) y, el número de pacientes con diagnóstico de nefropatía diabética continuará en aumento hasta que sean instituidas medidas preventivas apropiadas.

La proporción de pacientes con IRET causada por la diabetes, se ha incrementado progresivamente durante las últimas décadas y la nefropatía diabética es ahora la causa más común de IRET en el mundo occidental. Por ese motivo, existen varios métodos de detección temprana de enfermedad renal. La determinación de la concentración de albúmina urinaria en la primera muestra de orina de la mañana por una prueba semicuantitativa (Micral), es el procedimiento de monitoreo más fácil y más efectivo en costo para identificar sujetos con microalbuminuria en una población de diabéticos tipo 2 (62). La prueba que más ampliamente se utiliza en la clínica, es la depuración de creatinina en orina de 24 h. La tasa de excreción de albúmina es un claro marcador disponible en la predicción del riesgo de nefropatía diabética y debe realizarse en el momento en que se hace el diagnóstico de DM-2, debido a la dificultad en precisar el dato de inicio de la enfermedad. Así mismo, se puede realizar el cálculo de la tasa de filtración glomerular (TFG) por el método de Cockcroft-Gault (63) mediante la siguiente fórmula:

Fórmula de Cockcroft-Gault:

$$\frac{140 - \text{edad (años)} \times \text{peso (kg)}}{72 \times \text{creatinina sérica (mg/dL)}}$$

En mujeres, el resultado se multiplica por 0.85.

El valor normal de la TFG es de 100-120 ml/min/1.73m². En el paciente diabético, podemos encontrar en un inicio, un incremento en la TFG debida a la hiperfiltración compensadora de las nefronas sanas; sin embargo, conforme avanza la enfermedad, la TFG va descendiendo paulatinamente hasta exhibir valores < de 15 ml/min/1.73m² presentando el paciente insuficiencia renal en etapa terminal, por lo que debe someterse a terapia de reemplazo renal (18).

Sin embargo, se necesitan implementar nuevos marcadores de riesgo de esta complicación ya sea con el uso de los métodos existentes, o el desarrollo de nuevas tecnologías, como: 1) identificación de genes asociados con incremento o disminución de riesgo de nefropatía diabética; 2) medición de sustancias en sangre y orina de productos finales de glucosilación avanzada de proteínas o de factores de crecimiento; 3) medición de la función tubular renal; 4) aspiración con aguja fina para una muestra de tejido renal que permita detectar cambios estructurales o bioquímicos asociados con el riesgo de nefropatía, y 5) desarrollo y aplicación de nuevas técnicas de imagenología como herramientas para detectar cambios renales incipientes en los pacientes diabéticos (10).

El desarrollo de nefropatía diabética depende principalmente de la duración de la enfermedad, falta de control de la glucemia y factores genéticos. Sin embargo, existe una gran variabilidad en la susceptibilidad para el desarrollo y progresión de la nefropatía diabética. Algunos pacientes desarrollan insuficiencia renal después de 15 ó más años del inicio de la DM-2, (8, 17, 30), mientras que otros enfermos no presentan estas complicaciones a pesar de tener varias décadas con el

trastorno metabólico (11). El hecho de que algunos pacientes con DM-2 estén protegidos contra la nefropatía diabética, proporcionó un indicio para buscar factores no glucémicos que modulan el riesgo de complicaciones renales; tales factores pueden ser genéticamente transmitidos. Los antecedentes étnicos en el riesgo de la pérdida progresiva de la función renal, sustentan el papel de los factores genéticos. El agrupamiento familiar de padecimientos renales que lleven al paciente a insuficiencia renal, proporcionó una pista adicional resaltando la importancia de los factores hereditarios (55).

a) Curso clínico de la nefropatía diabética

Al comienzo, los riñones aumentan de tamaño y muestran una hiperfiltración compensatoria que puede ser hasta de un 40% superior a la normal. En la etapa siguiente se manifiesta una microproteinuria con eliminación de albúmina de 30-300 mg/día (12). Cifras mayores constituyen una macroproteinuria la cual una vez iniciada, se acompaña de descenso constante de la función renal y de la tasa de filtración glomerular. En general, la hiperazoemia se inicia 12 años después del diagnóstico de DM-2. En ocasiones puede presentarse síndrome nefrótico caracterizado por proteinuria >3.0 g/24 h, hipoalbuminemia, edema, hiperlipidemia, lipiduria e hipercoagulabilidad siendo el componente esencial la proteinuria debida a la permeabilidad anómala de la barrera de filtración glomerular (2). La enfermedad se acelera en caso de hipertensión arterial sistémica (2, 3), por lo que la terapia antihipertensiva es benéfica ya que reduce la pérdida de la tasa de filtración glomerular y la micro o macroalbuminuria con reducción efectiva de la presión arterial. El bloqueo dual tanto con antagonistas del receptor 1 de angiotensina (ARA₁), como con los inhibidores de la ECA (IECAs) pueden proporcionar nefroprotección ya que entre otras acciones, disminuyen la producción renal del factor transformante del crecimiento β (TGF-β) (11). La restricción de las proteínas de la dieta (0.6 g/kg/día), mejora la sobrevida y retrasa la progresión de la enfermedad renal (64).

b) Anatomopatología

Las primeras anomalías morfológicas consisten en un engrosamiento de la membrana basal glomerular (MBG) y una expansión del mesangio que es la zona del corpúsculo renal desde donde parten las asas de capilares, contiene las células mesangiales incluidas en la matriz mesangial que ellas mismas sintetizan. Estas células mesangiales son de morfología irregular con prolongaciones citoplásmicas que se extienden entre los capilares, su citoplasma es rico en filamentos de actina y miosina por lo que tienen la capacidad de contraerse ante la estimulación de angiotensina II (Ang II) y son muy fagocíticas (65). La expansión del mesangio se debe a la acumulación de la matriz extracelular (2).

En la biopsia renal encontramos una glomeruloesclerosis eosinófila difusa y zonas de expansión nodular de la matriz (glomeruloesclerosis nodular), la clásica lesión de Kimmelsteil-Wilson (66).

c) Clasificación clínica de la nefropatía diabética

La clasificación clínica más utilizada es la de Mogensen (66) que la divide en cinco etapas: Etapa I, en la que se demuestra aumento de excreción de albúmina basal y post-ejercicio con hiperfiltración. Con un tratamiento optimizado de la diabetes, se puede revertir. Etapa II, aparecen lesiones histopatológicas mínimas, persiste el aumento del filtrado glomerular, la microalbuminuria se eleva en forma intermitente. Etapa III (nefropatía incipiente), se acentúan las lesiones y alteraciones funcionales y se puede demostrar un aumento incipiente de la presión arterial. Etapa IV (nefropatía clínica), con macroproteinuria, puede presentarse a veces, síndrome nefrótico, hipertensión arterial, retinopatía diabética y grados variables de insuficiencia renal. Etapa V (nefropatía avanzada), donde desarrollan el cuadro clínico del síndrome urémico.

c) Patogenia

Dentro de la patogénesis de la enfermedad, se ha enfatizado el papel que juega el “cuarteto disarmónico” en el que participan las células β del páncreas, disminuyendo la producción de insulina; el adipocito, incrementando la lipólisis (lo que produce lipotoxicidad de la que son responsables los ácidos grasos libres y los triglicéridos); el hígado, que aumenta la producción de glucosa y el músculo, que disminuye su captura; lo anterior, aunado a la resistencia a la insulina conduce a la hiperglucemia (5, 6) la cual es la responsable del daño en la célula endotelial produciendo un aumento en la secreción de endotelina-1 y disminución en la síntesis del óxido nítrico (2). El daño se perpetúa además por un incremento de la actividad de la proteína cinasa-C, la acumulación de sorbitol y la formación y depósito de productos de glucosilación no enzimática de las proteínas (6, 8, 9, 67, 68, 69). Dichos productos estimulan la síntesis de factores de crecimiento que incluyen el TGF- β , el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento similar a insulina (IGF-1). El TGF- β (68, 70-75) es de especial interés por su papel en la patogénesis de la nefropatía diabética (Figura 1). Los niveles altos de glucosa inducen un incremento de la permeabilidad glomerular, aumento de la presión intraglomerular e infiltración de monocitos/macrófagos en los glomérulos (6, 8, 9, 11, 59, 60, 64, 66). Así mismo, se encuentra implicado el SRA (4), que conduce a hipertensión sistémica e intraglomerular, proteinuria e invasión de macrófagos que perpetúan la destrucción del tejido renal, el cual se intenta reparar con fibrosis. Todo lo anterior, es desencadenado por las acciones de la Angiotensina II (Ang II), efector molecular de este sistema que interactúa con el TGF- β produciéndose la fibrosis tisular progresiva y finalmente la falla orgánica cuyos efectos conducen al paciente de manera inevitable al desarrollo de insuficiencia renal (67, 68) (Figura 1).

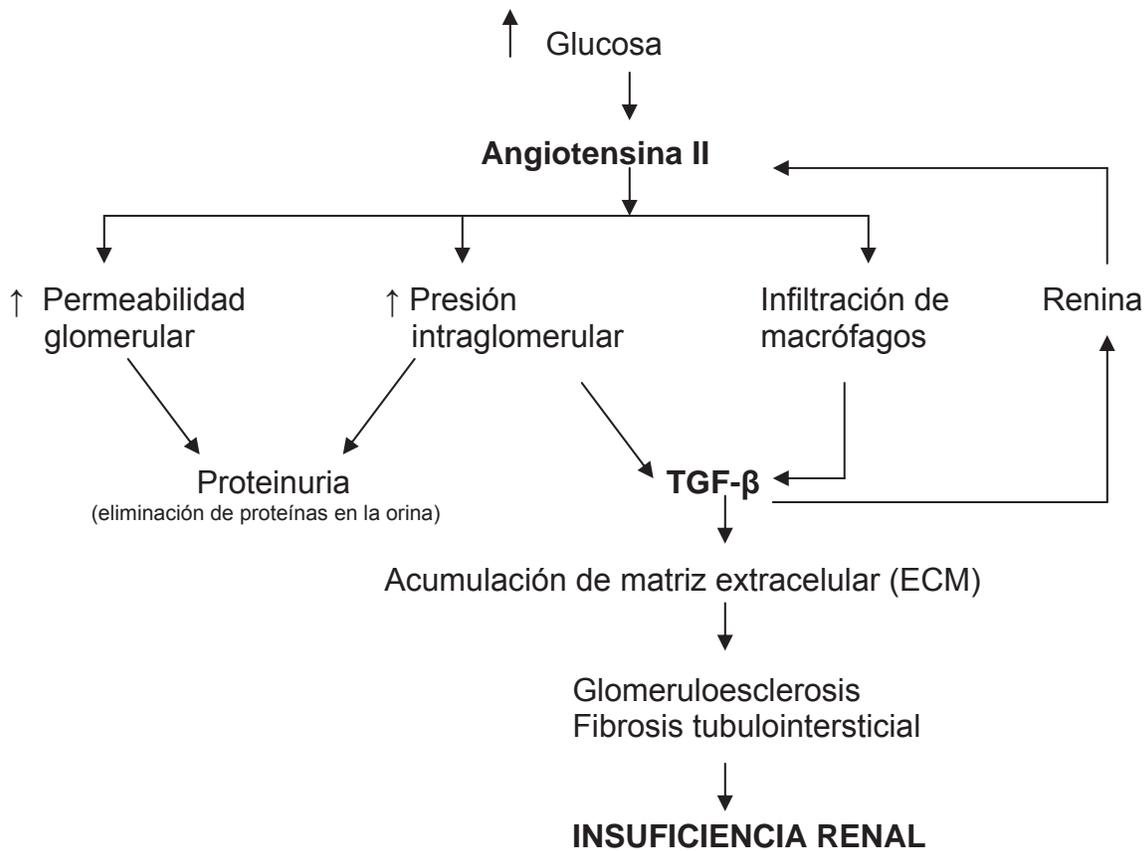


Figura 1. Papel de la angiotensina II en la patogénesis de la nefropatía diabética (Gilbert *et al.*, 2003, modificada).

Se han realizado estudios de asociación del polimorfismo del gen de la ECA y nefropatía diabética en prácticamente todo el mundo especialmente en Francia (30, 31, 32, 33, 34); Japón (35, 36, 37); China (38, 39); India (40); Turquía (41, 42); Estados Unidos (14, 43); Brasil (44); Italia (45); Hong Kong (46); España (47); México (48) entre otros, con resultados controversiales, ya que por un lado Marre *et al.* en Francia (29, 30), sí han encontrado asociación entre el genotipo D/D del gen de la ECA, concentraciones séricas de ECA mayores comparadas con el genotipo I/I e I/D y desarrollo y progresión a nefropatía diabética. Para los japoneses (35, 37), la presencia del genotipo D/D incrementa el riesgo de enfermedad renal en etapa terminal. Estos resultados sugieren que el gen de la ECA influencia el desarrollo y/o progresión de la nefropatía diabética. En pacientes asiáticos con DM-2 el riesgo de nefropatía se incrementó con la presencia del genotipo D/D o I/D y no se observó asociación en pacientes caucásicos con DM-2

(39). Entre los hindúes (40), también se ha demostrado una asociación positiva entre el alelo D (genotipo I/D o D/D) del polimorfismo del gen de la ECA y nefropatía diabética. En los indios Pima de Arizona (43), es frecuente que se diagnostique DM-2 en edades tempranas (antes de los 20 años) y mientras más pronto se manifieste la enfermedad, existe un mayor riesgo de presentar nefropatía diabética por lo que se hace énfasis en la necesidad de retrasar el inicio de la diabetes tanto como sea posible y una vez que la enfermedad se ha diagnosticado, administrar un tratamiento oportuno. En Turquía (41), se encontró que existe un incremento del genotipo D/D del gen de la ECA en pacientes diabéticos comparados con el grupo control (no diabéticos); sin embargo, no se demostró correlación con el desarrollo de nefropatía diabética. Los estudios realizados en Brasil (44), no han demostrado ningún tipo de asociación. En Barcelona, España, se encontró que los pacientes que desarrollaron enfermedad renal tenían un riesgo aumentado de evolución a nefropatía severa si ellos eran portadores del genotipo D/D (47). En cuanto a México, existe un estudio realizado por investigadores del Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez” y del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” para determinar el polimorfismo I/D del gen de la ECA en población sana perteneciente a diferentes grupos étnicos (mestizos, Teenek y Nahuas) encontrando una mayor frecuencia del alelo D en la población mestiza de la ciudad de México, D. F. (0.398) comparada con sujetos indígenas Teenek de San Luis Potosí (0.219) así como una mayor frecuencia del genotipo D/D en esa población mestiza, comparada (0.194) con el mismo grupo étnico de San Luis Potosí (0.00). En los grupos antes mencionados, las frecuencias observadas y esperadas estuvieron en equilibrio Hardy-Weinberg, mientras que el tercer grupo estudiado que fue el de los Nahuas, no estuvo en equilibrio, ya que presentaron una frecuencia del alelo D de 0.387 y un genotipo D/D de 0.020. Sin embargo, como se estudió población sana, no se determinó el riesgo de desarrollo y progresión a nefropatía diabética (48).

En los archivos de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, existe la tesis titulada Asociación del Polimorfismo del gen de la enzima convertora de angiotensina en hipertensión y diabetes mellitus tipo 2, cuyo objetivo fue el de investigar si el genotipo D/D del gen de la ECA se asocia al desarrollo de hipertensión arterial (HTA) y diabetes mellitus tipo 2. Se estudiaron 225 sujetos de ambos sexos, 88, con HTA o descendientes directos de pacientes con HTA; 83, con DM-2 y se compararon con 54 sujetos sanos sin HTA ni DM-2 que fue el grupo control. En ella se concluye que el genotipo D/D se asoció al desarrollo de HTA y DM-2 (76).

El mayor porcentaje de casos de diabetes mellitus, no sigue ningún patrón de herencia mendeliana, a excepción de un reducido grupo de pacientes que representan < 5%, los llamados *MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young)* de la que existen varios tipos (8) los cuales se caracterizan por presentar la enfermedad a temprana edad (infancia o adolescencia) y en al menos tres generaciones consecutivas. Se han mapeado diferentes genes de los cuales el más conocido es la mutación en el gen que codifica para la glucocinasa, enzima que inicia el metabolismo de la glucosa (*MODY-2*) (9) y se encuentra localizado en el sitio 7p13-15 en el brazo corto del cromosoma número 7. Es una enfermedad familiar con herencia autosómica dominante.

En la DM-2 también se ha demostrado la participación de la herencia materna proveniente del ADN mitocondrial donde se han identificado deleciones, duplicaciones y mutaciones puntuales en diabéticos (8, 22).

En cualquier célula de una misma especie (22, 23) un gen ocupa siempre el mismo lugar en un cromosoma determinado, y la posición equivalente en su homólogo, entendiéndose por gen una secuencia de ácido desoxiribonucleico (ADN) que codifica un producto funcional, ya sea una proteína o bien un ácido ribonucleico (ARN). Para referirse en forma genérica a esa posición, se utiliza el

término *locus* (*loci* en plural). A cada gen situado en un *locus* se le llama *alelo*. Puesto que cada cromosoma se presenta como par, en cada individuo hay dos *alelos* en el mismo *locus*, que pueden ser idénticos (homocigotos) o diferentes (heterocigotos). El estudio de trastornos clínicos ha permitido identificar numerosos *alelos*; aquéllos menos frecuentes en la población, sirven hoy como marcadores para identificar ciertas patologías (23).

En la DM-2 existen genes de susceptibilidad (candidatos) para padecer la enfermedad (77). Actualmente, se ha demostrado la existencia de varios genes polimórficos entre los que se encuentran el sustrato del receptor de insulina, el gen de la glucocinasa, genes para ciertos factores transcripcionales como la calpaína-10 (marcador de asociación para diabetes en pacientes México-americanos, su gen se encuentra en el brazo largo del cromosoma 2 y el polimorfismo se denomina UCSNP-43 con la variación G/A), así como en el gen del PPAR- γ (factor transcripcional del receptor de proliferación gamma del peroxisoma) (8, 11, 67, 78, 79). Es interesante resaltar que en varios de los componentes de la ruta de transducción de señales de la insulina como son el gen de la insulina, el receptor de la insulina, y los transportadores de glucosa, se han identificado muy pocos polimorfismos (8).

En la tabla 1 se citan varios genes polimórficos en pacientes con DM-2.

Tabla 1. Variantes de genes candidatos humanos para el desarrollo de nefropatía diabética (Susztak *et al.*, 2003 modificada).

Nombre	Símbolo	Variante	Cromosoma
Antígeno de histocompatibilidad	<i>HLA</i>	DR3/4	6
Enzima convertidora de angiotensina	<i>ECA</i>	I/D	17
Angiotensinógeno	<i>AGT</i>	M235T	1
Receptor tipo 1 de Angiotensina II	<i>ATR1</i>	A1166C	3
Aldosa reductasa	<i>ALR2</i>	alelo Z + 2	7
Heparán sulfato	<i>HSPG2</i>	BamHI	1
Apolipoproteína E	<i>APOE</i>	alelo e2	19
Paraoxonasa 1	<i>PON1</i>	T107C, Leu54Met	7
Sintasa de óxido nítrico endotelial	<i>eNOS</i>	alelo "a"	7
Metilentetrahidrofolatorreductasa	<i>MTHFR</i>	C677T	1

Interleucina 1 β	<i>IL1B</i>	T105C	2
Péptido natriurético auricular	<i>NPPA</i>	HpaII (C708T y Scal)	1
Proteína G β 3	<i>GPB3</i>	C834T/Trp64Arg	12
Ecto-nucleótido pirofosfatasa/ fosfodiesterasa	<i>ENPPI</i>	K121Q	6
Transportador de glucosa 1	<i>GLUT1</i>	XbaI/HaeIII	1
Factor de crecimiento transformante β 1	<i>TGFB1</i>	Leu10Pro, Arg25Pro, Thre263Ile	19

Así mismo, se realizan estudios en otros genes como lo son los de la glucógeno sintetasa (3), la aldosterona sintasa (80), entre otros, pero aún no se cuenta con la información completa de éstos.

Sistema renina-angiotensina (SRA) implicado en la insuficiencia renal

Se ha pensado que el SRA (Figura 2), juega un papel importante en la fisiopatología de la enfermedad renal en la DM-2 ya que estudios previos (25, 26, 29, 30), mostraron la asociación entre el alelo D (D/D delección/delección) del gen de ECA y altas concentraciones en sangre de esta enzima, en pacientes que desarrollaron nefropatía diabética. Existen cada vez más evidencias de que la progresión de la nefropatía es más rápida en pacientes con genotipo D/D (29, 30, 35, 39, 40, 41, 70, 76, 81, 82, 83). Estudiar este sistema es de gran interés ya que algunos componentes del mismo, en especial, el gen de ECA exhibe un polimorfismo debido a la presencia o ausencia de una secuencia repetitiva *Alu* de 287 pb. Dicho polimorfismo podría proporcionar la base para una relación entre la actividad constitutiva del SRA (84) y el desarrollo de daño vascular renal en algunos sujetos.

Las secuencias *Alu* constan de 100 a 500 pb, son repetitivas, y su nombre se debe a que contienen un sitio de corte para la enzima de restricción *Alu-I*. Se trata de una familia de secuencias que constituye alrededor del 10% del genoma, se encuentran más de un millón de estos elementos en el ADN y sólo un pequeño número de éstos son capaces de moverse y se incorporaron al genoma por

duplicación vía un ARN intermediario en un proceso llamado retroposición hace millones de años (85-96). Recientes hallazgos sugieren que dichos elementos pueden tener un impacto en la evolución ya que afectan genes estructurales, secuencias proteicas, corte y empalme así como patrones de expresión por lo que se pueden considerar marcadores filogenéticos. La mayoría de las amplificaciones de *Alu* ocurrieron tempranamente en la evolución y la tasa actual de retroposición de *Alu* es al menos 100 veces más lenta que el pico de amplificación que ocurrió hace aproximadamente 50 millones de años. Por lo tanto, los elementos *Alu* son una fuente rica de variaciones genómicas inter e intraespecie (22, 23, 82).

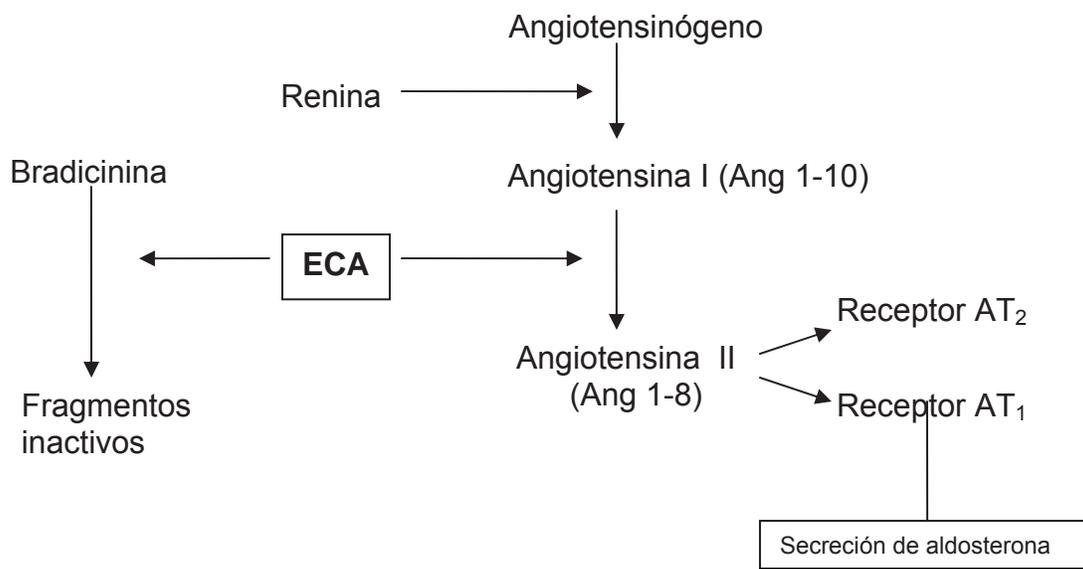


Figura 2. Vía clásica de la producción de Angiotensina II. (Crisan y Carr, 2000, modificada).

El SRA funciona como un sistema endocrino (sistémico) y/o como un sistema paracrino (local) (82) principalmente en el riñón (en donde la cantidad de angiotensina que se sintetiza es 1000 veces superior a la plasmática) (75)); lo encontramos también en corazón, vasos sanguíneos, sistema nervioso y gónadas y juega un papel clave en la regulación de la presión arterial y del equilibrio hidroelectrolítico en mamíferos.

La ECA somática se localiza en líquidos orgánicos como el plasma, líquido amniótico y líquido seminal y es producida por la célula endotelial (82). En la vía clásica de este sistema, la renina, que es secretada por el aparato yuxtaglomerular del riñón en respuesta a una variedad de estímulos (disminución del volumen sanguíneo arterial efectivo, reducción en el sodio plasmático, aumento de catecolaminas en sangre) (97), actúa sobre una proteína circulante que se sintetiza en el hígado llamada angiotensinógeno o sustrato de renina, generando el decapeptido angiotensina I (Ang I). La Ang I es convertida por la ECA en el octapéptido Ang II, principalmente durante el paso de la sangre a nivel pulmonar, por remoción del dipéptido His-Leu en el extremo C-terminal (Figura 2). La Ang II tiene un potente efecto vasopresor actuando a través de uno de sus receptores, el receptor AT₁ que está acoplado a la proteína G produciendo vasoconstricción sistémica, disminución del flujo sanguíneo renal y aumento de la presión capilar glomerular y de la permeabilidad (75, 82, 84, 98). Así mismo, Ang II, estimula la retención de sodio y agua actuando directamente en las células tubulares (del nefrón distal) por acción de la aldosterona liberada de la capa glomerular de la corteza adrenal (99, 100).

Recientemente, a la angiotensina II también se le han atribuido otras posibles acciones implicadas en la génesis de la nefropatía diabética, entre ellas, (98) promover el crecimiento del músculo liso vascular, contracción de las células mesangiales con reducción del área de superficie para la filtración, proliferación e hipertrofia de las células renales y de la célula tubular renal debido a la liberación de factores de crecimiento como el TGF- β ; estimular la producción de radicales superóxido, inducir resistencia a la insulina, aumentar la síntesis de la matriz extracelular (ECM) que incrementa por un lado la producción de colágena y por otro, inhibe su degradación (75), lo que conduce a una glomeruloesclerosis renal (68) que lleva al paciente a insuficiencia renal (Figura 1 y 3). La Ang II también interfiere en el proceso fibrinolítico estimulando el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) y activando a los macrófagos (68, 75, 82, 84, 88, 97, 101-103).

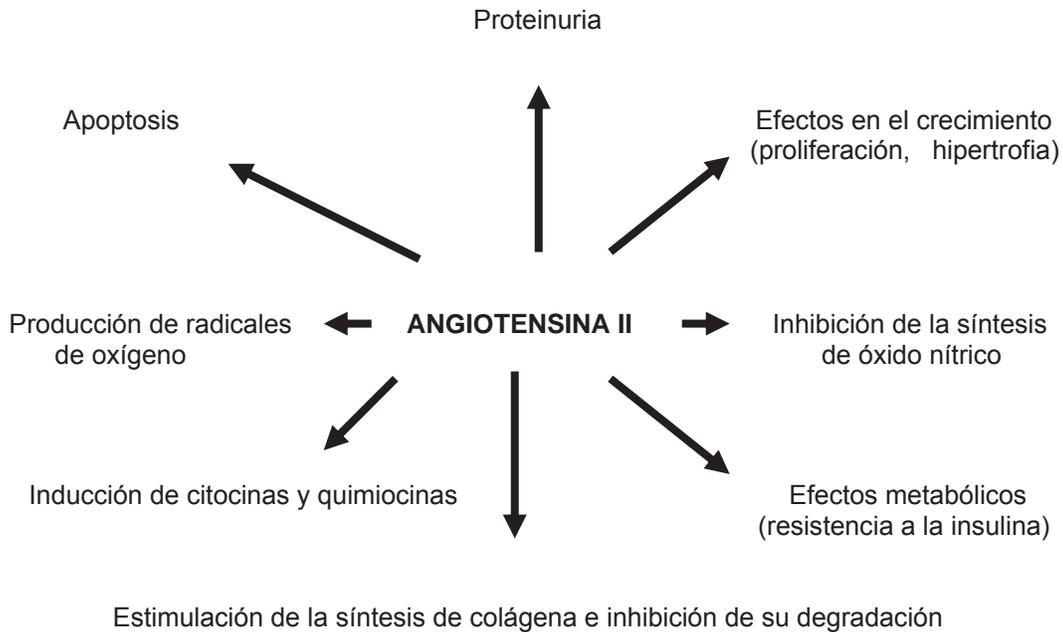


Figura 3. Efectos no hemodinámicos de la Angiotensina II en el riñón mediados a través del receptor AT₁ (Wolf *et al.*, 2003, modificada).

La Ang II a través de los receptores AT₂, también acoplados a la proteína G, generalmente median los efectos contrarios, esto es, producen vasodilatación, disminución de la presión arterial sistémica, inhibición de la proliferación celular, apoptosis, efecto antitrombótico por inhibición del PAI-1, aumento en la síntesis de óxido nítrico y prostaglandinas vasodilatadoras (82).

La ECA también inactiva al péptido vasodilatador bradicinina (BK) removiendo el dipéptido Phe-Arg en el extremo carboxilo-terminal (82). La BK deriva del cininógeno por acción de la calicreína (sistema cinina-kalicreína) (82). Debido a este doble papel de la ECA, su inhibición previene por un lado, la formación de Ang II un potente agente hipertensor y por otro, potencia las propiedades hipotensoras de la BK lo cual conduce a una disminución de la presión arterial (19, 84). Durante la hidrólisis de ambas, Ang II y BK, la ECA actúa removiendo el dipéptido en el C-terminal del sustrato, pero puede también actuar como endopeptidasa sobre algunas otros péptidos tales como la colecistocinina, luliberina (hormona liberadora de LH: LHRH), sustancia P, neurotensina, encefalina y endorfinas (84).

Además de la vía clásica ya descrita, se reporta la formación de Ang II por acción de otras enzimas como la quimasa, carboxipeptidasas, catepsina G y tonina (102), aunque el papel de estas vías alternas no está del todo entendido en los estados fisiológicos o patológicos. Más aún, mientras la Ang II se considera el mediador más importante del sistema, algunos otros péptidos escindidos de ésta, también muestran actividad biológica. Las acciones de estos fragmentos, que incluyen la angiotensina 1-7, la angiotensina III (2-8) y la angiotensina IV (3-8), continúan en estudio (64) (Figura 4).

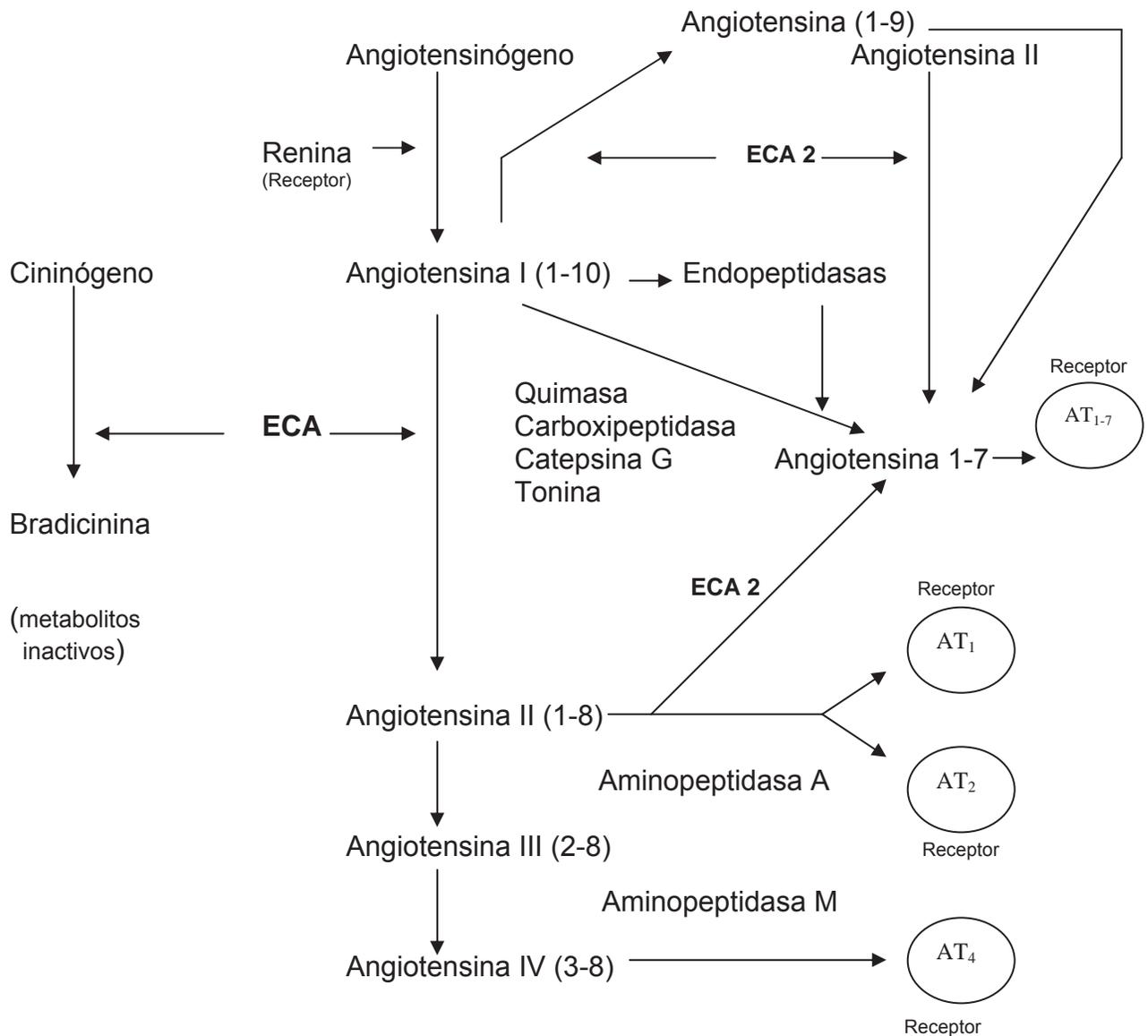


Figura 4. Sistema renina-angiotensina. Vía clásica y alterna. (Gilbert *et al.*, 2003. Carey, 2003, modificada).

Existen otros dos receptores de angiotensina, el receptor AT_{1-7} sobre el que actúa la angiotensina 1-7, y cuyos principales efectos son vasodilatación, antiproliferación y apoptosis; y el receptor AT_4 estimulado por la angiotensina IV e implicado en el aprendizaje, memoria, flujo sanguíneo y natriuresis (75, 84) (Figura 5).

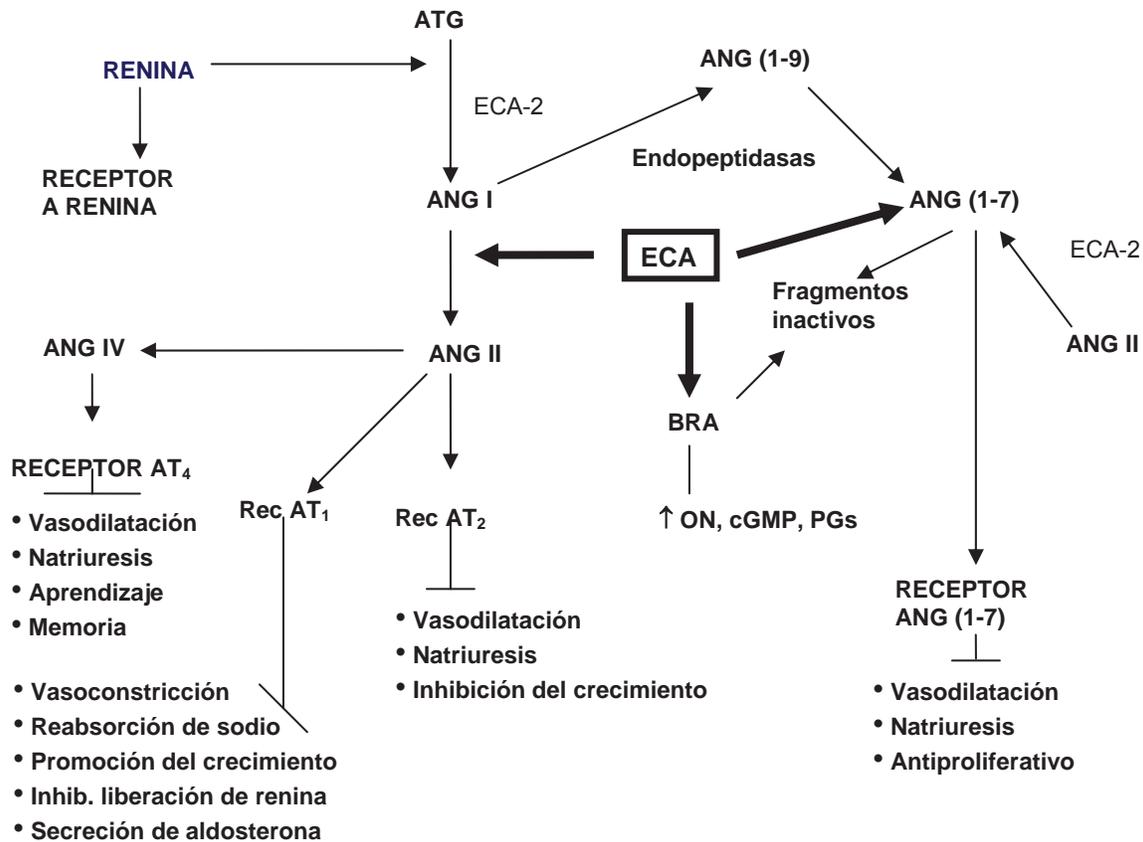


Figura 5. Esquema del SRA incluyendo ECA, ECA-2, ANG I, ANG II, ANG 1-7, ANG 1-9, ANG IV, sus receptores y su efecto (Carey y Siragy, 2003, modificada).

Los diferentes tipos de angiotensinas, difieren en la secuencia de sus aminoácidos; la más larga es el deca péptido Ang I y la más corta es la angiotensina IV, constituida únicamente por seis aminoácidos (84), como se puede apreciar a continuación:

Ang I	Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe His Leu
Ang II	Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe
Ang III	Arg Val Tyr Ile His Pro Phe
Ang IV	Val Tyr Ile His Pro Phe
Ang 1-7	Asp Arg Val Tyr Ile His Pro
Ang 1-9	Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe His

Características de la enzima convertidora de angiotensina (ECA)

La ECA (104, 105) se aisló en 1956 (84), es una peptidildipéptido hidrolasa monomérica, bilobulada (97), presente en casi todos los tejidos humanos, que se ancla a la membrana celular por su segmento hidrofóbico C-terminal en células epiteliales, endoteliales, glomerulares, tubulares renales y testiculares y pertenece a la familia de las metaloproteasas dependientes de zinc (Figura 6 A) (84). La ECA puede ser solubilizada pasando a la circulación sistémica y a otros líquidos corporales gracias a su escisión del plasmalema por una secretasa (Figura 6 B). Existen dos isoformas de la enzima en humanos, ECA somática (endotelial) y ECA germinal (testicular), ambas codificadas por el mismo gen (Figura 7) pero transcritas por promotores alternativos (106). La forma somática (larga) está compuesta por dos dominios, cada uno de los cuales, contiene un sitio activo en tándem, constituido por el motivo de unión al zinc: HEMGH (His-Glu-Met-Gli-His) (Figura 7) encontrado en muchas de las zinc peptidasas (las histidinas son los ligandos para el metal). Sin embargo, cada molécula contiene un único átomo de zinc sugiriendo que solamente un dominio es capaz de coordinar el metal (105). En tanto, la forma germinal (corta) de la cual se conoce poco, presenta únicamente un sólo sitio activo que corresponde al extremo carboxilo de la ECA somática (25, 28, 29, 63). Esto implica que hubo un evento de duplicación del gen muy temprano en la evolución.

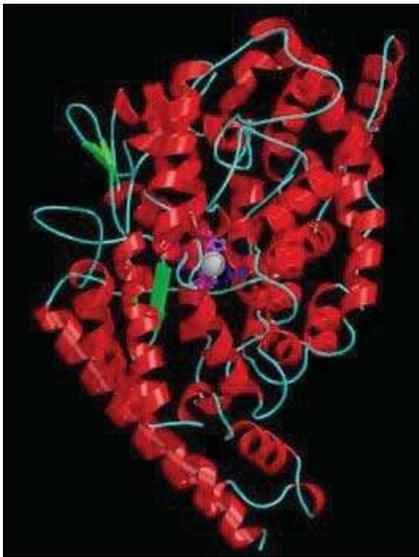


Figura 6 A

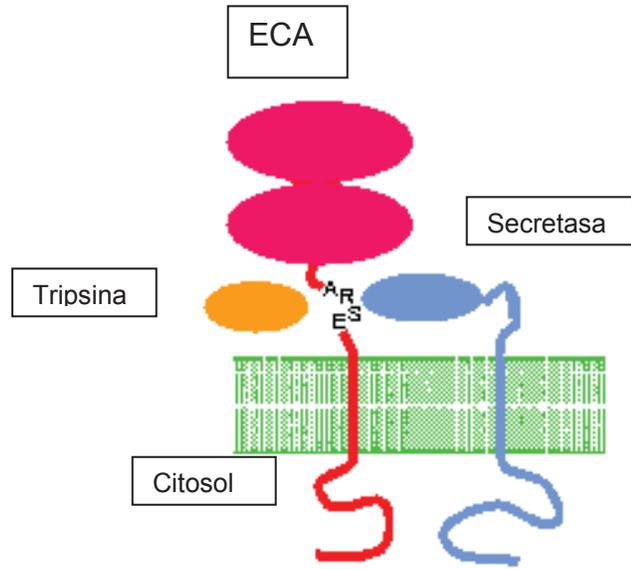


Figura 6 B

Figura 6 A. Estructura terciaria de la ECA. El sitio catalítico que contiene el zinc, se muestra como una esfera gris brillante.

Figura 6 B. Modelo del tallo de escisión yuxtamembranal de la ECA por su secretasa o tripsina unida a la membrana celular. (A = Ala, R = Arg, S = Ser y E= Glu). La secretasa de la ECA escinde la forma somática en los residuos Arg-Ser, para ser solubilizada.

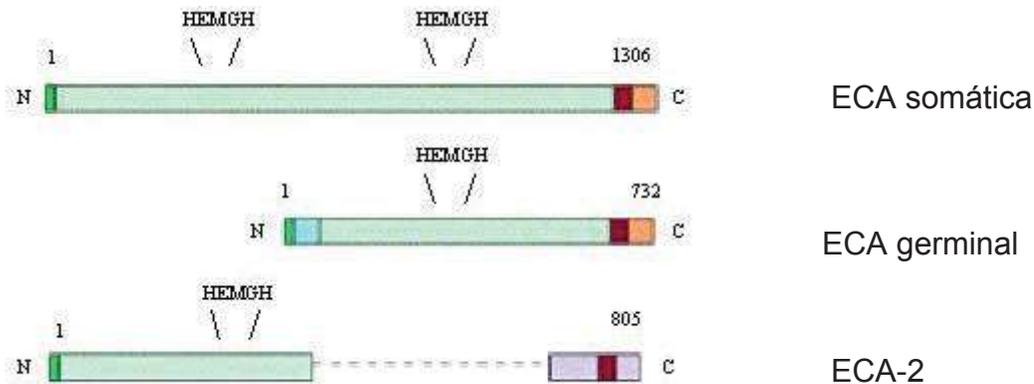


Figura 7. Representación esquemática de homólogos de la ECA. (Turner, 2002, modificado). HEMGH = His-Glu-Met-Gli-His.

El gen que codifica la ECA somática es un gen de copia única de 21 kb (97, 105), localizado en el brazo largo del cromosoma 17 (17q23). Está constituido por 26 exones y 25 intrones (82, 106) (Figura 8) y contiene una región polimórfica en el intrón 16. La inserción (490 pb) o deleción (190 pb) de cualquiera de los fragmentos de 287 pb en el intrón 16 determina el genotipo, los cuales se utilizan para caracterizar el polimorfismo I/D, I/I, D/D mediante técnicas de biología molecular por medio de PCR (26). Este polimorfismo de inserción-deleción (I/D) explica el 47% de la varianza fenotípica de las cifras plasmáticas de ECA. Los individuos homocigotos para el alelo de deleción D/D (190 pb) poseen concentraciones mayores de ECA plasmáticas, riesgo aumentado de cardiopatía isquémica, muerte repentina, hipertrofia de ventrículo izquierdo, hiperglucemia y nefropatía diabética entre otros (4, 25, 84).

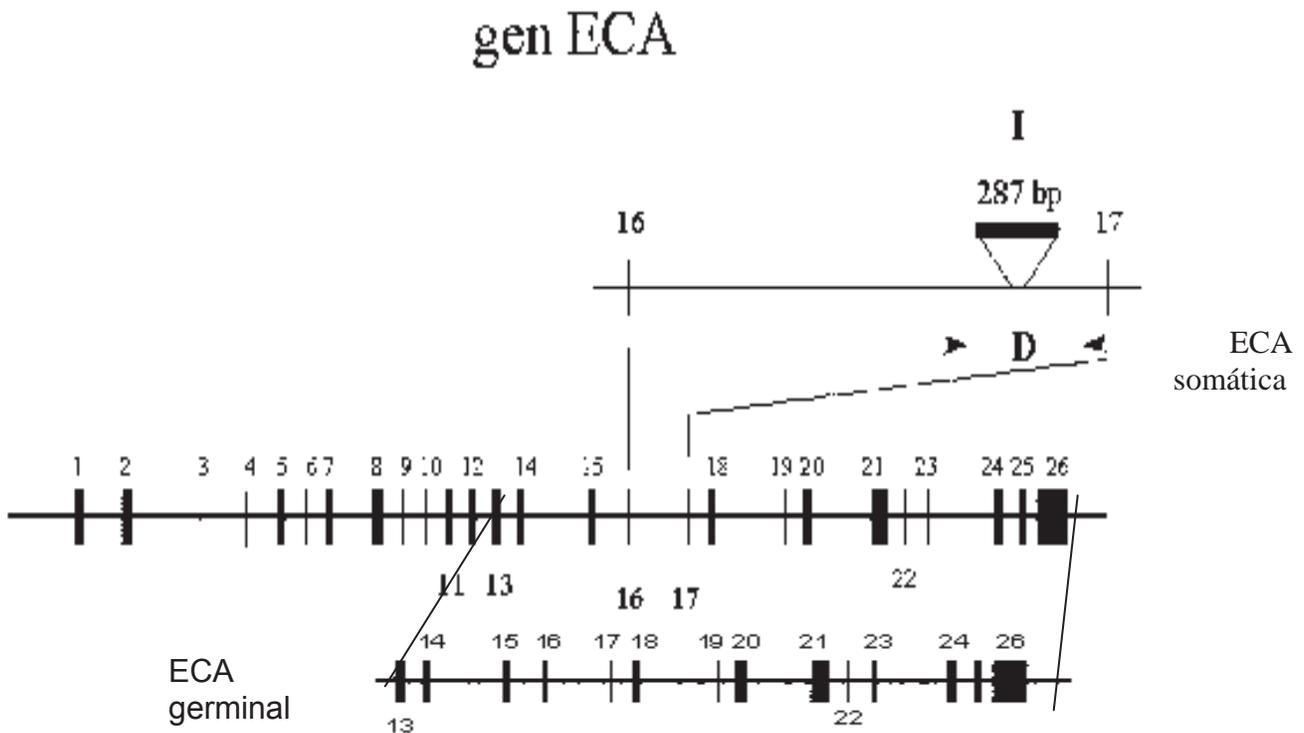


Figura 8. Gen de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) somática. Se presenta la región polimórfica con la inserción del elemento de repetición *Alu* de 287 pb en el intrón 16 y la ECA germinal (Poch, 2000, modificada).

Además, los pacientes con el genotipo D/D son menos susceptibles al efecto antiproteínúrico de los IECAs (76), por lo que en ocasiones, responden mejor al tratamiento con ARA₁ (109-112). Así mismo, la tasa de función renal perdida a largo plazo, es más rápida en pacientes con genotipo D/D (17, 30, 31, 55,).

El ADN complementario (ADNc) de ECA somática consiste en 4024 nucleótidos que codifica un ARN mensajero de 4.3 kb [transcripción del exón 1 al 26, excluyendo el exón 13 por corte y empalme (splicing alternativo)] (82, 105, 106), esto da como resultado una proteína de 1306 aminoácidos, con una masa molecular de la enzima madura de 150.9 kDa, particularmente abundante en la superficie endotelial de los pulmones, en el borde en cepillo de las células del riñón, intestino, placenta y plexos coroides (100). El exón 26 codifica para el dominio de anclaje de la ECA a la membrana celular (82).

La ECA germinal (Figura 8) está constituida por 14 exones y 13 intrones (del exón 13 al 26), es transcrita gracias a la existencia de un promotor interno (alternativo) en el intrón 12, se encuentra exclusivamente en el testículo donde se sabe que juega un papel crucial en la fertilidad y codifica un ARN mensajero de 3 kb y una proteína de 732 aminoácidos (84, 107).

La expresión de las dos formas anteriormente descritas, está bajo regulación hormonal; la enzima endotelial es inducida por glucocorticoides, mientras que la forma testicular se estimula por andrógenos (105).

Recientemente se ha identificado un homólogo de la ECA llamado ECA 2 (84, 97, 113, 114), (Figura 7) una carboxipeptidasa que remueve aminoácidos hidrofóbicos o básicos en el extremo C-terminal y que al parecer tiene importancia en la función cardíaca. Se produce principalmente en el endotelio de los vasos coronarios e intrarrenales así como en el epitelio tubular renal y el testículo (84). La ECA 2 es una enzima recientemente descubierta tanto en roedores como en humanos. Su distribución es mucho más restringida que la ECA y se expresa principalmente en

corazón y riñón. La DM-2, se asocia con disminución en la expresión renal de esta enzima. Su importancia estriba en que puede funcionar como un sistema contra-regulador de la ECA modulando el balance entre la respuesta de vasodilatación y la de vasoconstricción en el corazón y en el riñón desempeñando un papel importante en la regulación de la función renal y cardiovascular (113, 114). La proteína está constituida por 805 aminoácidos incluyendo la secuencia de señal N-terminal y una región hidrofóbica cerca del C-terminal que parece servirle como anclaje a la membrana celular. Contiene un sólo motivo de unión al zinc, el cual es el sitio activo de la enzima y comparte un 40% de identidad con la ECA somática. El gen que codifica la ECA 2, se localiza en el brazo corto del cromosoma X, contiene 18 exones y 17 intrones y se extiende aproximadamente 40 kb (108). Las similitudes entre las secuencias de ECA 2 y ECA indican que existe una relación evolutiva entre estos dos genes (84).

La ECA 2 hidroliza la Ang I a angiotensina (1-9) y la Ang II a angiotensina (1-7) (113, 114); como no convierte la Ang I a Ang II, no es bloqueada por los IECAs (75, 84). Sin embargo, su actividad es completamente inhibida por el anticoagulante EDTA (ácido etilen-diamino-tetra-acético) (108).

De los otros componentes del SRA, se sabe que el gen de la renina se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 1, se extiende aproximadamente 12 kb y comprende 10 exones y 9 intrones. El gen del angiotensinógeno, también se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 1, se extiende 13 kb y comprende 5 exones y 4 intrones. El gen del receptor AT₁ de Ang II se encuentra en el cromosoma 3 y el receptor AT₂, en el cromosoma X (82). En estos elementos del sistema, también se han encontrado polimorfismos.

JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus tipo 2, es un problema de Salud Pública mundial. El 20 – 40% desarrolla nefropatía diabética (5, 17, 30) siendo ésta la causa más común de insuficiencia renal en etapa terminal (IRET) lo que conlleva a una menor expectativa y calidad de vida de estos pacientes.

Lo anterior, ha inquietado al sector salud, por lo que se han desarrollado proyectos estratégicos epidemiológicos para conocer el problema real de algunas enfermedades crónico-degenerativas. Así, se realizó un estudio de prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 en la ciudad de Morelia, Michoacán encontrando una tasa conocida de 5.3% y desconocida de 5.6% (tasa total de 10.9%) (18) superior a la que se reporta a nivel nacional y semejante a la de los países industrializados.

Siendo la DM-2 la principal enfermedad metabólica para el desarrollo de IRET, es necesario utilizar las herramientas tecnológicas actuales, para realizar un diagnóstico temprano e identificar marcadores clínicos, bioquímicos y genéticos de riesgo para esta complicación crónica de la enfermedad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La nefropatía diabética se desarrolla únicamente en una fracción de sujetos con DM-2 en función de determinantes clínicos, bioquímicos y de trasfondo étnico. En ciertas poblaciones en las cuales existe un aumento en su prevalencia, tales como los Amerindios, México-americanos, Afro-americanos, entre otras, la presentación de daño renal se encuentra alrededor del 40%. Varios estudios farmacológicos y genéticos indican que la hiperglucemia induce activación del sistema renina-angiotensina, que conduce a un incremento en la resistencia vascular renal. Lo anterior, ha sido relacionado con el gen que codifica para la ECA describiéndose un polimorfismo inserción/delección (I/D). Los individuos portadores del genotipo D/D poseen concentraciones mayores de ECA plasmática (25) y muestran un incremento en la tasa de progresión de enfermedad renal; sin embargo, esto no ha sido demostrado en poblaciones mexicanas.

Por lo anterior, nos hacemos la siguiente pregunta:

¿El polimorfismo del gen de la ECA, así como variables clínicas y bioquímicas se encuentran relacionadas al desarrollo y progresión de la nefropatía diabética en los pacientes con DM-2 en población mexicana?

HIPÓTESIS

El polimorfismo I/D del gen de la ECA especialmente el genotipo D/D, variables clínicas y bioquímicas se relacionan con el desarrollo y progresión de nefropatía diabética en una población mexicana con DM-2.

OBJETIVOS

GENERAL

Determinar si existe una asociación entre la presencia del genotipo D/D del gen de la ECA, la concentración de la enzima y el desarrollo de nefropatía diabética en una población mexicana con DM-2.

ESPECÍFICOS

1. Evaluar la influencia del gen de la ECA en el desarrollo y progresión de nefropatía diabética.
2. Valorar la importancia de las variables clínicas en el desarrollo y progresión de nefropatía diabética.
3. Estimar el valor de las variables bioquímicas en el desarrollo y progresión de nefropatía diabética.
4. Identificar las variables clínicas y bioquímicas que tuvieron una mayor influencia en el desarrollo y progresión de nefropatía diabética.

MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Se realizó un estudio epidemiológico, transversal, de casos y controles.

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se estudiaron 240 sujetos con DM-2, que acudieron a la consulta externa de la Unidad de Medicina Familiar No. 80 y al Servicio de Nefrología del Hospital General Regional No. 1 (HGR No.1) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) de la ciudad de Morelia, Michoacán, que constituyeron el grupo de estudio; quienes participaron bajo los siguientes criterios: pacientes de ambos sexos, mayor de 30 años, con diagnóstico de DM-2 según los criterios de la Asociación Americana de Diabetes (ADA) (15). De cada uno de los pacientes se elaboró una hoja de registro con sus datos que incluyó ficha de identificación, antecedentes heredofamiliares, personales patológicos y no patológicos, exploración física, medicamentos, reporte de resultados de las pruebas bioquímicas y genotipificación (anexo 1). El grupo de estudio fue subdividido en cuatro categorías según la TFG siguiendo los criterios de clasificación de la insuficiencia renal crónica propuestos por la “Kidney Disease Outcomes Quality Initiative Guidelines” (K/DOQI) (115).

Tabla 2. Estadios de la enfermedad renal crónica

Estadio	Descripción	TFG (mL/min/1.73 m ²)
1	Daño renal con TFG normal o ↑	≥ 90
2	Daño renal con TFG ligeramente ↓	60-89
3	Moderada a severa ↓ de la TFG	15-59
4	Insuficiencia renal	< 15 (o diálisis)

TFG = tasa de filtración glomerular. La enfermedad renal crónica es definida ya sea como daño renal o con una TFG < 60mL/min/1.73 m² por ≥ 3 meses. El daño renal se define como anomalías patológicas o marcadores de daño,

incluyendo anomalías en pruebas de sangre, orina o estudios de imagenología (115).

Todos los participantes dieron su autorización por escrito una vez que fueron informados ampliamente de los objetivos del estudio (anexo 2). El protocolo se autorizó por el Comité Local de Investigación del HGR No.1 del IMSS y por el Comité de Evaluación de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH).

Los datos del presente ensayo, fueron comparados con un grupo control constituido por 230 sujetos tomados de tres estudios previos (18, 76) de la misma línea de investigación del IMSS, sin diabetes mellitus tipo 2, estratificados por edad y sexo.

TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se determinó usando la fórmula para comparar promedios (tamaño de la muestra en cada grupo):

$$n = \frac{(u + v)^2 (s_1^2 + s_2^2)}{(m_1 - m_2)}$$

donde:

u = poder del 80%

v = nivel de significancia = 5% (1.96)

s₁ = desviación estándar del grupo de estudio basado en la depuración de creatinina (20 mL)

s₂ = desviación estándar del grupo control basado en la depuración de creatinina (30 mL)

m₁ = promedio de la depuración de creatinina en el grupo de estudio (80 mL)

m₂ = promedio de la depuración de creatinina en el grupo control (95 mL)

lo que resultó una n de 60.6 pacientes por grupo. Los datos se tomaron de los resultados obtenidos de la cohorte estudiada para identificar la prevalencia de insuficiencia renal, diabetes mellitus e hipertensión arterial en 3,564 adultos de la ciudad de Morelia, Michoacán (18).

VARIABLES ESTUDIADAS

VARIABLES DEMOGRÁFICAS

Edad y sexo.

VARIABLES CLÍNICAS

Peso (kg) y talla (m), medidos en una báscula con estadímetro marca Torino; circunferencia abdominal (CA) (cm), medida con cinta métrica; índice cintura-cadera (ICC), medido con cinta métrica; índice de masa corporal (IMC) calculado con la siguiente fórmula: $\text{peso kg}/\text{talla m}^2$; presión arterial sistólica (PAS); presión arterial diastólica (PAD) la cual fue tomada con un esfigmomanómetro de mercurio (Mercurial Sphyngomanometer American Diagnostic Corporation USA) previamente calibrado, con el paciente sentado, con 5 minutos de reposo previo y por lo menos 30 minutos sin haber ingerido bebidas cafeïnadas o fumar cigarrillo.

VARIABLES BIOQUÍMICAS

Glucosa sérica de ayuno, creatinina, colesterol, triglicéridos, c-HDL, c-LDL, todas se determinaron por el método enzimático colorimétrico con un equipo para química clínica (Spectronic® Genesys™ 2 USA) con estuches comerciales (Randox Laboratorios LTD United Kingdom) y los resultados se reportan en mg/dL. La enzima conversora de la angiotensina se cuantificó por el método de ELISA

[Angiotensin Converting Enzyme (ACE) ELISA Kit Chemicon Internacional, Inc. CA, USA] y los resultados se reportan en ng/mL.

VARIABLES RELACIONADAS A DAÑO RENAL

Además de los valores de la presión arterial, fue registrado también el tipo de tratamiento antihipertensivo y la tasa de filtración glomerular (TFG) determinada por la depuración de creatinina en orina de 24 h y/o por la fórmula de Cockcroft-Gault (59). Según el resultado, se clasificaron de acuerdo a las guías K/DOQI mencionadas previamente.

DETERMINACIONES

Se tomó una muestra de sangre venosa (5 mL) por duplicado teniendo al paciente en ayuno de al menos 8 h, utilizando para todas las tomas material desechable estéril. La sangre del primer tubo se centrifugó y separó el suero, el cual se congeló a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización, para la cuantificación de glucosa, creatinina, lípidos y la ECA.

El segundo tubo fue tomado con EDTA como anticoagulante el cual se utilizó para la purificación del ADN de los núcleos de los leucocitos y la realización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y genotipificación del polimorfismo I/D del gen de la ECA.

Los estudios bioquímicos se procesaron en el Laboratorio de la Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica del HGR No.1 del IMSS de Morelia, Michoacán, la cuantificación sérica de la ECA se realizó en un Laboratorio Clínico Privado. La genotipificación del polimorfismo I/D del gen de la ECA se determinó en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH.

EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO

El ADN genómico se obtuvo de leucocitos de sangre venosa periférica utilizando un estuche comercial (Genomic Prep™ blood DNA isolation Kit Amersham Biosciences UK). El tubo de sangre refrigerada o congelada se colocó en un homogenizador Vari-Mix Thermolyne Iowa, USA durante 1 h. A un microtubo Eppendorf de 1.5 mL se agregó 900 µL de RBC solución de lisis (solución de lisis de eritrocitos) y se añadió 300 µL de sangre total homogenizada, se invirtió en varias ocasiones para mezclar. Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 13,000-16,00 x g durante 20 s. Se removió el sobrenadante con micropipeta dejando visible la pastilla de células blancas y de 10-20 µL de líquido residual. Se resuspendieron los leucocitos en el sobrenadante. Se añadió 300 µL de solución de lisis al tubo. Se agregó 1.5 µL de ARNasa A, se mezcló la muestra invirtiendo el tubo varias veces y se incubó a 37 °C por 15 minutos. Se enfrió la muestra a temperatura ambiente. Se adicionó 100 µL de solución de precipitación de proteínas a las células lisadas. Se centrifugó de 13,000 a 16,000 x g tres minutos. Se colocó el sobrenadante que contiene el ADN en un nuevo tubo Eppendorf con 300 µL de isopropanol al 100%. Se mezcló la muestra invirtiendo suavemente varias veces hasta que el ADN formó las hebras visibles. Se centrifugó de 13,000 a 16,000 x g 1 minuto. Se decantó el sobrenadante e invirtió el tubo en papel absorbente limpio para retirar los restos de líquido. Se añadió 300 µL de etanol al 70%. Se invirtió el tubo varias veces para lavar ADN. Se centrifugó de 13,000 a 16,000 x g un minuto. Cuidadosamente se eliminó el etanol. Se drenó el exceso de etanol en papel absorbente limpio. Se dejó secar al aire 15 minutos. Finalmente, se añadió 100 µL de solución de hidratación al ADN de la muestra congelada y 50 µL al ADN de la muestra refrigerada. Se dejó en rehidratación toda la noche o se incubó en baño María durante 1 h. Se almacenó a 2 – 8 °C.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Se diseñaron los oligos de la región polimórfica del intrón 16 del gen de la ECA con secuencias en sentido 5' - CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT – 3' y en el contrasentido 5' - GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT – 3' (26). Se prepararon a la dilución deseada (10 pmol/ μ L) y se guardaron a – 20 °C. Cuando se realizaron las PCRs, se colocó en hielo los dNTPs, la solución de buffer, enhancer, MgSO₄ y oligos. En un tubo Eppendorf se colocó 19.2 μ L de agua tridestilada esterilizada, 1.5 μ L de la mezcla de dNTPs (10 mM), 5 μ L de buffer (10X), 10 μ L de enhancer (10X), 1 μ L de MgSO₄ (50 mM) (estas tres últimas sustancias acompañan al estuche de la enzima), 4 μ L de c/u de los oligos (10 pmol/ μ L), 5 μ L de ADN (~100 ng) y 0.3 μ L (2.5U/ μ L) de la enzima Platinum® Pfx DNA polymerase (Invitrogen).

La amplificación se realizó en un termociclador (Mastercycler Gradient Eppendorf, Germany) y se sometió a las siguientes condiciones: 1 ciclo a 94 °C dos minutos (desnaturalización), 40 ciclos a 94 °C 30 s (desnaturalización), a 55 °C 40 s (alineamiento) y a 72 °C 1 minuto 10 s (extensión); 1 ciclo a 72 °C 10 minutos (extensión final). Los productos de la PCR se visualizaron en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio después de la electroforesis, donde se observó una banda de 490 pb para el genotipo I/I, una banda de 190 pb para el D/D o ambas bandas para el genotipo I/D.

Para incrementar la especificidad de los genotipos D/D, también se realizaron PCRs con un par de oligos flanqueantes específicos para el genotipo de inserción con secuencias en sentido 5' TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC 3' y en el contrasentido 5' TCGCCAGCCCTCCCATGCCCATAA 3' (36) bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo a 94 °C un minuto para desnaturalización, seguido de 30 ciclos de 30 s a 94 °C (desnaturalización), 45 s a 67 °C (alineamiento), y dos minutos a 72 °C (extensión). Los productos de la PCR fueron visualizados en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio después de la electroforesis, donde

se observó una banda de 335 pb que corresponde sólo al alelo I (de inserción) en caso de tener genotipos I/I o I/D, por lo que los D/D no la amplifican (116, 117, 118).

Los dos marcadores utilizados fueron el DNA Ladder Sigma de 1 kb ó el Ready-Load™ de 100 bp DNA Ladder (116).

DETERMINACIÓN DE LA ECA

Se realizó con un estuche de inmunoensayo enzimático de tipo *sándwich* [ELISA ACE Kit de Chemicon Internacional Inc. CA USA]. Esta prueba midió la inmunorreactividad enzimática con el sistema ELISA (Enzyme Linkage ImmunoSorbent Assay) de ECA. Principio de la prueba: anticuerpos monoclonales de ratón generados contra ECA humana cubren la microplaca de 96 pozos y son usados para capturar la ECA presente en la muestra. Anticuerpos policlonales de oveja, ECA-específicos conjugados con peroxidasa de rábano, detectan la captura de la enzima. Después de la adición del sustrato y la solución de “stop”, la cantidad de ECA se determina de la curva estándar, la cual establece una relación directa entre la densidad óptica (absorbancia) y la concentración de la ECA. Esto es, la coloración que se desarrolla, es directamente proporcional a la concentración de la enzima que contiene la muestra (119, 120). Se lee en un lector de Microelisa semiautomático Organon Teknika Stipreader Microelisa System.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se presentan en medias \pm Desviación Estándar (DE). Las diferencias de las medias de los sujetos de estudio presentados por su categoría y por su genotipo se analizan por ANOVA (ANálisis de VArianza) seguido por la prueba de Tukey como Post-Hoc. La asociación de las variables categóricas clínicas, bioquímicas y genéticas se analizan con la prueba de Chi cuadrada; mientras que

la razón de momios se calcula con el modelo de regresión logística múltiple. La variable dependiente fue la categoría del paciente, mientras que las covariables fueron las características químicas y bioquímicas controladas por edad y sexo. Los cálculos fueron realizados en comparación con 230 sujetos tomados de tres estudios previos de la misma línea de investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) sin DM-2, que fue el grupo control. Para calcular el efecto de las variables clínicas y bioquímicas sobre el desarrollo y progresión de la nefropatía diabética se realizó ANCOVA (ANálisis de COVArianza). La correlación de las variables se realizó con el coeficiente de correlación de Pearson. Se consideró de significancia estadística a un valor de $p < 0.05$. Todos los cálculos se realizaron con el paquete estadístico SPSS Ver. 10.0 para Windows, Chicago, Illinois, USA.

DEFINICIÓN OPERACIONAL DE VARIABLES

- DIABETES MELLITUS TIPO 2: se consideró como diabético a todo sujeto diagnosticado clínicamente con glucosa de ayuno ≥ 126 mg/dL o cifras menores si recibían tratamiento con hipoglucemiante (s) oral (es) y/o insulina. Variable nominal. Cifra de glucemia sérica.
- INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA: basados en los criterios de las guías K/DOQI. Variable nominal. 1) TFG ≥ 90 mL/min/1.73 m², 2) TFG de 60-89 mL/min/1.73 m², 3) TFG de 15-59 mL/min/1.73 m², y 4) TFG < 15 mL/min/1.73 m².
- EDAD: años cumplidos al momento del estudio. Variable cuantitativa continua.
- SEXO: hombre, mujer. Variable cualitativa nominal. 1/F, 2/M

- PRESIÓN ARTERIAL: se midió por el investigador con un esfigmomanómetro de columna de mercurio en mm de Hg. Variable cuantitativa continua. Cifra normal sistólica 120 mm de Hg y diastólica 80 mm de Hg.
- PESO CORPORAL: se registró en una báscula de pedestal con estadímetro. Se reportó en kilogramos. Variable cuantitativa continua.
- TALLA: se midió en báscula de pedestal con estadímetro. Se reportó en metros. Variable cuantitativa continua.
- ÍNDICE DE MASA CORPORAL: se calculó con el peso en kilogramos entre la talla en metros al cuadrado. Variable cuantitativa continua. Valor de referencia de 20 a 25 kg/m².
- CIRCUNFERENCIA ABDOMINAL: medida en cm. Variable cuantitativa continua (88 cm en mujeres, 102 cm. en hombres).
- INDICE CINTURA/CADERA: variable cuantitativa continua. Hombres 0.90 m y mujeres 0.85 m.
- GLUCEMIA: se cuantificó en una muestra de sangre venosa con ayuno de cuando menos 8 h en mg/dL. Variable cuantitativa continua (80-110 mg/dL).
- COLESTEROL TOTAL, TRIGLICÉRIDOS, c-HDL, c-LDL: se determinaron en una muestra de sangre venosa con ayuno de cuando menos 8 h en mg/dL. Variable cuantitativa continua (< 200 mg/dL, < 150 mg/dl, > 50 mg/dL, < 100 mg/dL respectivamente).
- CREATININA: se determinó en una muestra de sangre venosa con ayuno de cuando menos 8 h en mg/dL. Variable cuantitativa continua (< 1.5 mg/dL).

- DEPURACIÓN DE CREATININA EN ORINA DE 24 HORAS: se midió en mL/min o por la fórmula de Cockcroft-Gault. Variable cuantitativa continua (100-120 mL/min/1.73m²).
- ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA: Se cuantificó por técnica de ELISA en suero en ng/mL. Variable cuantitativa continua.
- POLIMORFISMO DEL GEN DE LA ECA: presencia o ausencia de un fragmento de 287 pb en el intrón 16 del gen de la ECA. Variable nominal. I/I inserción/inserción, I/D inserción/delección y D/D delección/delección. Se corroboró el genotipo D/D por la ausencia de una banda de inserción de 335 pb exclusiva para I/I o I/D.

RESULTADOS

a) Fueron reclutados un total de 240 pacientes con diagnóstico de DM-2 de los cuales 36 tuvieron una TFG ≥ 90 mL/min/1.73 m²; 76, TFG de 60-89 mL/min/1.73 m²; 78, TFG de 15-59 mL/min/1.73 m² y 50 una TFG < 15 mL/min/1.73 m². La tabla 3 muestra las características clínicas y bioquímicas del grupo de estudio en comparación con el grupo control. Fueron diferentes en todas las variables excepto en edad y sexo. La tabla 4, muestra las variables clínicas y bioquímicas de la población de estudio por grado de nefropatía. En ella se observa que fue homogénea en el sexo, mientras que a mayor edad y tiempo de diagnóstico de la DM-2, se presenta disminución progresiva de la TFG y una pérdida en las medidas antropométricas. Con menor consistencia, se encontró también alteración en las variables bioquímicas, específicamente en el colesterol total, triglicéridos y c-HDL, siendo esta última la más relevante ya que disminuye de manera paralela a como lo hace la TFG a medida que avanza la nefropatía. Sólo el 17% de los pacientes con DM-2 recibió tratamiento con capacidad probada antihipertensiva y nefroprotectora.

Tabla 3. Variables clínicas y bioquímicas de la población estudiada y el grupo control.

Variable	Grupo con DM-2	Grupo control	Valor de <i>p</i>
Sexo (M/F)	100/140	99/131	0.76
Edad (años)	60 ± 12	59 ± 8	0.29
Peso (kg)	73 ± 14	68 ± 10	<0.01
IMC (kg/m ²)	29 ± 5	26 ± 3	<0.01
Presión arterial			
Sistólica (mm de Hg)	140 ± 23	132 ± 18	<0.01
Diastólica (mm de Hg)	85 ± 13	81 ± 9	<0.01
Glucosa (mg/dL)	164 ± 83	84 ± 13	<0.01
Creatinina (mg/dL)	3.0 ± 3.4	0.80 ± 0.11	<0.01
TFG (mL/min/1.73 m ²)	56 ± 39	94 ± 10	<0.01
Colesterol total (mg/dL)	195 ± 58	213 ± 35	<0.01
Triglicéridos (mg/dL)	218 ± 105	134 ± 46	<0.01
c-HDL (mg/dL)	44 ± 20	49 ± 11	<0.01
c-LDL (mg/dL)	108 ± 53	133 ± 27	<0.01

IMC: índice de masa corporal; TFG: tasa de filtración glomerular; c-HDL: lipoproteínas de alta densidad; c-LDL: lipoproteínas de baja densidad.

Tabla 4. Características clínicas y bioquímicas de la población estudiada analizada por grado de nefropatía.

Variable	Tasa de filtración glomerular (mL/min/1.73 m ²)				Valor P	
	≥ 90	60-89	15-59	< 15		
Sexo (M/F)	17/19	28/48	33/45	22/28	100/140	0.72
Edad (Años)	50 ± 12	58 ± 10	64 ± 11	62 ± 10	60 ± 12	< 0.01*
Tiempo de Dx DM (años)	6 ± 5	8 ± 6	13 ± 9	17 ± 8	11 ± 8	< 0.01***
Peso (kg)	85 ± 15	73 ± 13	68 ± 13	71 ± 12	73 ± 14	< 0.01*
C A (cm)	102 ± 11	97 ± 12	94 ± 10	91 ± 6	96 ± 11	< 0.05**
IMC (kg/m ²)	32 ± 6	30 ± 5	28 ± 4	28 ± 4	29 ± 5	< 0.01*
Presión arterial						
Sistólica (mm de Hg)	136 ± 19	142 ± 21	142 ± 25	139 ± 23	140 ± 23	0.59
Diastólica (mm de Hg)	89 ± 12	87 ± 12	84 ± 13	83 ± 16	85 ± 13	0.92
Glucosa (mg/dL)	153 ± 56	150 ± 43	173 ± 98	180 ± 112	164 ± 83	0.99
Creatinina (mg/dL)	0.85 ± 0.19	1.05 ± 0.36	2.17 ± 1.77	8.24 ± 3.70	2.88 ± 3.42	< 0.01***
TFG (mL/min/1.73 m ²)	120 ± 25	74 ± 8	38 ± 14	9 ± 3	56 ± 39	< 0.01***
Colesterol total (mg/dL)	209 ± 37	193 ± 47	206 ± 66	173 ± 65	196 ± 58	< 0.05†
Triglicéridos (mg/dL)	258 ± 115	216 ± 89	219 ± 116	189 ± 94	217 ± 105	< 0.05*
c-HDL (mg/dL)	49 ± 16	51 ± 20	44 ± 20	31 ± 16	44 ± 20	< 0.01***
c-LDL (mg/dL)	108 ± 42	101 ± 38	117 ± 64	107 ± 60	108 ± 53	0.94
ECA (ng/mL)	505 ± 129	615 ± 207	483 ± 172	592 ± 116	553 ± 177	0.23
% de pacientes tratados con antihipertensivos	69/25/3/3/0/0/0/0	58/24/14/4/0/0/0/0	50/18/14/4/9/3/3/0	8/10/18/24/26/6/6/2	47/19/13/8/8/2/2/1	< 0.01***
% de pacientes tratados con IECAs	17	17	14	2	13	< 0.01***

CA: circunferencia abdominal; IMC: índice de masa corporal; TFG: tasa de filtración glomerular; c-HDL: lipoproteínas de alta densidad; c-LDL: lipoproteínas de baja densidad; ECA: enzima convertidora de angiotensina.

* Pacientes con TFG < 15 vs pacientes con TFG ≥ 90; ** TFG < 15 vs TFG ≥ 90 y TFG de 60-89; *** TFG < 15 vs TFG ≥ 90, TFG de 60-89 y TFG de 15-59;

+ TFG < 15 vs TFG ≥ 90 y TFG de 60-89. ANOVA y Tukey como Post-Hoc.

La figura 9 (a, b, c) ilustra imágenes representativas de los polimorfismos identificados en los sujetos de estudio, a: ADN genómico, b: polimorfismo I/D del gen de la ECA y c: banda de 335 pb específica del polimorfismo inserción (I) del gen de la ECA.

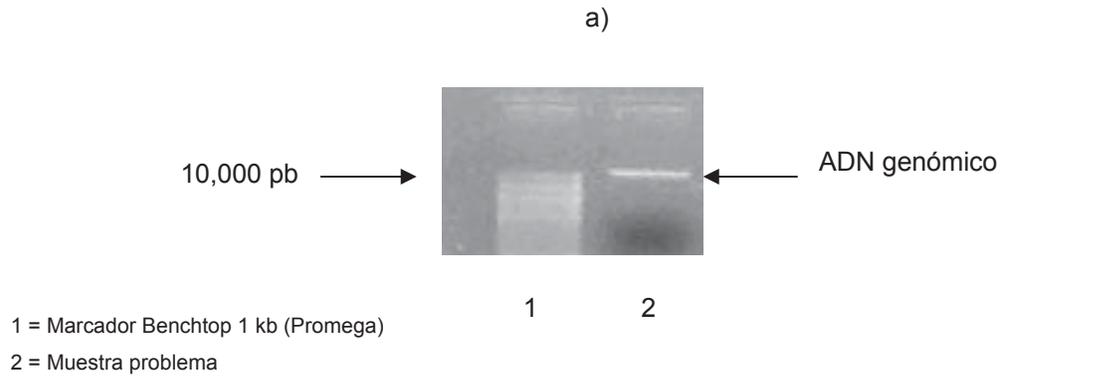


Figura 9 a. Fotografía del gel en donde se demuestra la presencia de ADN genómico aislado de un paciente del grupo de estudio.

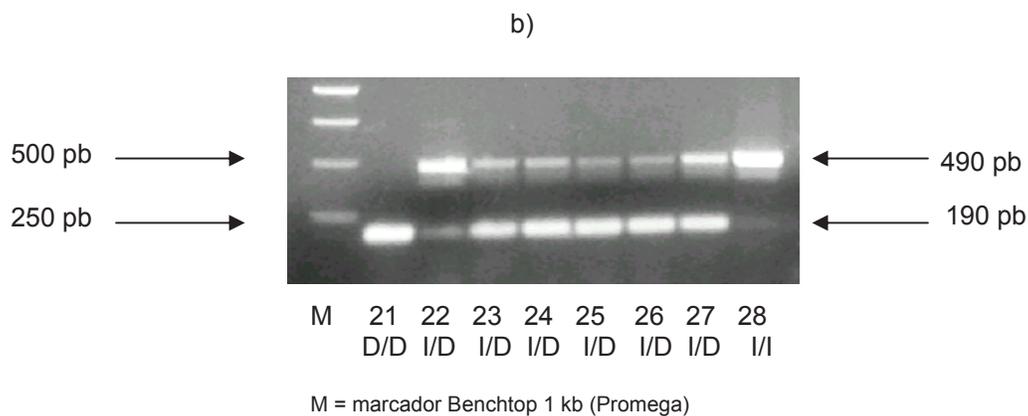


Figura 9 b. Polimorfismo I/D del gen de la ECA. La banda de 490 pb indica inserción (I) y la banda de 190 pb indica delección (D). Los individuos homocigotos están representados por una sola banda de 490 pb para el genotipo I/I y de 190 pb para el genotipo D/D; los heterocigotos, muestran ambas bandas.

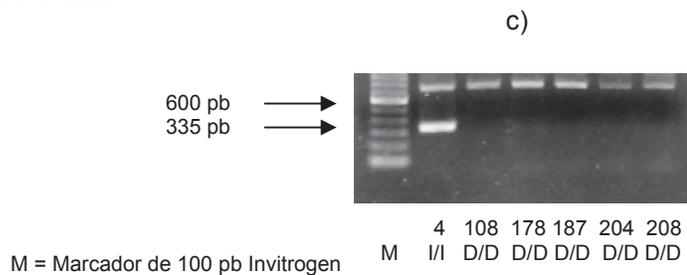


Figura 9 c. Amplificación con los oligos ECA I y ECA II diseñados para mostrar la banda de inserción (I) que amplifica un producto de 335 pb en los sujetos I/I e I/D, pero no en los individuos D/D.

b) De los 230 sujetos controles considerados en este estudio para el análisis univariado, 99 (43%) fueron hombres y 131 (57%) mujeres, con una edad de 59 ± 8 años

La tabla 5 muestra la frecuencia genotípica y alélica del grupo de estudio comparado con el grupo control. La población estuvo en equilibrio Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 1.55$ y 1.40 , $p = 0.90$ respectivamente). El genotipo D/D se asoció como factor de riesgo para el desarrollo de DM-2 en el grupo de estudio ($\chi^2 = 5.64$, $p < 0.01$, RM 1.51, IC 95% 1.06 - 2.14).

Tabla 5. Frecuencia genotípica y alélica del grupo de estudio y grupo control.

Grupos	Genotipos						Alelos	
	I/I	%	I/D	%	D/D	%	I	D
DM-2	49	20	126	53	65	27	0.4666	0.5333
Control	70	30	124	54	36	16	0.5738	0.4262

I/I = Inserción-Inserción, I/D = Inserción-Delección, D/D = Delección-Delección

El genotipo D/D se asoció con el desarrollo de DM-2 en el grupo de estudio ($\chi^2 = 5.64$, $p < 0.01$; RM = 1.51 IC 95% 1.06 – 2.14).

La tabla 6 muestra la frecuencia genotípica y alélica del grupo de estudio por estratificación de la TFG. Los sujetos de estudio estratificados por la TFG conservaron el equilibrio Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 0.15$, $p = 0.90$; $\chi^2 = 1.07$, $p = 0.90$; $\chi^2 = 2.53$, $p = 0.10$; $\chi^2 = 2.89$, $p = 0.10$ respectivamente). La frecuencia observada del alelo D estuvo incrementada en los pacientes con TFG ≥ 90 mL/min/1.73 m², 0.611 y TFG de 60-89 mL/min/1.73 m², 0.559, ($\chi^2 = 7.60$ y $\chi^2 = 9.88$, $p < 0.01$ respectivamente), efecto no ocurrido en los pacientes con TFG ≥ 15 a 59 mL/min/1.73/m² y TFG < 15 mL/min/1.73/m² ($\chi^2 = 0.11$, $p = 0.43$ y $\chi^2 = 0.7$, $p = 0.47$) respectivamente.

Tabla 6. Polimorfismo del gen de la ECA en la población estudiada.

Polimorfismo ECA	Tasa de filtración glomerular (mL/min/1.73 m ²)			
	≥ 90*	60-89**	15-59	< 15
D/D	14	26	15	10
(%)	(39)	(34)	(19)	(20)
I/D	16	33	46	31
(%)	(44)	(44)	(59)	(62)
I/I	6	17	17	9
(%)	(17)	(22)	(22)	(18)
Frecuencia alélica				
I	0.389	0.441	0.513	0.490
D	0.611	0.559	0.487	0.510

Relación entre el polimorfismo D/D vs I/D e I/I/ de la ECA y los estadios de la enfermedad renal crónica, comparado con el grupo control: * $\chi^2 = 7.60$, $p < 0.01$; ** $\chi^2 = 9.88$, $p < 0.01$; TFG 15-59, $\chi^2 = 0.11$, $p = 0.43$; TFG < 15, $\chi^2 = 0.70$, $p = 0.47$.

Igualmente se observó una asociación del genotipo D/D con el desarrollo de DM-2.

La tabla 7, muestra las características clínicas y bioquímicas analizadas por genotipo. En ella sólo hubo diferencia en la TFG siendo menor en el grupo con el genotipo ID en comparación al D/D (TFG 49 ± 37 y 66 ± 38 mL/min/1.73 m², respectivamente, $p < 0.05$) y una diferencia en las concentraciones séricas de la ECA siendo mayores en el grupo de pacientes con genotipo D/D en comparación con el genotipo I/I, I/D.

Tabla 7. Características clínicas y bioquímicas de la población estudiada, analizada por genotipo.

Variable	Genotipo			Total	Valor de p
	I/I	I/D	D/D		
Sexo (M/F)	23/26	49/77	28/37	100/140	0.60
Edad (años)	59 ± 12	60 ± 11	59 ± 13	60 ± 12	0.67
Peso (kg)	72 ± 13	73 ± 14	74 ± 15	73 ± 14	0.63
C A (cm)	96 ± 10	95 ± 10	96 ± 13	96 ± 11	0.85
IMC (kg/m ²)	29 ± 5	29 ± 5	29 ± 4	29 ± 5	0.98
Presión arterial					
Sistólica (mm de Hg)	139 ± 25	139 ± 23	144 ± 21	140 ± 23	0.40
Diastólica (mm de Hg)	87 ± 15	84 ± 13	88 ± 12	85 ± 13	0.06
Glucosa (mg/dL)	169 ± 113	167 ± 80	154 ± 57	164 ± 83	0.54
Creatinina (mg/dL)	2.94 ± 3.53	3.15 ± 3.34	2.29 ± 3.47	2.88 ± 3.42	0.25
TFG (mL/min/1.73 m ²)	58 ± 41	49 ± 37	66 ± 38	56 ± 39	< 0.05*
Colesterol total (mg/dL)	205 ± 43	189 ± 62	200 ± 57	196 ± 58	0.21
Triglicéridos (mg/dL)	248 ± 115	200 ± 94	228 ± 112	218 ± 105	0.18
c-HDL (mg/dL)	49 ± 20	41 ± 19	47 ± 21	44 ± 20	0.19
c-LDL (mg/dL)	109 ± 47	107 ± 59	110 ± 46	108 ± 54	0.95
Tiempo de Dx DM (años)	10 ± 9	12 ± 9	10 ± 8	11 ± 8	0.20
ECA (ng/mL)	474 ± 161	520 ± 113	640 ± 198	553 ± 177	< 0.05**

Las abreviaturas se describen en el pie de la tabla 4. * Pacientes con genotipo DD vs ID; ** Genotipo D/D vs I/I, I/D. ANOVA y Tukey como Post-Hoc.

La tabla 8 muestra el ANCOVA de las variables clínicas y bioquímicas que resultaron estadísticamente significativas en el desarrollo y progresión de la nefropatía diabética. De ellas, las de mayor influencia fueron los años de diagnóstico de la DM-2, edad del paciente, ECA sérica, y las variables relacionadas con evaluación de la obesidad.

Tabla 8. Análisis de covarianza de las variables estudiadas en la población con DM-2.

Covariables	R ²	R ² ajustada	F	P
Años de Dx	0.252	0.242	25.366	< 0.01
Edad (años)	0.156	0.145	14.541	< 0.01
CA (cm)	0.152	0.141	14.098	< 0.01
Peso (kg)	0.149	0.139	13.821	< 0.01
ECA sérica (ng/mL) T	0.127	0.085	3.053	< 0.05
Glucosa (mg/dL)	0.061	0.049	5.144	< 0.05
Dislipidemia	0.039	0.027	3.173	< 0.05
Presión arterial sistólica (mm de Hg)	0.034	0.022	2.809	< 0.05
Presión arterial diastólica (mm de Hg)	0.069	0.057	5.819	< 0.01
Índice cintura/cadera	0.047	0.035	3.884	< 0.05

Las abreviaturas se describen en el pie de la tabla 4.

La tabla 9 muestra el análisis multivariado que incluyó la hipertensión arterial, la obesidad, la dislipidemia y las toxicomanías, además de la relación con las diferentes categorías de la TFG comparando el genotipo D/D vs I/D e I/I del grupo de estudio y el grupo control. La hipertensión arterial, la obesidad y la dislipidemia, se asociaron con mayor consistencia en las tres primeras categorías.

Tabla 9. Modelo de regresión logística que incluye, hipertensión arterial, obesidad, dislipidemia, tabaquismo y alcoholismo como factores de riesgo para el desarrollo de nefropatía diabética.

Variable	TFG ≥ 90		TFG 60-89		TFG 15-59		TFG < 15	
	RM	IC 95%	RM	IC 95%	RM	IC 95%	RM	IC 95%
Hipertensión arterial	1.55	0.69 – 1.91	1.68	1.11 – 2.55	1.57	0.97 – 2.53	1.24	0.72 – 2.07
Valor de <i>p</i>	0.35		< 0.05		0.05		0.28	
Obesidad	1.61	1.00 – 2.60	1.51	0.99 – 2.29	1.16	0.71 – 1.89	1.47	0.88 – 2.43
Valor de <i>p</i>	< 0.05		< 0.05		0.33		0.09	
Dislipidemia	2.34	1.47 – 3.73	1.60	0.99 – 2.59	1.63	0.95 – 2.79	1.53	0.79 – 2.99
Valor de <i>p</i>	< 0.01		0.05		0.07		0.17	
Tabaquismo	0.93	0.39 – 2.19	1.31	0.74 – 2.32	0.64	0.20 – 2.01	0.77	0.19 – 3.06
Valor de <i>p</i>	0.59		0.26		0.33		0.53	
Alcoholismo	2.5	1.54 – 4.04	1.51	0.80 – 2.84	0.92	0.30 – 2.79	0.60	0.15 – 1.44
Valor de <i>p</i>	< 0.05		0.22		0.60		0.37	

TFG = Tasa de filtración glomerular (mL/min/1.73 m²).
 El análisis de regresión logística múltiple, se realizó comparando el genotipo D/D vs I/D, I/I del grupo de estudio vs grupo control.

La figura 10 (a y b), muestra la fotografía de la microplaca de ELISA para estimar las concentraciones de ECA.



Figura 10 a y b. Microplacas de ELISA utilizadas para determinar la concentración sérica de la ECA. a) = sin “stop”, b) = con “stop”. La diferencia en la intensidad del color permite conocer la concentración de la enzima en ng/mL. La lectura se realizó a una densidad óptica (DO) con un filtro de 450 nm. El pozo que sirve como blanco tiene 0 ng/mL de ECA.

La figura 11, muestra las concentraciones de la ECA en la población con el genotipo D/D, I/D e I/I. En ella se observa que la población con el genotipo D/D, tiene concentraciones séricas mayores de la enzima (640 ± 198 vs 520 ± 113 y 474 ± 161 ng/ml, $p < 0.05$).

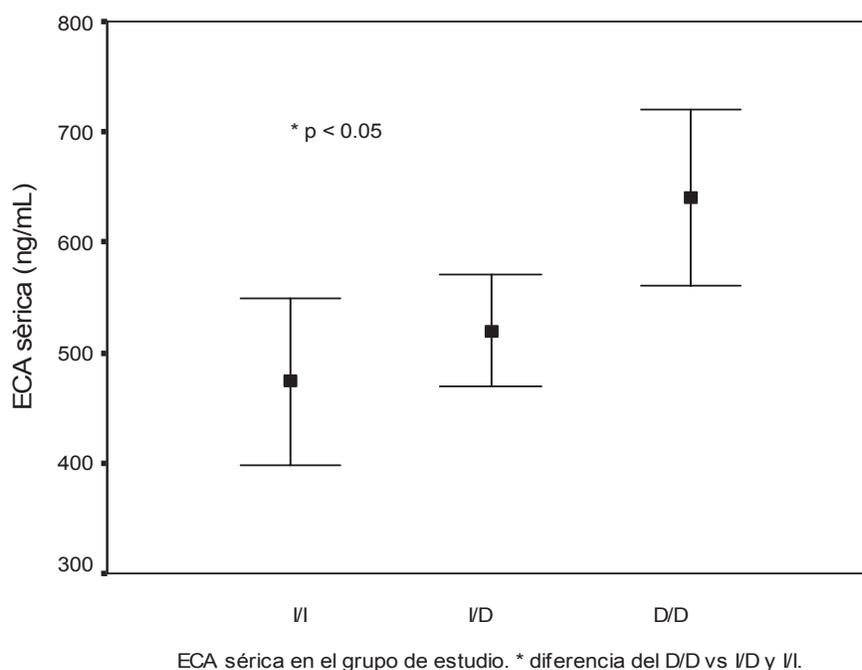


Figura 11. Concentraciones séricas de la ECA. El genotipo D/D posee las cifras más altas: 640 ± 198 y el genotipo I/I, las más bajas: 474 ± 161 en el genotipo I/I ($*p < 0.05$).

En la tabla 10 consideramos el análisis multivariado que incluyó los años de diagnóstico de la DM-2, la edad del sujeto, la obesidad, los niveles séricos de glucosa, la dislipidemia, la hipertensión arterial y la ECA como factores de riesgo para el desarrollo de nefropatía diabética del grupo de estudio con una TFG ≥ 90 , en comparación con el resto de las otras categorías. De igual manera se observó, que los años de diagnóstico de la DM-2, edad del paciente y obesidad, se asociaron de manera directa para el desarrollo y progresión del daño renal.

Finalmente, en la tabla 11, encontramos las principales correlaciones de las variables estudiadas. Hubo una correlación negativa de la edad con la caída de la TFG ($r = - 0.347$, $p < 0.0001$); una correlación positiva de los años de diagnóstico de la DM-2 con la creatinina sérica ($r = 0.349$, $p < 0.0001$); con la ECA ($r = 0.319$, $p = 0.009$) y negativa con la TFG ($r = - 0.464$, $p < 0.0001$); una correlación positiva de la glucosa sérica con los triglicéridos ($r = 0.239$, $p < 0.0001$) y negativa con la TFG ($r = - 0.167$, $p = 0.009$); una correlación negativa de la creatinina sérica con las c-HDL ($r = - 0.374$, $p < 0.0001$) y la TFG ($r = - 0.652$, $p < 0.0001$) y una correlación positiva del genotipo I/D del gen de la ECA con los triglicéridos ($r = 0.133$, $p < 0.05$), c-HDL ($r = 0.127$, $p < 0.05$) y la TFG ($r = 0.189$, $p = 0.003$).

Tabla 10. Modelo de regresión logística múltiple que incluye años de diagnóstico de la DM-2, edad, obesidad, glucosa sérica, dislipidemia, hipertensión arterial y ECA como factores de riesgo para el desarrollo de nefropatía diabética.

Variable	TFG ≥ 90		TFG 60-89		TFG 15-59		TFG < 15	
	RM	IC 95%	RM	IC 95%	RM	IC 95%	RM	IC 95%
Años de dx DM-2	1		1.04	0.97 – 1.12	1.19	1.06 – 1.33	1.19	1.09 – 1.29
Valor de <i>p</i>			0.24		< 0.01		< 0.01	
Edad	1		1.11	1.05 – 1.16	1.19	1.10 – 1.29	1.07	1.02 – 1.12
Valor de <i>p</i>			< 0.01		< 0.01		< 0.01	
Obesidad	1		0.91	0.87 – 0.96	0.71	0.60 – 0.84	0.89	0.83 – 0.94
Valor de <i>p</i>			< 0.01		< 0.01		< 0.01	
Glucosa sérica	1		0.99	0.98 – 1.00	0.99	0.98 – 1.00	0.99	0.97 – 1.01
Valor de <i>p</i>			0.45		0.23		0.87	
Dislipidemia	1		3.17	1.33 – 7.57	3.4	0.98 – 11.73	1.49	0.11 – 19.8
Valor de <i>p</i>			< 0.01		0.05		0.76	
Hipertensión arterial	1		0.84	0.27 – 2.59	1.06	0.62 – 4.43	0.41	0.10 – 1.57
Valor de <i>p</i>			0.77		0.30		0.19	
ECA	1		1.00	0.99 – 1.00	0.99	0.99 – 1.00	1.00	0.99 – 1.00
Valor de <i>p</i>			0.95		0.72		0.91	

TFG = Tasa de filtración glomerular (mL/min/1.73 m²).

La comparación se hizo del grupo con TFG ≥ 90 (grupo de referencia). La razón de momios expresa el riesgo de los pacientes con TFG 60-89, TFG 15-59, TFG < 15 vs el grupo de referencia

Tabla 11. Principales correlaciones de las variables clínicas y bioquímicas estudiadas.

Variable	Edad	TFG	Años dx DM-2	Creatinina	Glucosa	Colesterol total	Triglicéridos	c-HDL	ECA	Genotipo
Edad	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TFG	-.347*	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Años dx DM-2	.243*	-.464*	1	-	-	-	-	-	-	-
Creatinina	.010	-.652*	.349*	1	-	-	-	-	-	-
Glucosa	-.095	-.167**	.096	.177**	1	-	-	-	-	-
Colesterol total	-.115	.124	-.025	-.230*	.083	1	-	-	-	-
Triglicéridos	-.118	.103	-.025	-.091	.239**	.366*	1	-	-	-
c-HDL	-.085	.317*	-.161**	-.374*	.046	.182**	.037	1	-	-
ECA	.209	-.046	.319*	.080	.046	.123	-.046	.161	1	-
Genotipo	-.054	.189**	-.102	-.104	-.059	.091	.133**	.127**	.301*	1

Las abreviaturas se describen en el pie de la tabla 4.

DISCUSIÓN

Como la mayoría de los órganos en el cuerpo humano, el riñón está propenso a una pérdida gradual de su función al paso de los años. Este fenómeno fisiológico ha sido demostrado con la caída gradual de la tasa de filtración glomerular conforme aumenta la edad. Afortunadamente, esta pequeña disminución en la función renal, no tiene significado clínico. Sin embargo, en pacientes con enfermedades con afección renal como la DM-2, la tasa de pérdida de la función renal puede estar aumentada en forma significativa, aún si el trastorno primario o la enfermedad subyacente ha sido controlada. Esto da por resultado diversos trastornos metabólicos y eventualmente, para muchos pacientes, insuficiencia renal en etapa terminal. Lo anterior muestra una gran variabilidad interindividual entre los sujetos, aún si ellos tienen enfermedades similares subyacentes lo que sugiere que la progresión de la pérdida de la función renal parece ser totalmente independiente del tipo de enfermedad renal de base, y que otros factores están involucrados. Así, la IRC tiene un incremento paulatino atribuido a factores clínicos, metabólicos, ambientales y genéticos (8).

El sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRA) desempeña un papel clave en la fisiopatología cardiovascular y renal (70). La Ang II, el producto más importante biológicamente activo de este sistema, es sintetizada en una vía que involucra varios péptidos precursores y enzimas, algunos de ellos regulados por genes independientes. La principal acción conocida de la Ang II (mediada a través de su receptor AT_1) es la estimulación del músculo liso vascular produciendo una importante vasoconstricción, así como favorecer la retención de sodio y agua actuando directamente en las células tubulares a través de la secreción de aldosterona de la corteza adrenal. Sin embargo, recientemente se le han atribuido otras acciones. Varios estudios han revelado que la Ang II promueve *in vitro* el crecimiento del músculo liso vascular, del mesangio glomerular y de la célula tubular renal debido a la síntesis de citocinas y factores de crecimiento, incluyendo el TGF- β , el cual está involucrado en la génesis de la fibrosis glomerular y

tubulointerstitial. Interfiere en el proceso fibrinolítico por estimulación del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) (70, 100). La Ang II parece también estar involucrada en la acumulación de colágena tanto por activación de su síntesis, como por la inhibición de su degradación (101). Por lo tanto, queda claro que el polimorfismo del SRA ha ganado interés en la búsqueda de factores genéticos que puedan influenciar la progresión de la insuficiencia renal y la respuesta al tratamiento de regímenes nefroprotectores (121).

El presente estudio hizo evidente que la edad del sujeto, los años de diagnóstico de la enfermedad y las variables que definen obesidad, tienen influencia en la caída de la TFG en la población con DM-2; con menor consistencia los niveles séricos de lípidos, también tienen inferencia. Destacan los valores elevados en los triglicéridos y c-LDL y una disminución de las c-HDL. Esta última disminuye paralelamente a la pérdida de la función renal. Los resultados anteriores colocan a esta población con un riesgo alto para enfermedad cardiovascular (ECV) ya que según los criterios del Adult Treatment Panel III (ATP III) guidelines developed by de National Cholesterol Education Program (122, 123) sujetos con un riesgo alto para ECV como los del presente estudio, los niveles de triglicéridos deben estar a concentraciones < 150 mg/dL, las c-LDL < 100 mg/dL, y las c-HDL de > 50 mg/dL. Todas estas variables además de tener un componente ambiental, también tienen un componente genético (63) sin lograr precisar, cuáles de estos mecanismos (ambiental o genético) tienen un impacto mayor. Una limitante de este estudio fue el no haber determinado la composición corporal y poder asegurar si la pérdida de peso corporal observada en la población con DM-2 y el detrimento de la función renal fue a expensas de tejido graso o de masa magra; sin embargo, se conoce que el sujeto con insuficiencia renal crónica en su inicio tiene pérdida de peso a expensas esencialmente de masa magra y al final también se ve involucrado el tejido graso (fase catabólica) lo cual lo lleva a un estado de desnutrición, inflamación crónica y enfermedad cardiovascular integrando el síndrome *MIA* (Malnutrition, Inflammation and Atherosclerosis) (124). Estos efectos son mediados en parte por la Ang II.

En 1990 el grupo de Rigat *et al.* publicaron un reporte que fue un impulso para posteriores estudios en polimorfismos de genes del SRA. Ellos encontraron un polimorfismo que involucraba la presencia (inserción) o ausencia (delección) de una secuencia de 287 pb en el intrón 16 del gen que codifica para la ECA (25).

Tales polimorfismos se conocen ahora que existen para la mayoría si no es que para todos los genes humanos. El ejemplo mejor conocido es el del sistema ABO y RH sanguíneos. Existen dos diferentes clases de polimorfismos. Primero, los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP por sus siglas en inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) debidos a la presencia o ausencia de ciertas secuencias de nucleótidos reconocidos por las enzimas de restricción en la secuencia en el ADN que da por resultado fragmentos de ADN de diferente longitud. Segundo, el polimorfismo en el número de repeticiones en tándem (VNTR por sus siglas en inglés *Variable Number of Tandem Repeats*), ya sean cortos (SINE) o largos (LINE), pueden estar repetidos varios cientos de veces en el genoma. Existen también los polimorfismos de un sólo nucleótido o SNP (*single nucleotide polymorphism*) que actualmente son motivo de una amplia investigación. De esta manera, se piensa que la compleja interacción entre múltiples factores ambientales y polimorfismos pueden dar por resultado una mayor susceptibilidad a padecer ciertas enfermedades comunes o modificar su curso. Tal es el caso de la hipertensión arterial sistémica, la diabetes mellitus, la osteoporosis y la enfermedad de Alzheimer, entre otras (22).

En nuestro estudio, aproximadamente el 80 % de los pacientes, a pesar de las medidas farmacológicas y no-farmacológicas, cursaron con hiperglucemia. Se conoce que la hiperglucemia causa de manera crónica vasodilatación capilar general (29) y vasoconstricción posglomerular que lleva a un aumento en la presión intraglomerular (64,) efectos también mediados por Ang II. Los presentes datos son consistentes con la hipótesis donde los niveles constitutivos de Ang II pueden afectar el desarrollo de glomeruloesclerosis del diabético. Sujetos con el

genotipo I/I tuvieron niveles séricos menores de ECA mientras que los niveles mayores fueron encontrados en sujetos con el genotipo D/D. Estos resultados son similares con lo reportado en la literatura (25). Su significancia clínica se desconoce. Mientras el SRA es de indudable importancia en la regulación de la presión arterial y el equilibrio hidroelectrolítico, existe también un sistema local, principalmente en riñón, regulado independientemente que interviene en el crecimiento celular y en la modulación de la musculatura lisa vascular (2, 97, 100). En la DM-2, en particular, el SRA local y general, pueden ser discordantes. Los hallazgos de la expansión de volumen y reducción de la actividad de renina plasmática en la diabetes, han sido interpretados como que el SRA se encuentra abatido (64) en el paciente con DM-2; en tanto que el SRA tisular esencialmente el renal y vascular, se encuentra con una actividad incrementada (70), siendo una de las hipótesis que sustentan la afección de órganos blanco en la DM-2 como son el riñón, corazón, retina y cerebro. Lo anterior igualmente ha apoyado el uso de medicamentos con comprobada actividad nefroprotectora y cardioprotectora como son los inhibidores de la ECA (IECAs), los antagonistas de los receptores AT₁ de la Ang II (ARAs) solos o en combinación (17, 30, 31, 55, 81). Esto toma importancia ya que en nuestro estudio sólo un porcentaje muy bajo de sujetos con DM-2 tenían indicado estos medicamentos (17% de IECAs y 2% de ARAs).

También encontramos que los sujetos con el genotipo D/D, tenían una TFG mayor en comparación a los individuos con el genotipo I/D, lo cual es discordante con estudios previos que reportan una TFG menor en sujetos con nefropatía. Una explicación a este hallazgo, es que en este estudio los pacientes con el genotipo D/D tuvieron una TFG en parámetros considerados como riñones hiperfiltrantes según la clasificación de Mogensen (62) previos al desarrollo de microalbuminuria lo cual es indicativo de un estadio ya establecido de enfermedad renal en el paciente diabético.

El posible papel de los factores genéticos en el desarrollo y progresión de la nefropatía diabética podría ser probado usando los sujetos del presente estudio

como una cohorte. En éste, el polimorfismo del gen de la ECA fue el primero en ser probado en pacientes con DM-2. Tomando la razón de momios ajustada por sexo y edad como un estimador de riesgo relativo (RM = 1.51, IC 95% 1.06 – 2.14, y RM 2.07, IC 95% 1.28 – 3.34) para el grupo de sujetos con una TFG \geq 90 y entre 60 - 89 mL/min respectivamente. Se encontró un riesgo aumentado de desarrollo de nefropatía diabética cuando fue comparado con el grupo control. Sin embargo, el riesgo relativo se pierde en los grupos con una TFG < de 60 mL/min. Lo anterior no está de acuerdo con lo reportado por Marre *et al.* (30, 31) quienes encuentran que los sujetos con DM-2 con el genotipo D/D tienen un mayor riesgo de desarrollar nefropatía diabética. Una posible explicación a lo anterior, puede ser por diferencias raciales; sin embargo, no se puede asegurar porque desde nuestro conocimiento, este es el primer estudio que trata de asociar el polimorfismo del gen de la ECA con el desarrollo y progresión de la nefropatía diabética en población mexicana. Una explicación más viable, es que en el estudio de Marre *et al.*, utilizaron población con diabetes y daño renal homogénea en años de diagnóstico de la enfermedad y edad. Esto no pudo ser controlado en nuestro estudio ya que en un porcentaje alto (20%) de los sujetos con nefropatía terminal, el diagnóstico de la misma y de la DM-2 se hicieron en forma tardía, y “supuestamente” tenían menos de 10 años de iniciada la enfermedad, pero ya con insuficiencia renal en etapa terminal lo que sugiere una falta de diagnóstico oportuno, dado que la historia natural de la enfermedad relaciona que la pérdida de la función renal en el paciente diabético se hace manifiesta después de una evolución de más de 15 años (8, 17, 29). Otra explicación, es el efecto que tienen los componentes clínicos, ambientales y metabólicos sobre la nefropatía diabética donde inciden de manera importante los años de diagnóstico de la DM-2, la edad del sujeto, la obesidad y con menor influencia, la dislipidemia. En este estudio, estas variables se asociaron como factores de riesgo para el desarrollo y progresión de la nefropatía diabética. Lo anterior fue probado por los métodos estadísticos que fortalecen esta relación. Así, obtuvimos que el análisis univariado ($\chi^2 = 7.60$ y $\chi^2 = 9.88$ para pacientes con TFG \geq 90 y entre 60 – 89 mL/min, $p < 0.01$ respectivamente) hizo evidente la asociación del genotipo D/D con dos de los

diferentes estadios de la nefropatía diabética estratificada según las guías K/DOQI (115). Con el ANCOVA, que de manera individual indica la influencia que tiene cada una de las variables estudiadas sobre el desarrollo y progresión de la nefropatía diabética, la regresión logística múltiple y correlación de Pearson hicieron evidente que los años de diagnóstico de la DM-2, la edad del paciente, la obesidad y la dislipidemia son factores de riesgo independientes para el desarrollo y progresión de la nefropatía diabética cuando se comparan los pacientes con el genotipo D/D vs I/I e I/D, así como en los diferentes estadios de la enfermedad de las guías K/DOQI. En este estudio, no encontramos una relación del tabaquismo y alcoholismo con el desarrollo de la nefropatía diabética.

Como mencionamos anteriormente, de los determinantes genéticos del SRA el polimorfismo del gen de la ECA, fue el primer candidato a ser probado (25, 26, 28, 127). Sin embargo, sólo de este sistema, existen más polimorfismos como el del angiotensinógeno (37, 70, 78, 128), receptor AT₁ de Ang II (37, 70, 82), receptor a renina (70), bradicinina (11, 125, 126) y aldosterona (2, 79, 129) que pueden tener influencia en el desarrollo de la nefropatía diabética. En la literatura, se han documentado más de 30 genes que se pueden asociar con la pérdida de la función renal en el paciente con DM-2 (8, 70). Esta área de la genética y de la biología molecular representa un amplio campo para la investigación (130).

Otra limitante del presente estudio fue el no haber determinado la actividad de la ECA sérica y no haber homogenizado la población en edad y años de diagnóstico de la diabetes; variables que en próximos estudios deben ser controladas.

Una ventaja de haber empleado un grupo sin patología (sin DM-2) que afecte la función renal (grupo control) fue el poder encontrar si existe asociación del polimorfismo I/D del gen de la ECA con la DM-2 en población mexicana, como ya ha sido reportado en la literatura (3, 18, 20, 24, 26, 29, 70, 76). En el presente estudio sí observamos una asociación del genotipo D/D con el desarrollo de DM-2 ($\chi^2 = 5.64$, $p < 0.01$, RM 1.51, IC 95% 1.06 - 2.14).

CONCLUSIONES

Este estudio, hizo evidente una asociación del polimorfismo D/D del gen de la ECA con el desarrollo de DM-2. Además hubo una tendencia en la asociación con el desarrollo y progresión de la nefropatía diabética, mientras que consistentemente la edad del sujeto, los años de diagnóstico de la diabetes y las variables que definen obesidad, se asociaron como factores de riesgo independientes para el desarrollo de DM-2 y sus complicaciones. Se requiere confirmar el efecto de este polimorfismo en esta población mediante un estudio de cohorte o a través de un estudio poblacional.

De igual manera, es necesario en este grupo de estudio, evaluar otros polimorfismos del sistema renina-angiotensina, del sistema cinina-kallicreína y de otros genes candidatos para el desarrollo de nefropatía diabética.

También hizo evidente una falta de diagnóstico oportuno de la DM-2 y sus complicaciones por lo que se debe alertar al clínico para que se realice un diagnóstico temprano y tratamiento oportuno, así como la administración de fármacos con efecto nefroprotector comprobado en estadios tempranos de la enfermedad o en población con factores de riesgo para que las complicaciones crónicas, en especial la nefropatía por DM-2, se evite o se retarde.

RECOMENDACIONES

Existe la necesidad de realizar más estudios básicos que investiguen las repercusiones fisiopatológicas del polimorfismo I/D del gen de la ECA. Sólo entonces podremos comprender el impacto de éste en el inicio y el curso de la enfermedad renal y de ser posible, desarrollar estrategias de tratamiento específicas adaptadas a ciertos riesgos del perfil genético.

Es importante comprender a fondo las interacciones gen-ambiente ya que éstas inciden de manera importante en el desarrollo y curso de la nefropatía en los pacientes con DM-2 interviniendo de manera oportuna, evitando así, los altos costos a los que conduce esta complicación crónica de la enfermedad.

RECOCIMIENTOS

Este trabajo recibió financiamiento del Fondo de Fomento a la Investigación (FOFOI) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), así como de la División de estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” y del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Así mismo, recibió apoyo del Laboratorio de Análisis Clínicos Servimed de la ciudad de Morelia, Mich. México.

BIBLIOGRAFIA

1. Quibrera R, Fanghänel G, Robles C, Sánchez-Reyes L, Nazariega R. PAC Endocrino-1. Programa de actualización continua en Endocrinología. Editorial Intersistemas S. A. de C. V. México D. F. 2001.
2. Powers AC. Diabetes mellitus. En: Harrison: Principios de medicina interna. Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Stephen LH, Longo DL, Jameson JL editores. 15ª edición. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España. 2001; pp.2467-2500.
3. Foster D. Diabetes mellitus. En: Harrison: Principios de medicina interna. Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL, editores. 13ª edición. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España. 1994; pp.2281-2305.
4. Jackson EK. Renin and angiotensin. En: Goodman & Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. Hardmann JG, Limbird LE editors. 10th edition. McGraw-Hill. USA. 2001; pp.809-841.
5. DeFronzo RA. Current therapy of diabetes mellitus-Year Book. Editorial Mosby. USA. 1998.
6. Bajaj M and DeFronzo RA. Metabolic and molecular basis of insulin resistance. J Nucl Cardiol 2003;10:311-323.
7. Kumate-Rodríguez J, Wachter-Rodarte NH, Cruz-López M. La diabetes tipo 2 en México: estudio de una cohorte de lo clínico a lo molecular. Las múltiples facetas de la investigación en salud. Proyectos estratégicos del IMSS. Editorial Sestante, S. A. de C. V. México, D. F. 2001;pp.187-200.
8. Cruz M, Montoya C, Gutiérrez M, Wachter NH, Kumate J. Polimorfismo de genes relacionados con diabetes tipo 2. Rev Med IMSS 2002;40:113-125.
9. Davis SN and Granner DK. Insulin, oral hypoglycemic agents, and the pharmacology of the endocrine pancreas. En: Goodman & Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. 10th edition. Hardmann JG, Limbird LE editors. McGraw-Hill. USA. 2001;pp.1679-1714.

10. Caramori ML, Fioretto P and Mauer M. The need for early predictors of diabetic nephropathy risk. *Diabetes* 2000;49:204-216.
11. Caramori ML and Mauer M. Diabetes and nephropathy. *Current Opinion in Nephrology and Hipertension* 2003;12:2773-282.
12. Norma Oficial Mexicana. NOM-015-SSA2-1994. para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus en la atención primaria publicada el 7 de abril del 2000 en el Diario Oficial de la Federación.
13. Aguilar MC y Rodríguez-Romero A. Generalidades sobre nefropatía diabética. *Revisiones Bibliográficas para el Médico General. Facultad de Medicina UNAM.* 2004;9:44-46.
14. Nelson RG, Bennett PH, Beck GJ, Tan M, Knowler WC, Mitch WE, Hirschman GH, Myers BD. Development and progression of renal disease in Pima Indians with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1996;335:1636-1642.
15. American Diabetes Association. *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.* *Diabetes Care* 2005;28:S37-S42.
16. Marre M, Hadjadj S and Bouhanick B. Hereditary factors in the development of diabetic renal disease. *Diabetes & Metabolism* 2000;26:30-36.
17. Sounders CS. Avances en la nefropatía diabética: ¿Cómo retardar su evolución? *Atención Médica* 2002;pp.24-33.
18. Amato D, Alvarez-Aguilar C, Castañeda-Limones R, Rodriguez E, Avila-Diaz M, Arreola F, Gomez A, Ballesteros H, Becerril R, and Paniagua R. Prevalence of chronic kidney disease in an urban Mexican population. *Kidney Int (Suppl 97)* 2005;68:S11-S17.
19. Necochea JC, Escalante B, Navarro J. PAC Cardio-1. Programa de actualización continua para el cardiólogo. Editorial Intersistemas S. A. de C. V. México, D. F. 1998;pp.7-56.
20. Garduño-Espinosa J, Galindo-Mendoza G, Rangel-Frausto S y Muñoz-Hernández O. Mejora en la calidad de atención médica a pacientes con diabetes mellitus tipo 2 por medio de la retroalimentación del desempeño médico y alertas en el expediente clínico. *Las múltiples facetas de la*

- investigación en Salud. Proyectos estratégicos del IMSS. Editorial Sestante, S. A. de C. V. México, D. F. 2001;pp.293-310.
21. Convocatoria Salud-Conacyt. Demandas específicas del Sector. Diabetes mellitus 2004;pp.1-3.
 22. Luque J y Herráez A. Locus y alelo. Genotipo, fenotipo y dominancia. Organización del genoma eucariótico. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Procesamiento postranscripcional. Diversidad del genoma: Polimorfismos. En: Biología molecular e ingeniería genética. Editorial Harcourt. Madrid, España. 2001;pp. 94-95,107-116, 187-196, 275-288, 365-377.
 23. Lewin B. Genes are DNA. The interrupted gene. The content of the genome. Clusters and repeats. Transposons. Retroviruses and retrotransposons. Activating transcription. RNA splicing and processing. En: Genes VIII. 8ª edición. Pearson Prentice Hall. NJ USA. 2004;pp.1-31, 33-50, 51-83, 67-83, 85-112, 467-492, 493-511, 631-655, 697-729.
 24. Housman D. Molecular medicine human DNA polymorphism. N Engl J Med 1995;332:318-320.
 25. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An Insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. J Clin Invest 1990;86:1343-1346.
 26. Rigat BC, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCPI) dipeptidyl-carboxy peptidase. Nucleic Acids Res 1992; 20:1433.
 27. Mayer G. Ace genotype and ACE inhibitor response in kidney disease: A perspective. Am J Kidney Dis 2002;40:272-287.
 28. Sung-Kyu H, Seung YL, Hong SP, Jae HS, Seung JK, Do HK, Kyung RK, Ho YL and Dae SH. ACE DD genotype is more susceptible than ACE II and ID genotypes to the antiproteinuric effect of ACE inhibitors in patients with

- proteinuric non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:1617-1623.
29. Marre M, Bernadet P, Gallois Y, Savagner F, Guyene TT, Hallab M, Cambien F, Passa P and Alhenc-Gelas F. Relationships between angiotensin I converting enzyme gene polymorphism, plasma levels, and diabetic retinal and renal complications. *Diabetes* 1994;43:384-388.
30. Marre M, Jeunemaitre X, Gallois Y, Rodier M, Chatellier G, Sert C, Dusseller L, Kahal Z, Chaillous L, Halimi S, Muller A, Sackman H, Bauduceau B, Bled F, Passa P and Alhenc-Gelas F. Contribution of genetic polymorphism in the renin-angiotensin system to the development of renal complications in insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 1997;99:1585-1595.
31. Marre M, Lievre M, Catellier G, Mann JFE, Passa P, Ménar J. and DIABHYCAR Study Investigators. Effects of low dose ramipril on cardiovascular and renal outcomes in patients with type 2 diabetes and raised excretion of urinary albumin : randomised, double blind, placebo controlled trial (the DIABHYCAR study). *BMJ* 2004;328:495-504.
32. Marre M, Puig JG, Kokot F, Fernandez M, Jermendy G, Opie L, Moyseev V, Scheen A, Ionescu-Tirgoviste C, Saldanha MH, Halabe A, Williams B, Mion D Jr, Ruiz M, Hermansen K, Tuomilehto J, Finizola B, Gallois Y, Amouyel p, Ollivier JP, Asmar R. Equivalence of indapamide SR and enalapril on microalbuminuria reduction in hypertensive patients with type 2 diabetes: The NESTOR* study. *J Hypertens* 2004;22:1613-1622.
33. Hadjadj S, Gallois Y, Alhenc-Gelas F, Chatellier G and Marre M. Angiotensin-I-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and high urinary albumin concentration in French Type 2 diabetes patients. *Diabetic Medicine* 2003;20:677-682.
34. Tiret L, Rigat B, Visvikis S, Breda C, Corvol P, Cambien F, Soubrier F. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet* 1992;51:197-205.

35. Gohda T, Makita Y, Shike T, Kobayashi M, Funabiki K, Haneda M, Kikkawa R, Watanabe T, Baba T, Yoshida H and Tomino Y. Association of the DD genotype and development of Japanese type 2 diabetic nephropathy. *Clinical Nephrology* 2001;6:475-480.
36. Hashimoto Y, Futamura A, Nakarai H, Yokota H, Omura M, Tsukamoto K, Togo M, Sato H, Hara M, Isoo N, Taguchi J and Nakahara K. Association between Deletion Polymorphism of Angiotensin Converting Enzyme Gene and Proteinuria in Japanese Overweight Men. *J Occup Health* 2001;43:80-84.
37. Kuramoto N, Iizuka T, Ito H, Yagui K, Omura M, Nozaki O, Nishikawa T, Tsuchida H, Makino H, Saito Y, Kanatsuka A. Effect of ACE gene on diabetic nephropathy in NIDDM patients with insulin resistance. *Am J Kidney Dis* 1999;33:276-81.
38. Cheung B. Blockade of the renin-angiotensin system. *Hong Kong Medical J* 2002;8:185-191.
39. Kunz R, Bork JP, Fritsche L, Ringer J, Sharma AM. Association between the angiotensin-converting enzyme-insertion/deletion polymorphism and diabetic nephropathy: a methodologic appraisal and systematic review. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:1653-1663.
40. Viswanathan V, Zhu Y, Bala K, Dunn S, Snehalatha Ch, Ramachandran A, Jayaraman M, Sharma K. Association between ACE Gene Polymorphism and Diabetic Nephropathy in South Indian Patients. *J Pancreas* 2001;2:83-87.
41. Ergen AH, Hatemi H, Agachan B, Camlica H and Isbir T. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in Turkish type 2 diabetic patients. *Exp Mol Med* 2004;36:345-350.
42. Agachan B, Isbir T, Yilmaz H and Akoglu E. Angiotensin converting enzyme I/D, angiotensinogen T174M-M235T and angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphisms in Turkish hypertensive patients. *Exp Mol Med* 2003;35:545-549.

43. Krakoff J, Lindsay RS, Looker HC, Nelson RG, Hanson RL, Knowler WC. Incidence of retinopathy and nephropathy in youth-onset compared with adult-onset type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2003;26(1): 76-81.
44. Costa LA, Canani LH, Maia AL and Gross JL. The ACE insertion/Deletion Polymorphism Is Not Associates UIT the Metabolic Síndrome (WHO Definition) in Brazilian Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes Care* 2002;25:2365-2366.
45. Castellano M., Glorioso N, Cusi D, Sarzani R. Fabris B, Opocher G, Zoccali C, Golin R, Veglio F, Volpe M, Maneto F, Fallo F, Rossi JP, Barlassina C, Tizzoni L, Filigheddu F, Giacché and Rossi F. Genetic polymorphism of the renin-angiotensin-aldosterone system and arterial hypertension in the Italian population: the GENIPER Project. *J of Hypertension* 2003;21:1853-1860.
46. Thomas GN, Tomlinson B, Chan JCN, Sanderson JE, Cockram CS, Critchley J. Renin-Angiotensin System Gene Polymorphism, Blood pressure, Dyslipidemia, and Diabetes in Hong Kong Chinese. *Diabetes Care* 2001;24: 356-361.
47. Ortiz MA, De Prado A, Donate T, Gallart L, Claramunt H, Hernandez M, Martinez J, Martinez E, Pou JM. Angiotensin-converting enzyme gene and evolution of nephropathy to end-stage renal disease. *Nephrology* 2003;8:171-176.
48. Vargas-Alarcón G, Hernández-Pacheco G, Rodríguez-Pérez JM, Pérez-Hernández N, Pavón Z, Fragoso JM, Juárez-Cedillo T, Villarreal-Garza C and Granados J. Angiotensin-Converting Enzyme Gene (ACE) Insertion/Deletion polymorphism in Mexican Populations. *Human Biology* 2003;75:889-896.
49. Martínez E. Síndrome metabólico. Revisiones Bibliográficas para el Médico General Facultad de Medicina UNAM 2003;8:17-36.
50. Bloomgarden ZT. Obesity, hipertension, and insulin resistance. *Diabetes Care* 2002;25:2088-2097.

51. Bénichou-Merlet C, Gilbert Th, Vilar J, Moreau E, Freund N, Lelièvre-Pégorier M. Nephron Number: Variability Is the Rule: Causes and Consequences. *Nature Lab Invest* 1999;79(5):515-527.
52. Hoy WE, Rees M, Kile E, Mathews JD, Wang Z. A new dimension to the Baker hypothesis: Low birthweight and susceptibility to renal disease. *Kidney Int* 1999;56:1072-1077.
53. Mañalich R, Reyes L, Herrera M, Malendi C, Fundora I. Relationship between weight at birth and the number and size of renal glomeruli in humans: A histomorphometric study. *Kidney Int* 2000;58:770-773.
54. Morgan T. Renin, Angiotensin, sodium and Organ Damage. *Hyperten Res* 2003;26:349-354.
55. van der Kleij FGH, Schmidt A, Navis GJ, Haas M, Yilmaz N, de Jong PE, Mayer G, de Zeeuw D. ACE I/D polymorphism and short-term renal response to ACE-inhibition; Role of sodium status. *Kidney Int* 1998;53 (Suppl):S23-S26.
56. Bonilla C, Parra EJ, Pfaff CL, Dios S, Marshall JA, Hamman RF, Ferrell RE, Hoggart CL, McKeigue PM and Shriver MD. Admixture in the Hispanics of the San Luis Valley, Colorado and its implications for complex trait gene mapping. *Annals of Human Genetics* 2004;68,139-153.
57. Gavin JR, Alberti KG, Davidson MB, DeFronzo RA, Drash A, Gabbe SG, Genuth S, Harris MI, Kahn R, Keen H, Knowler WC, Lebovitz H, Maclaren NK, Palmer JP, Raskin P, Rizza RA and Stern MP. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003; 26(Suppl 1):S5-S20.
58. Ritz E. Albuminuria and Vascular Damage – The Vicious Twins. *N Engl J Med* 2003;348:2349-2352.
59. Molitch ME, De Fronzo RA, Franz MJ, Keane WF, Mogensen CE, Parving H-H and Steffes MW. Diabetic Nephropathy. *Diabetes Care* 2003;26(Suppl 1):S94-S98.
60. Trevisan R, Vedovato M, Mazzon C, Coracina A, Lori E, Tiengo A, Del Prato S. Concomitance of diabetic retinopathy and proteinuria accelerates the rate

- of decline of kidney function in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2002;25:2026-2031.
61. Ruggenenti P, Schieppati A, Remuzzi G. Progression, remission, regression of chronic renal diseases. *Lancet* 2001;357:1601-1608.
62. Lepore G, Maglio ML, Nosari I, Dodesini AR, Trevisan R. Cost-effectiveness of two screening programs for microalbuminuria in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002;25:2103.
63. Leyva-Jiménez R, Álvarez-Aguilar C y López-Molina MG. Función renal en diabéticos tipo 2, determinada por fórmula de Cockcroft-Gault y depuración de creatinina. *Rev Med IMSS* 2004;42:5-10.
64. Soman SS, Soman AS. *Diabetic Nephropathy*. eMedicine.com, Inc. 2004. Consultado 23 de agosto 2004.
65. Geneser F. Aparato urinario En: *Histología sobre bases biomoleculares*. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 2000;pp.555-578.
66. Ruiz M. Diagnóstico precoz de la nefropatía diabética. http://eddie2.tripod.com.mx/diabetes/id1_1.html 2005. Consultado el 29 de agosto de 2005.
67. Bays H, Mandarin L, DeFronzo RA. Mechanisms of endocrine disease. Role of the Adipocyte, Free Fatty Acids, and Ectopic Fat in Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus: Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor Agonists Provide a Rational Therapeutic Approach. *J of Clin Endocrinol Metab* 2004;89:463-478.
68. Gilbert RE, Krunt H, Wilkinson-Berka J, Kelly DJ. The renin-angiotensin system and the long-term complications of diabetes: pathophysiological and therapeutic considerations. *Diabetic Medicine* 2003;20:607-621.
69. Méndez JD. Productos finales de glicación avanzada y complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Gac Méd Méx* 2003;139:49-55.
70. Susztak K, Sharma K, Schiffer M, Mccue P, Ciccone E and Böttinger P. Genomic Strategies for Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003;14 (Suppl):S71-S78.

71. Blobel GA, Schiemann WP, Lodish HF. Role of Transforming Growth Factor β in Human Disease. *N Engl J Med* 2000;342:1350-1358.
72. Macías-Silva M, Abdollah S, Hoodless PA, Pirone R, Attisano L, Wrana JL. MADR2 Is a Substrate of the TGF β Receptor and Its Phosphorylation Is Required for Nuclear Accumulation and Signaling. *Cell* 1996;87:1215-1224.
73. Briones-Orta M, Moreno-Álvarez P, Macías-Silva M. Estudio de las interacciones entre la vía del TGF- β y otras vías de señalización en células estrelladas hepáticas. *Memorias XXV Congreso Nacional de Bioquímica*. 2004.
74. Li JH, Huang XR, Zhu H, Oldfield M, Cooper M, Truong LD, Johnson RJ and Lan HY. Advanced glycation end products activate Smad signaling via TGF- β -dependent and independent mechanisms: implications for diabetic renal and vascular disease. *The FASEB Journal* 2004;18:176-178.
75. Carey RM, Sigary HM. The intrarenal renin-angiotensin system and diabetic nephropathy. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 2003;14:274-281.
76. Enriquez-Ramírez ML. Asociación del polimorfismo del gen de la enzima convertora de angiotensina en hipertensión arterial y diabetes mellitus tipo 2. Tesis de Maestría en Farmacología Básica. Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez" Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich. México. 2003.
77. Salamanca-Gómez F. El cincuentenario de la doble hélice. *Gac Méd Méx* 2003;139:171-172.
78. Ranwala SM, Lazar MA. Peroxisome proliferator-activated receptor γ in diabetes and metabolism. *TRENDS in Pharm Sci* 2004;25:331-336.
79. Snitker S, Watanabi RM, Ani I, Xiang AH, Marroquin A, Ochoa C, Goico J, Shuldiner AR, Buchanan TA. Changes in Insulin Sensitivity in Response to Troglitazone Do Not Differ Between Subjects With and Without the common, functional Pro 12Ala Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ 2 Gene Variant. *Diabetes Care* 2004;27:1365-68.

80. Coll W, Campos B, González-Núñez D, Botey A, Poch E. Association between the A1166C polymorphism of the angiotensin II receptor type 1 and progression of chronic renal insufficiency. *J Nephrol* 2003;16:357-364.
81. Gumprecht J, Zychma MJ, Grzeszczak W, Zukowska-Szczechowska E and the End-Stage Renal Disease Study Group. Angiotensin-I-converting enzyme gene insertion/deletion and angiotensinogen M235T polymorphisms: Risk of chronic renal failure. *Kidney Int* 2000;58:513-519.
82. Crisan D, Carr J. Angiotensin I-Converting Enzyme. Genotype and Disease Associations. *J Mol Diag* 2000;2:105-115
83. Tarnow L, Gluud Ch, Parving H_H. Diabetic nephropathy and the insertion/deletion polymorphism of the angiotensina-converting enzyme gene. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:1125-1130.
84. Turner AJ, Hooper NM. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *TRENDS in Pharmacol Sci* 2002;23:177-183.
85. Moran JV, Morrish TA. Chromosomes: Noncoding DNA (including Satellite DNA). *Encyclopedia of life sciences*. Nature Publishing Group www.els.net. 2001. Consultado el 23 de mayo de 2002.
86. Mattick JS. The Hidden genetic program of complex organism. *Scientific American* 2004;31-37.
87. Dagan T, Sorek R, Sharon E, Ast G and Graur D. *AluGene*: a database of *Alu* elements incorporated within protein-coding genes. *Nucleic Acids Research* 2004;32:489-492.
88. Abdel-Halim S, Ray DA, Hedges DJ, Jurka J and Batzer MA. Analysis of the human *Alu* Ye lineage. *BMC Evolutionary Biology*. 2005;5:18-26.
89. Britten RJ. The majority of human genes have regions repeated in other human genes. *PNAS* 2005;102:5466-5470.
90. Roy-Engel AM, Carroll ML, Vogel E, Garber RK, Nguyen SV, Abdel-Halim S, Batzer MA and Deininger PL. *Alu* Insertion Polymorphism for the Study of Human Genomic Diversity. *Genetics* 2001;159:279-290.
91. Mamedov IZ, Arzumanyan ES, Amosova AL, Levedev YB and Sverdiov ED: Whole-genome experimental identification of insertion/deletion

- polymorphism of interspersed repeats by a new general approach. *Nucleic Acids Research* 2005;33:16-24.
92. Han K, Sen SK, Wang J, Callinan PA, Lee J, Cordaux R, Liang P and Batzer MA. Genomic rearrangements by LINE-1 insertion-mediated deletion in the human and chimpanzee lineages. *Nucleic Acid Research* 2005;33:4040-4052.
93. Zingler N, Willhoeft U, Hans-Peter B, Schoder V, Jahns T, Kay-Martin OH, Morrish TA, Löwer J and Schumann GG. Analysis of 5' junctions of human LINE-1 and *Alu* retrotransposons suggests an alternative model for 5'-end attachment requiring microhomology-mediated end-joining. *Genome Research* 2005;15:780-789.
94. Lei H, Day INM and Vorechovský I. Exonization of *AluYa5* in the human *ACE* gene requires mutations in 5' splice sites and is facilitated by a conserved splicing enhancer. *Nucleic Acid Research* 2005; 33:3897-3906.
95. Hbdel-Halim S, Ray DA, Xing J, Callinan PA, Myers JS, Hedges DJ, Garber RK, Witherspoon DJ, Jorde LB and Batzer MA. *Alu* elements and hominid phylogenetics. *PNAS* 2003;100:12787-12791.
96. Jurka J, Kohany O, Pavlicek, Kapitonov VV and Jurka MV. Duplication, coclustering, and selection of human *Alu* retrotransposons. *PNAS* 2004; 101:1268-1272.
97. Alcocer L. Bloqueo del sistema renina-angiotensina en la hipertensión arterial. Seminario de Fisiología y tratamiento de la presión arterial. Módulo 3. Universidad La Salle, Tecnológico de Monterrey, Sociedad Mexicana de Cardiología 2004 pp.2-12.
98. Wolf G, Butzmann U, Wenzel UO. The Renin-Angiotensin System and Progression of Renal Disease: From Hemodynamics to Cell Biology. *Nephron Physiology* 2004;93:3-13.
99. Wolf G, Ritz E. Diabetic Nephropathy in type 2 Diabetes Prevention and Patient Management. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:1-17.

100. Wolf G. Molecular mechanisms of angiotensin II in the kidney: emerging role in the progression of renal disease: beyond haemodynamics. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:1131-1142.
101. Navis G, van der Kleij FGH, de Zeeuw D, de Jong PE. Angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism and renal disease. *J Mol Med* 1999;77:781-791.
102. Verdejo J. El sistema renina-angiotensina tisular. Seminario de Fisiología y tratamiento de la presión arterial. Módulo 1. Universidad La Salle. Tecnológico de Monterrey, Sociedad Mexicana de Cardiología. 2004 pp.2-11.
103. Susuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Inflammation and angiotensin II. *Int J Bioch & Cell Biol* 2003;35:881-900.
104. Hooper NM and Turner AJ. An ACE structure. *Nature Structural Biology* 2003;10:155-157.
105. Hubert C, Houot AM, Corvol P and Soubrier F. Structure of Angiotensin I-converting Enzyme Gene. *J Biol Chem* 1991;266:15377-15383.
106. Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Hubert C, Allegrini J, Mohn M, Tregear G, Corvol P. Two putative active centers in human angiotensina I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 85:9386-9390.
107. Poch E. Enzima de conversión de la angiotensina (ECA); polimorfismo I/D en hipertensión arterial y neuropatía. 1st Congress of Nephrology in Internet; Barcelona, España. . <http://www.uninet.edu/cin2000/conferences/poch/poch.html>. 2000. Consultado el 04 de noviembre de 2004.
108. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A Human Homolog of Angiotensin-converting Enzyme. *J Biol Chem* 2000; 275:33238-33243.
109. Mogensen CE, Neldam S Tikkanen I, Oren S, Viskoper R, Watts RW, Cooper ME for de CALM study group. Randomised controlled trial of dual

- blockade of renin-angiotensin system in patients with hypertension, microalbuminuria, and non-insulin dependent diabetes: the candesartan and lisinopril microalbuminuria (CALM) study. *British Medical J* 2000;321:1440-1444.
110. Parving H-H, Lehnert H, Bröchner-Mortensen J, Gomis R, Andersen S and Arner P. The effect of Irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Eng J Med* 2001;345:870-878.
111. Rossing K, Chistensen PK, Hansen BV, Carstensen B, Parving H-H. Optimal Dose of Candesartan for Renoprotection in Type 2 Diabetic Patients With Nephropathy. *Diabetes Care* 2003;26:150-155.
112. Andersen S, Tarnow L, Cambien F, Rossing P, Juhi TR, Deinum J, Parving H-H. Long-Term Renoprotective Effects of Losartan in Diabetic Nephropathy. *Diabetes Care* 2003;26:1501-1506.
113. Burrell LM, Johnston CI, Tikellis Ch and Cooper ME. ACE2, a new regulator of the renin-angiotensin system. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 2004;15:166-169.
114. Tikellis Ch, Johnston CI, Forbes JM, Burns WC, Burrell LM, Risvanis J, Cooper ME. Characterization of Renal Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Diabetic Nephropathy. *Hypertension* 2003;41:392-397.
115. NKF K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification. National Kidney Foundation. Kidney Disease Outcome Quality Initiative Guidelines. http://www.kidney.org/professionals/kdoqi/guidelines_ckd/p4_class_gl.htm 2005. Consultado el 27 de julio de 2005.
116. Bennett P, Moore G. Aislamiento del DNA. Análisis del DNA. Reacción en cadena de la polimerasa. En: *Biología molecular para perinatólogos*. Editorial Masson S. A. Barcelona, España. 1995; pp. 51-76.
117. Wilton S. Direct Sequencing of PCR Products. *Encyclopedia of life sciences*. Nature Publishing Group www.els.net. 2001. Consultado el 23 de mayo de 2002.

118. Innis MA and Gelfand DH. Optimization of PCRs. En: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc. USA. 1990 pp.3-12.
119. Arranz MC, Almeida I, Rodríguez B, Despaux R, Rodríguez JC, García G y González R. Evaluación de un anticuerpo monoclonal antigonadotropina coriónica para detectar embarazo. Rev Cub Endocrinol 1997;8:176-183.
120. Technical Guide for ELISA. Protocols. www.kpl.com. 2005. Consultado el 20 de agosto de 2005.
121. Baudin. Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism and drug response. Clin Chem Lab Med 2000;38:853-856.
122. Clearfield MB. Adult Treatment Panel III: Do we really need another set of cholesterol guidelines? JAOA 2002;102:S6-S11.
123. Aliyu ZY, Yousif SB, Plantholt K, Salihu HM, Erinzle A and Plantholt S. Assessing compliance of cardiologists with the national cholesterol education program (NCEP) III guidelines in an ambulatory care setting. Lipids in Health and Disease 2004;3:9-12.
124. Caglar K, Hakim RM and Ikizler TA. Approaches to the Reversal of Malnutrition, Inflammation, and Atherosclerosis in End-Stage Renal Disease. Nutritions Reviews 2002;60:378-386.
125. Zee RYL, Rao VS, Paster RZ, Sweet ChS, Lindpaintner K. Three Candidate Genes and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor-Related Cough. Hypertension 1998;31:925-928.
126. Mukae S, Itoh S, Aoki S, Iwata T, Nishio K, Sato R, Katagiri T. Association of polymorphism of renin-angiotensin system and bradykinin B2 receptor with ACE-inhibitor-related cough. J Hum Hypertens 2002;16:857-863.
127. Heltianu C, Costache G, Gafencu A, Diaconu M, Bodeanu M, Cristea C, Azibi K, Poenaru L, Simionescu M. Relationship of eNOS gene variants to diseases that have in common an endotelial cell dysfunction. J Cell Mol Med 2005;9:135-142.

128. Yuk-Hwa T, Chun C, Ming K, Chung-Ngor J, Kam-Tao P. Contribution of gene polymorphism in the renin-angiotensin system to macroangiopathy in patients with diabetic nephropathy. *Am J Kidney Diseases* 2001;38:1-13
129. Poch E, González D, Giner V, Bragulat E, Coca A, de la Sierra A. Molecular Basis of SALT sensitivity in Human Hypertension. Evaluation of Renin-Angiotensin-Aldosterone System Gene Polymorphisms. *Hypertension* 2001;38:1204-1209.
130. Najjar S. Insulin Action: Molecular Basis of Diabetes. *Encyclopedia of life sciences*. Nature Publishing Group www.els.net. 2001. Consultado el 23 de mayo de 2002.

ANEXOS

ANEXO 2

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

A quien corresponda:

Yo _____ decido libre y voluntariamente que acepto participar en el estudio "RELACION DEL POLIMORFISMO DEL GEN DE LA ECA Y PROGESION A DAÑO RENAL EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 EN POBLACION MESTIZA DE LA REGION CENTRO-OCCIDENTE DE LA REPUBLICA MEXICANA" que se realizará en el HGR No. 1 y UMF No. 80/IMSS cuyos objetivos consisten en demostrar si el polimorfismo I/D del gen de la ECA se asocia a progresión de la enfermedad renal en pacientes con DM-2.

Estoy consiente de que los procedimientos, y pruebas para lograr los objetivos mencionados consistirán en la toma de muestras de sangre y orina con material estéril, desechable y que los riesgos a mi persona son mínimos. Se me ha informado igualmente que una muestra de la sangre tomada se utilizará para la extracción de ADN que se utilizará para la realización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para identificar el polimorfismo de referencia y que en caso que yo decida que mi material genético sea eliminado tendré constancia que así se realizará.

Entiendo que del presente estudio se derivarán los siguientes beneficios: de demostrarse que la variedad genotípica D/D se asocie a un mayor desarrollo de nefropatía diabética se justificaría el realizar en el paciente diabético estudios epidemiológicos para la identificación de la población en riesgo y ser más estrictos en las medidas farmacológicas y no farmacológicas de control en esta población.

Es de mi conocimiento que seré libre de retirarme del presente estudio en el momento que yo así lo desee. También que puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación en este estudio.

En caso de que decidiera retirarme, la atención que como paciente recibo en esta institución no se verá afectada.

Nombre _____ Firma _____

Dirección _____

Fecha _____

Testigo _____ Dirección _____

Testigo _____ Dirección _____

Investigador _____ Firma _____