
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



"POLIMORFISMOS EN EL GEN RECEPTOR DE
VITAMINA D EN UN GRUPO DE PACIENTES
MEXICANOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 1"

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

ROSALBA CASTILLÓN GIL

LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL., JULIO DEL 2006.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS**

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**“POLIMORFISMOS EN EL GEN RECEPTOR DE
VITAMINA D EN UN GRUPO DE PACIENTES
MEXICANOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 1”**

PRESENTA:

ROSALBA CASTILLÓN GIL

Tesis de Licenciatura realizada bajo la dirección de:

Dra. en C. Lucila Sandoval Ramírez

Asesor de Tesis:

Dr. en C. Daniel Ortuño Sahagún



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y
Agropecuarias

Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura
en Biología
075/ C. C. BIOLOGÍA

C. ROSALBA CASTILLON GIL
PRESENTE

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título : “ **POLIMORFISMOS EN EL GEN RECEPTOR DE VITAMINA D EN UN GRUPO DE PACIENTES MEXICANOS CON DIABETES MELLITUS TIPO I**” para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director / a de dicho trabajo al/la: **DRA. LUCILA SANDOVAL RAMÍREZ** y como asesor/a: **DR. DANIEL ORTUÑO SAHAGÚN**.

Sin más por el momento, le envío un caluroso saludo.

ATENTAMENTE
“PIENSA Y TRABAJA”

Las Agujas, Zapopan., 6 de Marzo del 2006.

DR. CARLOS ÁLVAREZ MOYA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

DRA. LAURA GUADALUPE MEDINA CEJA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



C.c.p. DRA. LUCILA SANDOVAL RAMÍREZ - Director del trabajo

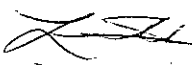
Dr. Carlos Álvarez Moya.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Carrera de Licenciado en Biología.
 CUCBA.
 Presente

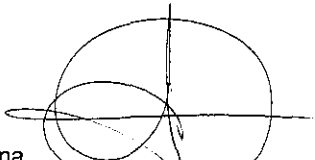
Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad, Tesis e informes, opción Tesis, con el título: “POLIMORFISMOS EN EL GEN RECEPTOR DE VITAMINA D EN UN GRUPO DE PACIENTES MEXICANOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 1” que realizó el/la pasante Rosalba Castellón Gil, con número de código 093667689 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.


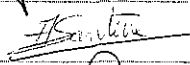

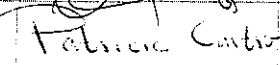
Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

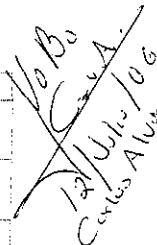
Atentamente

Guadalajara Jal. 17 de Junio, 2006

Firma 
 Nombre Dra. en C. Lucio Samuel Ramírez
 Director/a del trabajo,

firma 
 nombre Daniel Orozco S.
 Asesor(es)

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. en C. Carlos Álvarez Moya		19 / Junio / 06
Dra. en C. Anne Santerre Lucas		15 junio - 06
Dra. en C. Laura Guadalupe Medina Ceja		21 / 06 / 06
Supl. M. en C. Patricia Castro Félix		19 - Jun - 06


 CUCBA.
 12 / Junio / 06
 Carlos Álvarez Moya

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica IV, División de Genética del Centro de Investigación Biomédica de Occidente. Instituto Mexicano del Seguro Social, IMSS.

Se contó con el apoyo para las tomas de Muestras del Servicio de Endocrinología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional de Occidente, IMSS.

El Dr. en C. Fernando Rivas Solís colaboró con el análisis de datos estadísticos.

La M. En C. Patricia Castro Felix hizo importantes observaciones y sugerencias para mejorar el presente trabajo.

Agradecimientos

A Dios por el don de vida que me ha brindado, y me ha dejado crecer como persona.

A mis padres Miguel y Josefina, por todo el amor y comprensión que me dan dado , y a mis hermanas Mónica y Silvia, por su apoyo en todo momento.

A mis Maestros que me forjaron en mi carrera, en la facultad, espero seguir con su ejemplo, Liberato Portillo, Carlos Ramírez, Raymundo Delgadillo, entre otros.

A mis grandes amigas Cecilia, Claudia, Edith y Patricia, gracias por estar conmigo, en los momentos más difíciles, como disfrutar de la alegría de ser su amiga. A un gran amigo Seth, por el apoyo que me brindaste para realización de mi Tesis.

Ágradezco a la Dra. en C. Lucila Sandoval Ramírez por la oportunidad que me dio, de realizar este trabajo de tesis.

A mi asesor de tesis el Dr. en C. Daniel Ortuño Sahagún por sus comentarios y tiempo dedicado para mi asesoría.

Al Dr. Jesús Escalante Pulido, Jefe de Endocrinología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional de Occidente, por el apoyo brindado en la toma de muestras sanguíneas.

Al Dr. en C. Fernando Rivas Solís, gracias por su tiempo, para la realización del apoyo estadístico.

A mis compañeros de laboratorio Berenice, Miriam, Juan Manuel y Juan Pablo, por compartir conmigo sus sabidurías.

Al Doctor Carlos Camacho, por sus consejos y además de enseñarme a seguir adelante.

En memoria de Paula Solís, gracias por tu ejemplo de vida, y que Dios te guarde.

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
°C	Grados centígrados
CIBO	Centro de Investigación Biomédica de Occidente
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfatados
1, 25 D ₃	Vitamina D ₃
DTAB	Bromuro de dodecil-trimetil amonio
EDTA	Ácido etilendiamino tetra acético
h	Horas
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
ng	Nanogramos
NaCl	Cloruro de sodio
NOD	Ratones no obesos pero diabéticos
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
M	Molar
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
pb	Pares de bases
PCR	Del inglés <i>polymerase chain reaction</i>
rpm	Revoluciones por minuto
RCG	Rosalba Castellón Gil
RVD	Gen del receptor de vitamina D
seg	Segundos
Taq polimerasa	DNA Polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
μl	Microlitro
U	Unidad
UV	Ultra Violeta
V	Voltios

INDICE GENERAL

Contenido	Página
INDICE GENERAL	
INDICE DE FIGURAS	
INDICE DE CUADROS	
ABREVIATURAS	
RESUMEN	1
Antecedentes	2
Clasificación de la Diabetes	2
Vitamina D	3
Gen del Receptor de la vitamina D (<i>RVD</i>)	4
Complejo <i>RVD/RXR</i>	6
Polimorfismos del gen del receptor de vitamina D	7
Polimorfismo <i>FokI</i> del gen <i>RVD</i>	7
Polimorfismo <i>BsmI</i> del gen <i>RVD</i>	7
Polimorfismo <i>TaqI</i> del gen <i>RVD</i>	8
Planteamiento del problema	9
Justificación	10
Hipótesis	11
Objetivos	12
General	12
Particulares	12
Material y Métodos	13
Sede	13
Diseño experimental	13
Criterios	13
Extracción de DNA	14
Amplificación del DNA	14
Codón de inicio de <i>FokI</i>	14
Exón 7 e intrón 7 de <i>BsmI</i>	15
Intrón 8 y exón 9 de <i>TaqI</i>	15
Digestión del producto de PCR con enzimas de restricción	16
Electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%	16
Análisis de los geles	16
Análisis estadístico	17
Consideraciones éticas	17
Resultados	18
Discusión	27
Conclusiones	29
Perspectivas	30
Bibliografía	31
Anexo I	35
Carta de consentimiento informado	35

Anexo II	36
Condiciones de la amplificación por PCR para cada región	36
Condiciones de digestión del producto de PCR de cada región	37
Anexo III	38
Extracción de DNA por método de CTAB/DTAB	38
Extracción de DNA por método de Miller	39
Anexo IV	40
Descripción de técnicas moleculares	40
Anexo V	42
Procedimientos utilizados	42
Anexo VI	43
Preparación de soluciones y reactivos	43

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Esquema de la unidad de transcripción del gen <i>RVD</i>	5
2. Activación de la regulación de la vitamina D en la célula	6
3. Análisis del polimorfismo <i>FokI</i>	18
4. Análisis del polimorfismo <i>BsmI</i>	19
5. Análisis del polimorfismo <i>TaqI</i>	20
6. Comparación de las frecuencias genotípicas del polimorfismo <i>FokI</i>	24
7. Comparación de las frecuencias genotípicas del polimorfismo <i>BsmI</i>	25
8. Comparación de las frecuencias genotípicas del polimorfismo <i>TaqI</i>	26

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Enzimas de restricción y fragmentos esperados	16
2. Análisis de Hardy- Weinberg para <i>FokI</i> en el grupo control	21
3. Análisis de Hardy- Weinberg para <i>BsmI</i> en el grupo control	21
4. Análisis de Hardy- Weinberg para <i>TaqI</i> en el grupo control	21
5. Distribución genotípica para el polimorfismo <i>FokI</i>	22
6. Distribución genotípica para el polimorfismo <i>BsmI</i>	22
7. Distribución genotípica para el polimorfismo <i>TaqI</i>	22
8. Distribución alélica para el polimorfismo <i>FokI</i>	23
9. Distribución alélica para el polimorfismo <i>BsmI</i>	23
10. Distribución alélica para el polimorfismo <i>TaqI</i>	23

Resumen

La vitamina D y su metabolito hepático, la 25 hidroxivitamina D, son precursores de la síntesis de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ Vitamina D o calcitriol, que es el metabolito activo. Una de sus funciones es estimular la absorción del calcio intestinal y la mineralización de los huesos. Se ha sugerido que la deficiencia de la vitamina D, posiblemente este involucrada en la patogénesis de la diabetes mellitus tipo 1. La diabetes mellitus (DM1), es una enfermedad autoinmune caracterizada por la destrucción de las células beta, las cuales producen insulina y se encuentran localizadas en los islotes de Langerhans del páncreas. Entre 5% y 10% de los casos de DM1 corresponde a este síndrome. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la asociación entre los polimorfismos *FokI*, *BsmI* y *TaqI* del gen receptor de vitamina D (*RVD*), con la susceptibilidad a DM1 en población del occidente de México. Se obtuvieron 33 muestras de sangre de pacientes con DM1 y 33 de personas sanas. Se extrajo el DNA y se amplificó y digirieron los tres sitios polimórficos del gen *RVD* (*FokI*, *BsmI* y *TaqI*). Los fragmentos se separaron en geles de poliacrilamida al 6% (29:1) y se tiñeron con nitrato de plata.

Las pruebas estadísticas se analizaron con un programa interactivo para MS-DOS, utilizando la prueba χ^2 , y se estimaron las frecuencias alélicas y genotípicas encontrando diferencias estadísticamente significativas para las frecuencias genotípicas de pacientes y controles de los polimorfismos *FokI* y *BsmI*. Además en base a estudios bibliográficos se realizó la comparación de las frecuencias genotípicas obtenidas de la población del Occidente de México, con otras poblaciones: Húngara, Taiwanesa y Croata, mostrándonos así que la población Taiwanesa es diferente en sus porcentajes para dos sitios polimórficos *BsmI* y *TaqI*.

Nuestros resultados sugieren que los polimorfismos *FokI* y *BsmI*, tienen asociación con la susceptibilidad a DM1 en población del occidente de México.

Clasificación de la Diabetes

Diabetes mellitus de tipo 1

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1), es causada por la destrucción de células beta, las cuales se encuentran en los islotes de Langerhans del páncreas, que origina la pérdida de la secreción de insulina. Representa entre 5 y 10% de los casos del síndrome diabético. Se distinguen dos subclases, una variedad autoinmunitaria y otra idiopática. La DM1 es más frecuente en niños y adolescentes, y se le llamaba diabetes mellitus juvenil. Este tipo es raro en los adultos. En estudios comunitarios entre el 15 y 30% de los casos de DM1 se diagnosticaron después de los 30 años de edad (Le Roith, 2003). La más alta prevalencia de la enfermedad se encuentra en poblaciones del norte de Europa donde Finlandia presenta la incidencia más alta (35.3 por 100,000 habitantes), la prevalencia es baja en poblaciones de Asia y África, en México la incidencia es de 0.6 por 100,000 habitantes (Karvonen y cols, 1993).

Diabetes mellitus de tipo 2

Producida por una combinación de factores genéticos y no genéticos cuyas consecuencias son la resistencia insulínica y la deficiencia de insulina. No se conocen los genes específicos, pero se les investiga de manera intensiva. Algunos de los factores no genéticos son edad avanzada, consumo excesivo de calorías, sobrepeso, adiposidad central, vida sedentaria y bajo peso al nacer. Corresponden entre 90 y 95% de los casos del síndrome diabético (Le Roith, 2003).

Diabetes mellitus gestacional

Se define como la diabetes mellitus que es diagnosticada por primera vez durante el embarazo, afectando entre 3 a 5% de las mujeres gestantes (Le Roith, 2003).

Otros tipos específicos de diabetes mellitus

Estas variedades comprenden un grupo casual heterogéneo que abarca los casos de diabetes y las causas se conocen parcialmente. Estas causas comprenden defectos genéticos conocidos que alteran el funcionamiento de las células beta o la acción insulínica, trastornos del páncreas exocrino, endocrinopatías, cambios pancreáticos medicamentosos o químicos y enfermedades y situaciones en la que la frecuencia de la diabetes se eleva en grado considerable pero aún no se ha establecido una causa precisa. Representa entre 1 y 2% de los casos de síndrome diabético (Le Roith, 2003).

Vitamina D

La vitamina D y sus metabolitos circulan en sangre unidos a una alfa-globulina específica, puede estar almacenada en tejido adiposo y muscular por varios periodos. La vitamina desaparece del plasma con una vida media de 19 a 25 h (www.biopsicologia.net). Los compuestos de la vitamina D y sus metabolitos son excretados principalmente en bilis y heces menos del 4% de la ingesta es excretada por la orina (www.scielo.org.ve). Es esencial para promover la absorción y utilización del calcio y del fosfato, y para la calcificación normal del hueso. El papel fisiológico que cumple la vitamina D es actuando como un regulador positivo de la homeostasis del calcio (www.wyeth.com.mx).

Se ha sugerido que la deficiencia de la vitamina D este involucrada en la patogénesis de la DM1, en un modelo en ratones diabéticos no obesos (NOD) se demostró que el tratamiento con vitamina D impide el desarrollo de la DM1 (Atkinson y cols, 1999).

La 1, 25 dihidroxivitamina D₃ o calcitriol, es una hormona inmunoreguladora importante que se encuentra involucrada en muchos procesos biológicos, posee propiedades antiproliferativas, antiangiogénicas, antioxidantes e inmunosupresoras (Bell,1995). Es hidroxilada en el hígado a 25-hidroxivitamina D₃ (25-OH-D₃), que es la forma circulante y es convertida a la forma activa 1 α .25-dihidroxivitamina D₃ a 1,25-(OH)₂-D₃ o calcitriol (<http://bus.sid.cu/revistas>).

El calcitriol influye sobre la maduración de las células mononucleares y su diferenciación, así como sobre la producción de citocinas. Su acción es semejante a la de las hormonas esteroideas y tiroideas, favorece el reclutamiento de células precursoras de osteoclastos hacia sitios de reabsorción, así como el desarrollo de funciones diferenciadas que caracterizan a los osteoclastos maduros. Se une a receptores citosólicos dentro de las células blanco (www.biopsicología.net).

Gen del Receptor de la vitamina D (*RVD*)

El receptor de la vitamina D, es intracelular y se localiza en la membrana nuclear, se encuentra en todos los tejidos blancos de la vitamina D (hueso, piel y paratiroides), y pertenece a la familia de los receptores de esteroides (www.iqb.es/nutricion). Tiene dos dominios, uno de unión a vitamina D y otro que se une al DNA (www.departamentos.unicam.es).

El gen del receptor de vitamina D (*RVD*) en humanos está localizado en el cromosoma 12 cen-q12. Contiene 11 exones y se extiende a través de 75 kb, su extremo 5' no codifica ningún producto e incluye a los exones 1A,1B,1C. El producto final, del receptor de la vitamina D es codificado por los otros 8 exones (Hui y cols. 1988, Haugeber y cols. 2000). Se producen 3 isoformas por ajuste o empalme diferencial de los exones 1B y 1C; el exón 1A es rico en GC y presenta una caja TATA en su región promotora (<http://genetic.lab.topcites.com>).

Los exones II y III codifican para el dominio que se une al DNA, y los exones VII, VIII y IX codifican para el dominio que se une a la vitamina D (<http://genetic.lab.topcites.com>), (Fig. 1). Nos muestra la estructura de los exones e intrones del receptor *RVD* referido por (San Pedro y cols, 2005) y modificado por C.G.R.

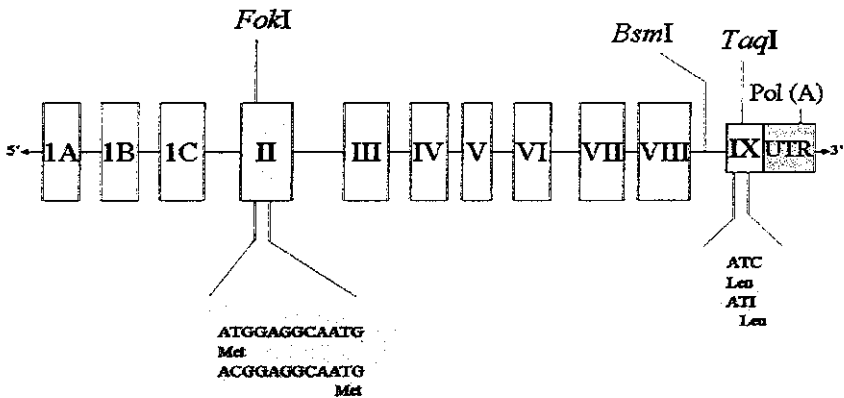


Fig. 1 Esquema de la unidad de transcripción del gen *RVD*.

Complejo (RVD/RXR)

El *RVD* después de unirse a la vitamina D_3 forma un complejo (*RVD/RXR*) con otros receptores hormonales, en particular con la familia de los receptores retinoides X. Este complejo se liga a secuencias de DNA llamadas elementos de respuesta a vitamina D (*VDRE*), en las regiones promotoras de los genes que regula (www.departamentos.unicam.es), (Fig. 2). Nos ilustra la interacción que tiene la vitamina D al entrar a la célula modificando la producción de Osteocalcina y Osteoponina, disminuyendo así la obtención del colágeno; referido de (www.scielo.org.veg) y modificado por C.G.R.

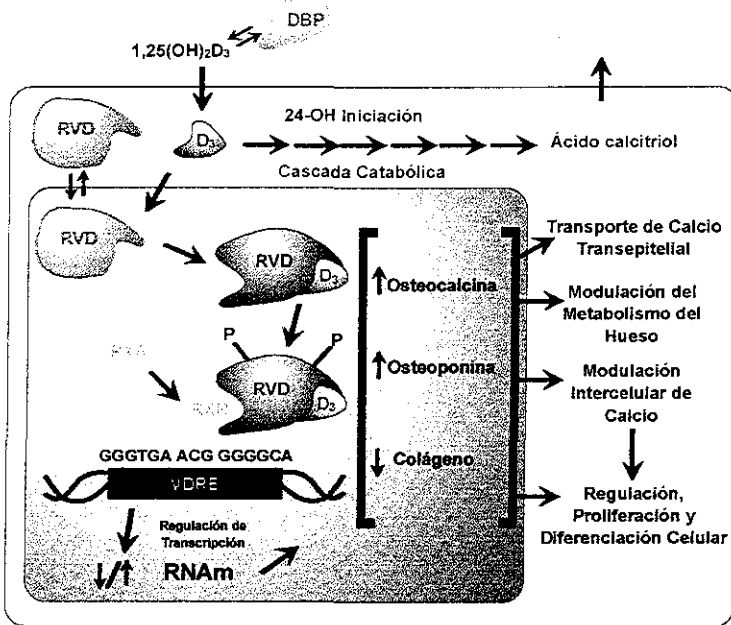


Fig. 2 Activación de la regulación de la vitamina D en la célula.

Polimorfismos del gen receptor de vitamina D

Polimorfismo FokI del gen RVD

Entre los diversos polimorfismos del gen *RVD*, un cambio de C por T genera un codón de inicio nuevo (ATG), 9 pares de bases antes del sitio de inicio común, el cual se detecta por la presencia de un sitio de reconocimiento para la enzima *FokI* (Fig. 1). El alelo “f” (definido como la presencia del sitio de restricción), genera un péptido con 3 aminoácidos (aa) adicionales que es 1.7 veces menos eficiente que el del alelo “F” alternativo (Arai y cols, 1997).

Este polimorfismo se ha asociado también con una baja densidad ósea (Harris y cols, 1997). Además el genotipo “ff” se ha observado fuertemente asociado con tuberculosis en Asia, mientras que el genotipo “FF” con aumento en la activación de la transcripción y absorción de calcio (Liu y cols, 2003). No obstante, en un estudio realizado en más de 1000 pacientes en Finlandia se concluye que es poco probable que exista una asociación de estos polimorfismos con la DM1 (Turpeinen y cols, 2003). En las poblaciones de Navarra y Barcelona se demostró que el alelo F, puede incrementar la susceptibilidad a DM1 (Marti y cols, 2004).

Polimorfismo BsmI del gen RVD

El polimorfismo *BsmI* se localiza en el intrón que separa los exones VIII y IX (Fig. 1), es el más estudiado, ya que se relaciona con el 75% del efecto genético en la osteoporosis (Liu y cols, 2003). Se ha demostrado su influencia en la absorción de calcio y la densidad mineral ósea. Además, se ha observado que las distribuciones alélicas de este polimorfismo muestran variaciones inter-poblacionales (Bellamy y cols, 1999; Wilkinson y cols, 2000; Selvaraj y cols, 2000).

Estudios recientes han asociado polimorfismos del gen *RVD* con DM1 en diferentes poblaciones; Chang y cols, (2000) en Taiwán reportan diferencias en las frecuencias alélicas del polimorfismo *BsmI* en pacientes con DM1, y concluyen que el genotipo “BB”

confiere mayor riesgo para desarrollar la enfermedad. También Mc Dermott y cols, (1997) encontró una transmisión preferencial del alelo “b” en pacientes con descendencia afectada del Sur de la India.

Polimorfismo TaqI del gen RVD

El codón 352 del exón 9 de este gen es polimórfico y puede existir como ATC o ATT, siendo el primero (ATC, alelo “t”) un sitio de reconocimiento para la enzima *TaqI*, mientras que con el cambio C→T (ATT, alelo “T”) se pierde el sitio de restricción (Fig. 1). El alelo T es el más común, mientras que el “t” (menos común) se ha asociado con niveles aumentados de la expresión del mRNA de este gen (Morrison y cols, 1992). Como resultado, aquellos individuos que son homocigotos para el alelo “t” demuestran mayor cantidad del metabolito activo de la vitamina D en suero (Taylor y cols, 1996).

Se ha sugerido que este polimorfismo se asocia con diferentes entidades patológicas, infecciosas, neoplásicas e idiopáticas. Aunque, los datos no son aún concluyentes y son controversiales, el genotipo “tt” puede estar asociado con baja densidad ósea (Zmuda y cols, 1997), con resistencia a hiperparatiroidismo primario y secundario (Carling y cols, 1995), con resistencia al cáncer de próstata (Taylor y cols, 1996), y con tolerancia a la infección por el virus de la hepatitis B (Bellamy y cols, 1999).

En otros estudios se han reportado combinaciones de los alelos de los polimorfismos del gen *RVD*, en población de niñas alemanas el polimorfismo *BsmI*, mostró que el alelo b incrementa la susceptibilidad a DM1 (Baláz y cols, 2002). Para la misma población se descubrió una asociación del genotipo “TT” para el polimorfismo *TaqI* en pacientes con DM1 (Fassbender y cols, 2002).

Además, en población del sur de Croacia se observó que la combinación de los genotipos BB/AA/tt confiere una fuerte susceptibilidad a desarrollar DM1 (Skrabic y cols, 2003). Estudios en población Alemana, sugieren que el haplotipo “BA1” puede estar asociado con susceptibilidad a DM1 (Pani y cols, 2000).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La diabetes mellitus esta considerada como un problema de salud pública. Los polimorfismos del gen *RVD* han sido estudiados en otras partes del Mundo, encontrando asociación con la DM1.

En México aun no existen datos que sustenten, si existe o no, una asociación de estos polimorfismos con la diabetes mellitus tipo 1. Por lo cual nos proponemos contestar la siguiente pregunta.

Pregunta de Investigación:

¿Existe asociación entre los polimorfismos del gen RVD y la DM1 en pacientes del occidente de México?

JUSTIFICACIÓN

Actualmente la DM1 es una enfermedad autoinmune, que ha aumentado el nivel de mortalidad a nivel mundial, en un 5% anual. Esto quiere decir que probablemente los factores ambientales, junto con los genéticos, determinan la aparición de la enfermedad.

En los últimos años se ha estudiado el efecto de los polimorfismos del gen *RVD* relacionado con la susceptibilidad a DM1 en poblaciones de diferentes partes del mundo. Conocer cuáles son los alelos y genotipos que determinen su presencia en pacientes mexicanos con DM1, contribuirá a identificar los individuos con riesgo de contraer la enfermedad.

HIPÓTESIS

Los polimorfismos *FokI*, *BsmI*, y *TaqI* del gen *RVD*, están asociados con la susceptibilidad a DM1 en población del occidente de México.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la asociación entre los polimorfismos del gen *RVD* con la susceptibilidad a DM1 en población del occidente de México.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.1 Identificar los alelos y genotipos de los polimorfismos *FokI*, *BsmI*, y *TaqI* del gen *RVD* en pacientes con DM1 y un grupo control.
- 1.2 Reportar la frecuencia de los alelos y genotipos de pacientes con DM1 y el grupo control.
- 1.3 Comparar la frecuencia de los genotipos encontrados en pacientes con DM1 con los de otras poblaciones reportadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

SEDE DEL ESTUDIO

Laboratorio de Bioquímica IV, División de Genética del Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO), con la colaboración del Servicio de Endocrinología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional de Occidente, IMSS.

Diseño experimental

Tipo de estudio: Transversal, descriptivo y comparativo.

Tamaño de muestra: Se tomó una n mínima de 30 individuos, según la fórmula de Chakravorty 1992.

Universo de estudio: 33 individuos diagnosticados con DM1 originarios del occidente de México, captados en el Servicio de Endocrinología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional de Occidente. Con el fin de tener un modelo comparativo se analizaron 33 individuos sin la enfermedad procedentes del Banco de Sangre del Centro Médico Nacional de Occidente. Tanto en individuos con DM1 y controles son equiparables en sexo y edad.

Criterios

Inclusión:

- ❖ Pacientes diagnosticados con diabetes mellitus tipo 1
- ❖ Edad de 16-55 años
- ❖ Sexo indistinto
- ❖ Que acepten su participación en el estudio
- ❖ Derechohabientes del IMSS

Exclusión:

- ❖ Pacientes con uno o ambos padres extranjeros
- ❖ Que su muestra no sea suficiente o su DNA este degradado
- ❖ No acepten participar en el estudio

Extracción de DNA

De cada individuo se recolectaron de 5 a 10 ml de sangre periférica en un tubo con EDTA como anticoagulante y el DNA total se obtuvo mediante el método de Miller y cols, (1988). En este trabajo para la extracción del DNA se utilizó el método de Gustinchich y cols, (1991), (Anexo III).

Cuantificación del DNA

Para determinar la calidad y cantidad del DNA extraído, se cuantificaron las muestras en un espectrofotómetro de luz UV a 260 y 280 nm. Posteriormente se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.6% teñido con bromuro de etidio (Anexo V y VI).

Amplificación del DNA

Mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se amplificó una región el gen *RVD*, usando iniciadores específicos:

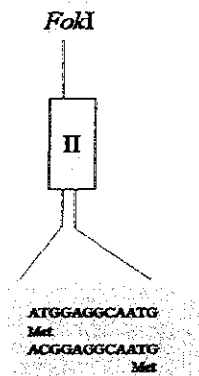
Codón de inicio de *FokI*

5'AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT 3' Sentido

5'ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC 3' Antisentido

Longitud del segmento amplificado: **260 pb**

La amplificación se realizó de acuerdo a (Wilkinson y cols, 2000).



Condiciones de amplificación:

Desnaturalización inicial a 96°C durante 1 min, desnaturalización a 94°C por 45 seg, hibridación a 60°C por 45 seg, elongación del DNA a 72°C por 45 seg, número de ciclos: 30

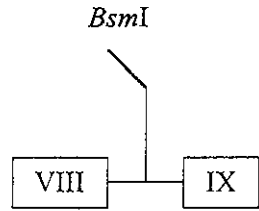
Exón 7 e intrón 7 de *BsmI*

5'CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA3' Sentido

5'AACCAGCGGGAAGAGGTCAAGGG3' Antisentido

Longitud del segmento amplificado: **600 pb**

La amplificación se realizó de acuerdo a (Chang y cols, 2000).



Condiciones de amplificación:

Desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, desnaturalización a 94°C por 30 seg, hibridación a 64°C por 30 seg, elongación del DNA a 72°C por 30 seg, número de ciclos: 32

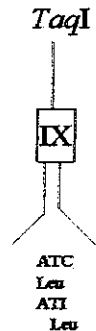
Intrón 8 y exón 9 de *TaqI*

5'CAGAGCATGGACAGGGAGC3' Sentido

5'AGGAGAGGCAGCGGTACTG3' Antisentido

Longitud del segmento amplificado: **480 pb**

La amplificación se realizó de acuerdo a (Chang y cols, 2000).



Condiciones de amplificación:

Desnaturalización inicial a 96°C durante 5 min, desnaturalización a 94°C por 30 seg, hibridación a 68°C por 30 seg, elongación del DNA a 72°C por 30 seg, número de ciclos: 32

Digestión del producto de PCR con enzimas de restricción

El producto de la PCR se sometió a digestión enzimática con la enzima de restricción correspondiente (ver cuadro 1). Wilkinson y cols, (2000); Chang y cols, (2000).

Cuadro 1. Enzimas de restricción y fragmentos esperados

Región polimorfica	Iniciadores	Tamaño producto PCR (pb)	Enzima de restricción	Fragmentos esperados después de la digestión (pb)
Codón de inicio	5' AGC TGG CCC TGG CAC TGA CTC TGC TCT 3' 5' ATG GAA ACA CCT TGC TTC TTC TCC CTC 3'	260	<i>FokI</i>	175 y 85
Exón 7- Intrón 7	5' CAA CCA AGA CTA CAA GTA CCG CGT CAG TGA 3' 5' AAC CAG CGG GAA GAG GTC AAG GG 3'	600	<i>BsmI</i>	500 y 100
Intrón 8- Exón 9	5' CAG AGC ATGGAC AGG GAG C 3' 5' AGG AGA GGC AGC GGT ACT G 3'	480	<i>TaqI</i>	280 y 200

Electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%

Se lleva a cabo el corrimiento del gel en una cámara de electroforesis a 250 voltios durante un tiempo de 2 h, se coloca en un extremo del gel un marcador de 50 pb, se tiñe el gel con nitrato de plata, una vez terminada la electroforesis para observar el producto de digestión.

Análisis de los geles

Se analizaron las bandas en los geles para determinar los alelos presentes en cada individuo.

Análisis Estadístico

El equilibrio de Hardy- Weinberg fue evaluado para cada polimorfismo en el grupo control mediante una prueba de Chi-cuadrada, se analizaron las frecuencias genotípicas y alélicas para cada polimorfismo en el grupo de DM1 y el grupo control utilizando un programa iterativo de Cómputo para MS-DOS, desarrollado por el Dr. Y, Zhong. Universidad de Ohio 1974. Se realizaron comparaciones de las frecuencias genotípicas con otras poblaciones reportadas: Húngara, Taiwanesa, y Croata.

Consideraciones éticas

El estudio es considerado de riesgo mínimo. Se pidió el consentimiento informado voluntario (Anexo I) a todos los pacientes, en una hoja se le explicaron los motivos del estudio, sus objetivos y posibles resultados esperados. Se le informó que su participación o su negativa en cada caso no modificarán los criterios para su atención médica.

RESULTADOS

Análisis del polimorfismo *FokI*

En la Fig.3 se muestran, los fragmentos de DNA producto de la digestión enzimática con *FokI*. La ausencia del sitio de corte para esta enzima genero un fragmento de 260 pb, y la presencia produjo dos fragmentos de 175 pb y 85 pb respectivamente. Los genotipos F/F y f/f (homocigotos) se asignaron para la ausencia o presencia del sitio de corte, el genotipo F/f (heterocigoto) para la ausencia y presencia del sitio de corte en un mismo individuo.

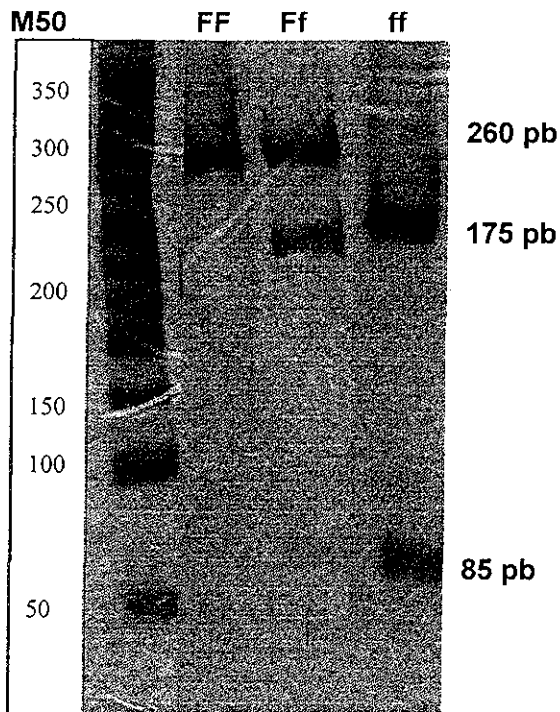


Fig. 3 Fragmentos generados por la digestión del DNA con la enzima *FokI*. M50= Marcador de peso molecular con una escalera de 50 pb.

Análisis del polimorfismo *BsmI*

En la Fig. 4 se muestran, los fragmentos de DNA producto de la digestión enzimática con *BsmI*. La ausencia del sitio de corte para esta enzima genero un fragmento de 600 pb, y la presencia produjo dos fragmentos de 500 pb y 100 pb respectivamente. Los genotipos B/B y b/b (homocigotos) se asignaron para la ausencia o presencia del sitio de corte, el genotipo B/b (heterocigoto) para la ausencia y presencia del sitio de corte en un mismo individuo.

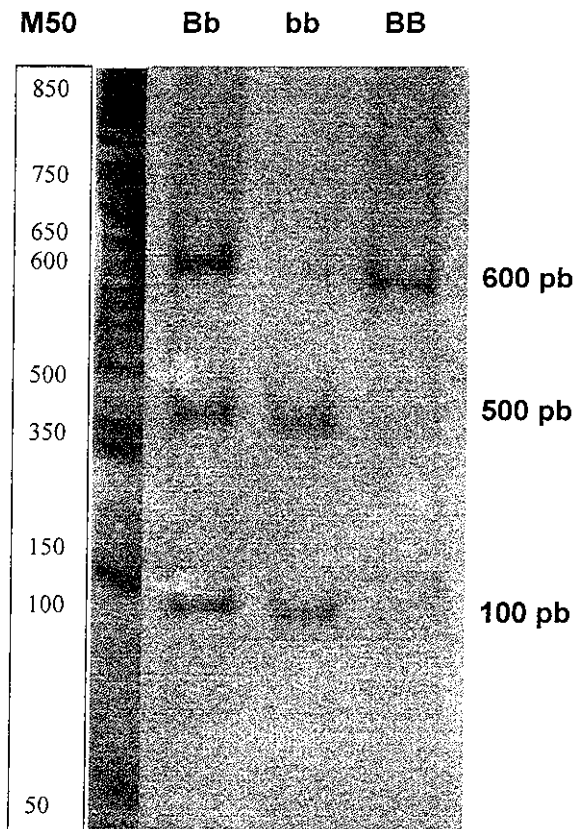


Fig. 4 Fragmentos generados por la digestión del DNA con la enzima *BsmI*. M50= Marcador de peso molecular con una escalera de 50 pb.

Análisis del polimorfismo *TaqI*

En la Fig.5 se muestran, los fragmentos de DNA producto de la digestión enzimática con *TaqI*. La ausencia del sitio de corte para esta enzima genero un fragmento de 480 pb, y la presencia produjo dos fragmentos de 280 pb y 200 pb respectivamente. Los genotipos T/T y t/t (homocigotos) se asignaron para la ausencia o presencia del sitio de corte, el genotipo T/t (heterocigoto) para la ausencia y presencia del sitio de corte en un mismo individuo.

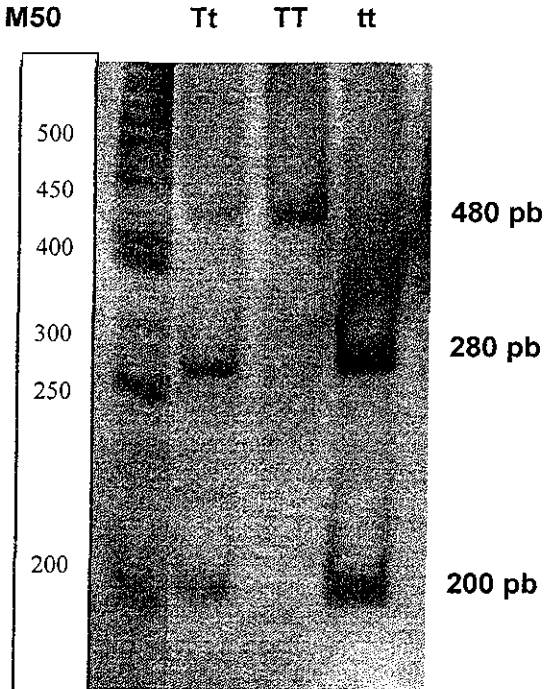


Fig.5 Fragmentos generados por la digestión del DNA con la enzima *TaqI*.
M50= Marcador de peso molecular con una escalera de 50 pb.

EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG

En los cuadros 2, 3 y 4 se muestran los genotipos observados y esperados de los polimorfismos *FokI*, *BsmI* y *TaqI*, del gen *RVD* en el grupo control y el valor de *p*.

Cuadro 2. Análisis de Hardy-Weinberg para el sitio *FokI* en el grupo control.

<i>Frecuencia Genotípica</i>				<i>Valor de p</i>
<i>FokI</i>	FF	Ff	ff	
OB	0.24	0.76	0	
ES	0.33	0.48	0.19	0.84

Cuadro 3. Análisis de Hardy-Weinberg para el sitio *BsmI* en el grupo control

<i>Frecuencia Genotípica</i>				<i>Valor de p</i>
<i>BsmI</i>	BB	Bb	bb	
OB	0	0.67	0.33	
ES	0.48	0.16	0.36	0.35

Cuadro 4. Análisis de Hardy-Weinberg para el sitio *TaqI* en el grupo control

<i>Frecuencia Genotípica</i>				<i>Valor de p</i>
<i>TaqI</i>	TT	Tt	tt	
OB	0.67	0.30	0.030	
ES	0.54	0.34	0.12	0.84

- ❖ Los polimorfismos *FokI*, *BsmI* y *TaqI*, del gen *RVD*, se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg en el grupo control $p > 0.05$.

FRECUENCIAS GENOTÍPICAS

En los siguientes cuadros se muestran las frecuencias genotípicas de cada polimorfismo en el grupo de DM1 y el grupo control, X^2 y el valor de p .

Cuadro 5. Distribución genotípica para el polimorfismo *FokI*

<i>Genotipos</i>	<i>DM1(%)</i>	<i>Control (%)</i>	X^2	<i>Valor de p</i>
<i>FokI</i>				
FF	10 (30.3)	8 (24.2)	17.66	0.00001
Ff	11 (33.3)	25 (75.7)		
ff	12 (36.3)	0 (0)		

Cuadro 6. Distribución genotípica para el polimorfismo *BsmI*

<i>Genotipos</i>	<i>DM1(%)</i>	<i>Control (%)</i>	X^2	<i>Valor de p</i>
<i>BsmI</i>				
BB	4 (12.1)	0 (0)	13.65	0.0003
Bb	8 (24.2)	22 (66.6)		
bb	21 (63.6)	11 (33.3)		

Cuadro 7. Distribución genotípica para el polimorfismo *TaqI*

<i>Genotipos</i>	<i>DM1(%)</i>	<i>Control (%)</i>	X^2	<i>Valor de p</i>
<i>TaqI</i>				
TT	20 (60.6)	22 (66.6)	1.095	0.7753
Tt	10 (30.3)	10 (30.3)		
tt	3 (9.09)	1 (3.09)		

- ❖ El análisis estadístico mostró diferencias en las frecuencias genotípicas entre pacientes y controles para los polimorfismos *FokI* y *BsmI* $p < 0.05$; para el polimorfismo *TaqI* no se encontraron diferencias significativas $p > 0.05$.
- ❖ Se encontró para el polimorfismo *FokI* en DM1 el genotipo más predominante fue ff con un 36.3% y para el grupo control el genotipo Ff con un 75.7%. Para el polimorfismo *BsmI* en DM1 el genotipo bb se presentó con un 63.6% y en el grupo control el genotipo Bb mostró un 66.6%. Las frecuencias genotípicas para el polimorfismo *TaqI* fueron muy similares entre DM1 y el grupo control.

FRECUENCIAS ALÉLICAS

En los cuadros 8, 9 y 10 cuadros se exponen las frecuencias alélicas de cada polimorfismo en el grupo de DM1 y el grupo control, X^2 y el valor de p .

Cuadro 8. Distribución alélica para el polimorfismo *FokI*

<i>Alelo</i>	<i>DM1 (%)</i>	<i>Control (%)</i>	X^2	<i>Valor de p</i>
<i>FokI</i>				
F	31 (46.9)	41 (62.1)	3.055	0.1149
f	35 (53.0)	25 (37.8)		

Cuadro 9. Distribución alélica para el polimorfismo *BsmI*

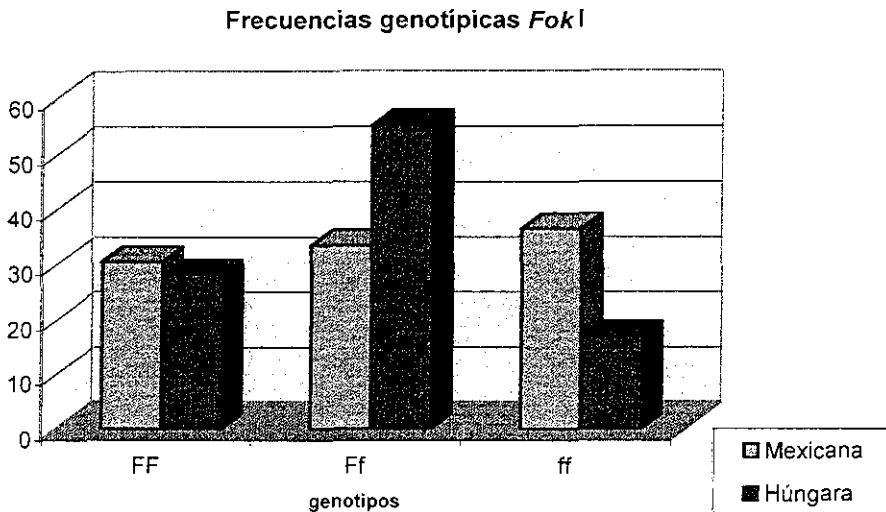
<i>Alelo</i>	<i>DM1 (%)</i>	<i>Control (%)</i>	X^2	<i>Valor de p</i>
<i>BsmI</i>				
B	16 (24.2)	22 (33.3)	1.33	0.335
b	50 (75.7)	44 (66.6)		

Cuadro 10. Distribución alélica para el polimorfismo *TaqI*

<i>Alelo</i>	<i>DM1 (%)</i>	<i>Control (%)</i>	X^2	<i>Valor de p</i>
<i>TaqI</i>				
T	50 (75.7)	54 (81.8)	0.75	0.515
t	16 (24.2)	12 (18.1)		

- ❖ En el caso de las frecuencias alélicas se encontraron similarmente entre DM1 y el grupo control. no existiendo diferencias significativas entre ellas $p < 0.05$.
- ❖ Para las frecuencias alélicas para DM1 el alelo f se mostró con un 53%, en el grupo control el alelo F se encontró con un 62.1%. El alelo b se observó con un 75.7% para DM1 y se presentó también en el grupo control con un 66.6%. El alelo T fue más frecuente para los dos grupos para DM1 con un 75.7% y el grupo control mostró un 81.8%.

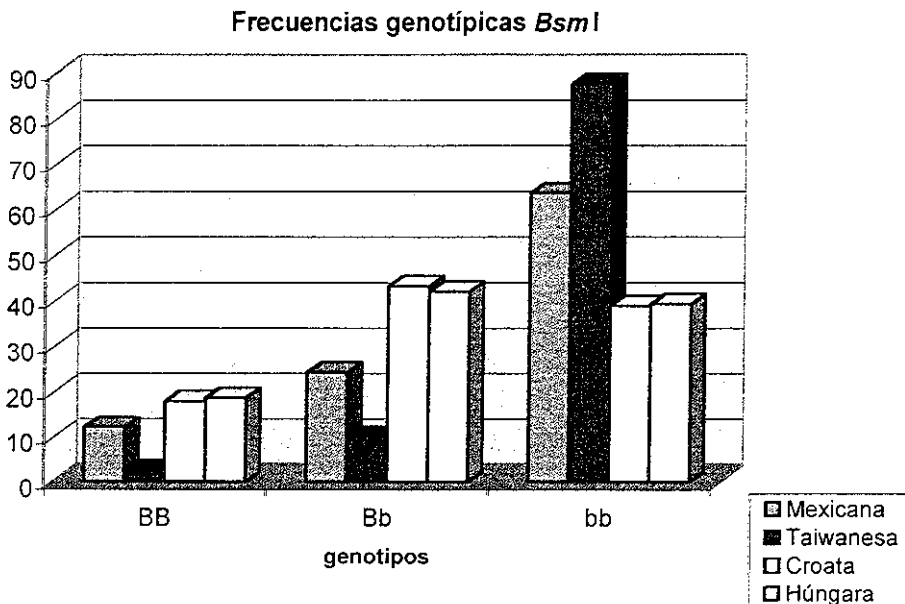
Figura 6. Comparación de las frecuencias genotípicas del polimorfismo *FokI*.



Población	Genotipo (%)		
	FF	Ff	ff
Mexicana	30.3	33.3	36.3
Húngara	28	55.1	16.8

Este polimorfismo *FokI*, solamente se comparó con la población Húngara, y las frecuencias genotípicas se representan en porcentajes, para la población Mexicana se presenta una (n =33), y para la población Húngara (n =107) individuos con DM1. La frecuencia genotípica de la población húngara es alta para el genotipo Ff (heterocigoto) presentándose con 55.1%. Para la población mexicana el genotipo ff (homocigoto) es de 36.3%.

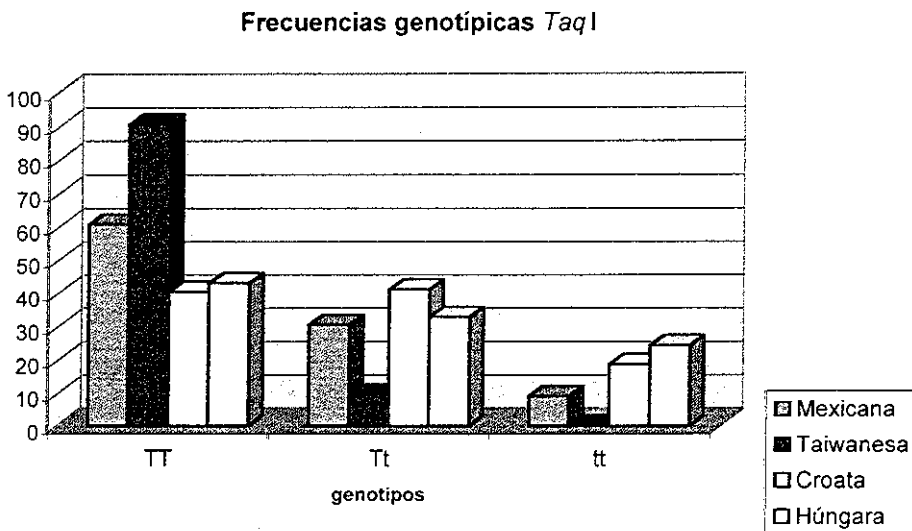
Figura 7. Comparación de las frecuencias genotípicas del polimorfismo *BsmI*.



Población	Genotipo (%)		
	BB	Bb	bb
Mexicana	12.1	24.2	63.6
Taiwanesa	2.5	10	87.5
Croata	17.9	43.2	38.8
Húngara	18.6	42	39.2

Las frecuencias genotípicas se representan en porcentajes, en la población Mexicana (n =33), la población Taiwanesa (n =157), la población Croata (n =134), y para la población Húngara (n =107) individuos con DM1. Las frecuencias genotípicas de *BsmI* en la población croata y húngara se comportan de manera similar, y para la población taiwanesa se presentó un alto índice del genotipo bb (homocigoto) con un 87.5%, también se encontró un 63.6% para la población mexicana. El genotipo BB en la población taiwanesa fue menor con un 2.5%.

Figura 8. Comparación de las frecuencias genotípicas del polimorfismo *TaqI*.



Población	Genotipo (%)		
	TT	Tt	tt
Mexicana	60.6	30.3	9
Taiwanesa	90.4	9.5	0
Croata	40.2	41	18.6
Húngara	42.9	32.7	24.2

Las frecuencias genotípicas se representan en porcentajes, en la población Mexicana (n =33), la población Taiwanesa (n =157), la población Croata (n =134), y en población Húngara (n =107) individuos con DM1. Las frecuencias genotípicas de *TaqI*, en la población taiwanesa el genotipo TT aumentó su porcentaje a 90.4%, la población mexicana presentó un 60.6%; las frecuencias genotípicas de las poblaciones croata y húngara son equivalentes para este genotipo. En el caso del genotipo tt (homocigoto) fue muy bajo para las cuatro poblaciones, no presentándose en la población taiwanesa.

DISCUSIÓN

Hasta donde conocemos este es el primer estudio en el que se analizan los polimorfismos del gen *RVD* (*FokI*, *BsmI* y *TaqI*) en pacientes con DM1 de la población del occidente de México. A diferencia de lo encontrado por Balázs y cols. (2002) en población húngara, en la cual se encontró en desequilibrio Hardy-Weinberg para el polimorfismo *TaqI*, el grupo control de la población del occidente de México mostró el equilibrio Hardy-Weinberg para los tres polimorfismos analizados. Lo anterior permitió realizar el análisis de las frecuencias genotípicas y alélicas de los tres sitios polimórficos y compararlos con las frecuencias observadas en otras poblaciones.

En este estudio se encontró que las diferencias genotípicas observadas para los sitios polimórficos *FokI* y *BsmI* en el grupo de pacientes con DM1 del occidente de México y el grupo control fueron estadísticamente significativas. Para el sitio *FokI* el genotipo ff (homocigoto) se presentó con más frecuencia en DM1. También para el sitio *BsmI*, la frecuencia del genotipo bb (homocigoto) fue mayor en pacientes con DM1. Se han realizado estudios en otras poblaciones del mundo, relacionando el gen *RVD* con la susceptibilidad a DM1. En población húngara se investigaron los polimorfismos *FokI*, *BsmI*, *ApaI*, *TaqI* y *Tru9I* del gen *RVD* en niños con DM1. De manera similar a lo observado en población del occidente de México, el alelo f del sitio *FokI* y el alelo b del sitio *BsmI* se presentó con mayor frecuencia en DM1. Sin embargo lo anterior fue observado en niñas de la población húngara con DM1. La frecuencia del alelo a del sitio *ApaI* fue también mayor en este grupo de la población. Los resultados en población húngara indican que la presencia de los alelos b y a incrementa la probabilidad de DM1 en niñas (Balázs y cols, 2002).

Por otro lado en población taiwanesa Chang y cols. (2000) estudiaron los polimorfismos *BsmI*, *ApaI* y *TaqI* del gen *RVD*, encontrando para el sitio polimórfico *BsmI*, el alelo B y los genotipos BB y Bb ocurren con más frecuencia en pacientes con DM1. Así mismo para el sitio polimórfico *ApaI* el alelo A y el genotipo AA se presentó más frecuentemente en DM1.

Los resultados de este estudio mostraron que el genotipo BB para el sitio *BsmI* y el genotipo AA para el sitio *ApaI* confieren más riesgo de DM1 en la población taiwanesa. En nuestro estudio no se analizó la región polimórfica *ApaI* del gen *RVD* que se encuentra situado entre el intrón VIII y el exón VI.

En población del Sur de Croacia se encontró para el sitio polimórfico *TaqI* que el genotipo tt ocurre con más frecuencia en pacientes con DM1. También se estudiaron los polimorfismos *BsmI* y *ApaI* del gen *RVD*. Se encontró que los genotipos combinados BB/AA/tt (haplotipo “BAAt”) confieren más riesgo de DM1 (Veselin y cols, 2003). Para la población del occidente de México en DM1 para el sitio *TaqI* no se encontraron diferencias significativas, las frecuencias genotípicas fueron muy similares entre DM1 y el grupo control. El genotipo TT fue el más frecuente para ambos grupos.

En dos poblaciones españolas (Barcelona y Navarra), se estudiaron los sitios polimórficos *FokI* y *BsmI* del gen *RVD* (Marti y cols. 2004). A diferencia de lo observado en nuestro trabajo se encontró una disminución significativa del genotipo ff en pacientes de Barcelona contra controles de Navarra. Los resultados para el sitio *BsmI* fueron diferentes en ambas poblaciones ya que la frecuencia del genotipo bb estuvo incrementada en pacientes de Barcelona, mientras la tendencia fue inversa en pacientes de Navarra. En ambos grupos el alelo F del sitio *FokI* incrementa la susceptibilidad a DM1.

El presente trabajo nos da resultados similares a los reportados en la literatura, en los cuales se asocia al gen *RVD* con la susceptibilidad a DM1, por los resultados encontrados en la presente investigación se observó que es posible que exista una asociación de los sitios polimórficos *FokI* y *BsmI* con la susceptibilidad a DM1 en población del Occidente de México.

CONCLUSIONES

- Las poblaciones del grupo control, para los sitios analizados del gen *RVD* se encontró en Equilibrio Hardy-Weingberg.
- Para las frecuencias genotípicas mostraron diferencias significativas para DM1 en los polimorfismos *FokI* y *BsmI* del gen *RVD* en la población del occidente de México.
- El polimorfismo *TaqI* del gen *RVD*, no mostró diferencias significativa con DM1 en la población del occidente de México.
- En el caso de las frecuencias alélicas descubrimos similitud entre ellas, no existiendo diferencias estadísticamente significativas para los tres polimorfismos.
- Se compararon las frecuencias genotípicas de la población con DM1 del occidente de México con otras poblaciones: Húngara, Taiwanesa y Croata. Se observó una diferencia especialmente en el polimorfismo *BsmI*, y *TaqI* en la población Taiwanesa.
- Estos resultados nos sugieren que el aumentar el número de pacientes con DM1 en este estudio, podría ser más significativa la diferencia.

PERSPECTIVAS

De manera interesante los aspectos moleculares nos llevan a conocer o entender un poco más los mecanismos de acción de un gen determinado, dando así posibles asociaciones con enfermedades de impacto social y que son actualmente preocupantes por su alto nivel de mortalidad a nivel mundial.

Estudios en diferentes partes del mundo han relacionado el gen *RVD* con la susceptibilidad a Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) encontrando que algunos de sus sitios polimórficos incrementan la susceptibilidad a la enfermedad.

Los factores implicados en la expresión génica son muchos por lo que se deben de dar a conocer en sucesivos trabajos en el área.

Los resultados encontrados en otros estudios indican que la vitamina D junto con el receptor *RVD* pueden influir en secreción de insulina modificando la producción de la misma y produciendo la susceptibilidad a DM1.

Valdría la pena para futuros trabajos el aumentar el número de pacientes con DM1 así mismo como el número de controles, para que existan diferencias más marcadas, también sería interesante trabajar con el sitio polimórfico *Apal*, y formar haplotipos para ver las diferencias con las poblaciones ya reportadas.

BIBLIOGRAFÍA

Arai H, Miyamoto K, Taketani Y, Yamamoto H, Iemori Y, Morita K, Tonai T, Nishisho T, Mori S, Takeda E. A vitamin receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women.

J. Bone Miner Res 12: 915-921 (1997)

Atkinson MA, Leiter EH. The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets?

Nat Med 5: 601-604 (1999)

Baláz G, Barna V, Dora K, László M, Attila T, Tivadar T, András S. Gender-specific association of vitamin D receptor polymorphism combinations with type 1 diabetes mellitus. *Clinical Study* 147: 803-808 (2002)

Bell NH. 25-Hydroxyvitamin D3 reverses alteration of the vitamin D-endocrine system in blacks. *Am J Med* 99 (6): 597-599 (1995)

Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam KP, Thursz M, Whittle HC, Hill AV. Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene. *J Infect Dis* 179 (3): 721-724 (1999)

Carling T, Kindmark A, Hellman P, Lundgren E, Ljunghall S, Rastad J, Akerstrom G, Melhus H. Vitamin D receptor genotypes in primary hyperparathyroidism. *Nat Med* 1: 1309-1311 (1995)

Chakravorty R. Multiple alleles and estimation of genetic parameters: computational equations showing involvement of all alleles. *Genetics* 130: 231-234 (1992)

Fassbender WJ, Goertz B, Weismuller K, Steinhauer B, Stracke H, Auch D, Linn T, Bretzel RG. VDR gene polymorphisms are overrepresented in german patients with type I diabetes compared to healthy controls without effect on biochemical parameters of bone metabolism. *Horm Metab Res* 34: 330-337 (2002)

Gustincich, Carminci P, De la Sal G. A fase method for hing – quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques* 11: 744 (1991)

Harris SS, Eccleshall TR, Gross C, Dawson-Hughes B, Feldman D. The vitamin D receptor start codon polymorphism (*FokI*) and bone mineral density in premenopausal American black and white women. *J Bone Miner Res* 12: 1043-1048 (1997)

Haugeber G, Uhling T, Falch JA, Halse JI, Kivrm TK. Bone mineral density and frequency of osteoporosis in female patients with rheumatoid arthritis: results from 349 patients in the Oslo Country Rheumatoid Arthritis register. *Arthritis Rheum* 43: 522-530 (2000)

Hui SL, Slemenda CW, Johnston JrCC. Age and bone mass a predictors of fracture in a prospective study. *J Clin Invest* 81:1804-1809 (1998)

Jyun CT, Lei H, Yeh JI, Chiu KC, Lee KC, Chen MChu, Tai TY, Chuang LM. Vitamin D receptor gene polymorphisms influence susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Taiwanese population. *Clinical Endocrinology*: 52, 575-580 (2000)

Karvonen M, Tuomilehto J, Libman L, La Porte R. A review of the recent epidemiological data on the worldwide incidence of type 1 (insulin – dependent) diabetes mellitus. World Health organization DIAMOND protect group. *Diabetologia* 36 (10): 883-892 (1993)

LeRoith D, Taylor S, Olefsky J . Editors. Diabetes Mellitus. Fundamentos y Clínica. Segunda Edición. *McGraw-Hill*: 407-409 (2003)

Liu YZ, Liu YJ, Recker RR, Deng HW. Molecular studies of identification of genes for osteoporosis: the 2002 update. *Journal of endocrinology* 177 (2); 147-196 (2003)

Marti G, Audi L, Esteban C, Oyarzabal M, Chueca M, Gussinye M, Yeste D, Fernandez-Cancio M, Andaluz P, Carrascosa A. Association of vitamin D receptor gene polymorphism with type 1 diabetes mellitus in two Spanish population. *Med Clin* 123 (8); 286-290 (2004)

McDermott M.F, Ramachandran A, Ogunkolade BW, Aganna E, Curtis D, Boucher BJ, Snehalatha C, Hitman GA. Allelic variation in the vitamin D receptor influences susceptibility to IDDM in Indian Asians. *Diabetologia* 28: 971-975 (1997)

Miller SA, Dicks DD, Polesky HP. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 16:1215 (1988)

Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6665-6669 (1992)

Pani MA, Knapp M, Donner H, Braun J, Baur MP, Usadel KH, Badenhoop K. Vitamin D receptor allele combinations influence genetics susceptibility to type 1 diabetes in Germans. *Diabetes* 49 (3) 504-507 (2000)

San Pedro J.I, Bilbao J.R, Perez de Nanclares G, Victoria J.C, Martul P, Castaño L. Heterogeneity of vitamin D receptor gene association with celiac disease and type 1 diabetes mellitus. *Autoimmunity* 38 (6): 439-444 (2005)

Selvaraj P, Narayanan PR, Reetha AM. Association of vitamin D receptor genotypes with the susceptibility to pulmonary tuberculosis in female patients & resistance in female contacts. *Indian J Med Res* 111: 172-179 (2000)

Skrabic V, Zemunik T, Situm M, Terzic J. Vitamin D receptor polymorphism and susceptibility to type 1 diabetes in the Dalmatian population. *Diabetes Research and Clinical Practices* 59: 31-35 (2003)

Taylor JA, Hirvonen A, Watson M, Pittman G, Molher JL, Bell DA. Association of prostate cancer with vitamin D receptor gene polymorphism. *Cancer Res* 56 (18) 4108-4110 (1996)

Turpeinen H, Hermann R, Vaara S, Laine AP, Simell O, Knip M, Veijola R, Ilonen J. Vitamin D receptor polymorphisms: no association with type 1 diabetes in the Finnish population. *Eur J Endocrinol* 149 (6): 591-596 (2003)

Wilkinson RJ, Llewelyn M, Toossi Z, Patel P, Pasvol G, Lalvani A, Wright D, Latif M, Davison RN. Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in West London: a case-control study. *Lancet* 355 (9204): 618-621 (2000)

Zmuda JM, Cauley JA, Danielson ME, Wolf RL, Ferrell RE. Vitamin D receptor gene polymorphisms bone turnover, and rates of bone loss in older African-American women. *J Bone Miner Res* 12 (9): 1446-1452 (1997)

Páginas de Internet de Interés

- (1) <http://www.biopsicologia.net>
- (2) <http://www.scielo.org.veg>
- (3) <http://www.wyeth.com.mx>
- (4) <http://bus.sdl.cu/revistas>
- (5) <http://www.iqb.es/nutricional>
- (6) <http://departamentos.unicam.es>
- (7) <http://geneticslab.topcites.com/vitamindandcalcium.htm>.
- (8) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM.*601769 Vitamin D receptor: VDR

ANEXO I

Centro de Investigación Biomédica de Occidente
Centro Médico Nacional de Occidente, IMSS
División de Genética
Laboratorio de Bioquímica IV



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por este medio autorizo a la Dra. en C. Lucila Sandoval Ramírez y al Dr. en C. Luis Eduardo Figuera Villanueva, para realizar los siguientes procedimientos:

- a) extraer 10 ml de sangre venosa de mi brazo
- b) si es necesario, repetir el procedimiento anterior, en un periodo no menor a tres meses, a fin de realizar nuevos estudios

El propósito de la toma de muestra es realizar el estudio:

POLIMORFISMOS EN EL GEN RECEPTOR DE VITAMINA D EN UN GRUPO DE PACIENTES MEXICANOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 1

así como estudios genéticos de tipo poblacional, siempre y cuando se mantenga la confidencialidad de mis datos personales.

Entiendo que el procedimiento descrito en el primer párrafo, puede implicar cierta molestia en el sitio de punción para la extracción de sangre.

En caso de algún daño físico resultante de la investigación, el CIBO-IMSS no estará obligado a ofrecer compensación económica ni a absorber los costos del tratamiento médico. No obstante, las facilidades necesarias, tratamientos de emergencia y servicios profesionales estarán disponibles en todo momento, tal como lo están para la comunidad en general.

Mi firma en este documento, manifiesta mi participación voluntaria en este proyecto de investigación. Tal participación no libera a los investigadores, la institución y agencias patrocinadoras de su responsabilidad ética para conmigo.

La información anterior me fue explicada por la Dra. en C. Lucila Sandoval y el Dr. Luis Eduardo Figuera V. Entiendo que ellos contestarán a cualquier pregunta que yo pueda tener en relación con las pruebas a realizarse y los puedo localizar en el teléfono (01-33) 3 668 3000, extensiones 31929 y 31930.

Entiendo que mi participación en esta investigación puede terminar en cualquier momento sin que perjudique mi futura atención. La confidencialidad de los datos será mantenida dentro de los límites legales.

Lugar _____ Fecha _____

Nombre de quien toma la muestra

Nombre y firma de la persona

Testigo

ANEXO II

CONDICIONES DE LA AMPLIFICACIÓN POR PCR PARA CADA REGIÓN

Sitio polimórfico *FokI*

Reactivo	Concentración stock	Concentración final	Volumen (μl)
Agua			20.4
Amortiguador	10X	1X	2.5
Iniciadores	5 pmol/ μl	0.1 μM	0.5
dNTP's	2.5 mM	0.1 mM	1
MgCl ₂	50 mM	0.5 mM	0.25
Taq pol.	5 U/L	1 U	0.1
DNA	50 ng/μl	0.5 μl	1
Volumen final			25.75 μl

Sitio polimórfico *BsmI*

Reactivo	Concentración stock	Concentración final	Volumen (μl)
Agua			8.42
Amortiguador	10X	1X	1.5
Iniciadores	5 pmol/ μl	0.1 μM	1
dNTP's	2.5 mM	0.1 mM	0.25
MgCl ₂	50 mM	0.5 mM	0.38
Taq pol.	5 U/L	1 U	0.2
DNA	50 ng/μl	0.5 μl	11.5
Volumen final			12.5 μl

Sitio polimórfico *TaqI*

Reactivo	Concentración stock	Concentración final	Volumen (μl)
Agua			17.9
Amortiguador	10X	1X	2.5
Iniciadores	5 pmol/ μl	0.1 μM	1
dNTP's	2.5 mM	0.1 mM	0.5
MgCl ₂	50 mM	0.5 mM	1
Taq pol.	5 U/L	1 U	0.1
DNA	50 ng/μl	0.5 μl	1
Volumen final			24 μl

CONDICIONES DE DIGESTIÓN DEL PRODUCTO DE PCR DE CADA REGIÓN

1. Enzima utilizada: *FokI*

Marca: New England Biolabs

Amortiguador 10X: NEBuffer 4

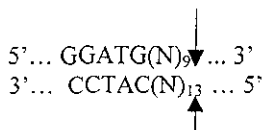
Concentración: 4 U/ μ l

Temperatura: 37° C

Tiempo: 2 h

Fragmento esperado: 175 y 85 pb

Inactivar: a 65° C por 20 min



Condiciones

Agua: 5.5 μ l, Amortiguador 0.1 μ l

Enzima 0.4 μ l,

Amplificado 4 μ l

Volumen total: 10 μ l

2. Enzima utilizada: *BsmI*

Marca: New England Biolabs

Amortiguador 10X: NEBuffer2

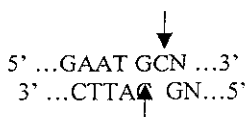
Concentración: 10 U/ μ l

Temperatura: 65° C

Tiempo: Toda la noche

Fragmento esperado: 500 y 100 pb

Inactivar: a 80° C por 20 min



Condiciones

Agua: 14.35 μ l, Amortiguador 0.25 μ l

Enzima 0.4 μ l, Amplificado 10 μ l

Volumen total: 25 μ l

3. Enzima utilizada: *TaqI*

Marca: New England Biolabs

Amortiguador 10X: NEBuffer3

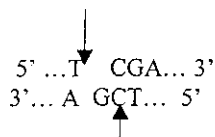
Concentración: 20 U/ μ l

Temperatura: 65° C

Tiempo: 2 h

Fragmento esperado: 280 y 200 pb

Inactivar: a 80° C por 20 min



Condiciones

Agua: 2.8 μ l, Amortiguador 0.1 μ l

Enzima 0.1 μ l, BSA 100X 1.0 μ l

Amplificado 6 μ l

Volumen total 10 μ l

II. Condiciones de electroforesis

gel: 29:1 (6%) Bis-acrilamida

V: 250

Tiempo: 2 h

ANEXO III

EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO A PARTIR DE SANGRE COMPLETA POR MÉTODO DE CTAB / DTAB (MICROMÉTODO) Gustincich y cols, 1991.

1. Tomar 300 μ l de sangre periférica (con EDTA, como anticoagulante), y colocarla en microtubo de 1.5 ml estéril, agregar 600 μ l de sol. DTAB, mezclar suavemente
2. Incubar a 65-68 °C por 5 min
3. Retirar de la incubación e inmediatamente agregar 550 μ l de cloroformo, tapar y agitar vigorosamente durante 5 min
4. Centrifugar a 13,000 rpm durante 10 min
5. Pasar el sobrenadante a un micro tubo de 1.5 ml, agregar 100 μ l de sol. CTAB, y agregar 750 μ l de agua ultra pura estéril (de ampolleta). Mezclar suavemente por inversión
6. Centrifugar a 10,000 rpm durante 5 min
7. Descantar el sobrenadante y agregar 200 μ l de sol. NaCl 1.2 M. más 1 ml de etanol absoluto frío, mezclar suavemente
8. Centrifugar a 10,000 rpm durante 5 min
9. Eliminar el sobrenadante y lavar el botón dos veces con etanol al 70%
10. Centrifugar a 10,000 rpm aproximadamente por 5 min
11. Decantar el sobrenadante y secar el botón
12. Resuspender el DNA en solución tampón TE (Tris Hcl 10 mM, EDTA 0.2 mM, pH 7.5)
13. Agitar suavemente y refrigerar a 4°C hasta su procesamiento
14. Determinar la calidad y cantidad del DNA por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa al 0.6%

NOTA: Checar que el baño este a 65-68 °C, poner el etanol a enfriar y guardar la sol. CTAB temperatura ambiente

EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO A PARTIR DE SANGRE PERIFERICA COMPLETA POR MÉTODO DE (MACROMÉTODO) Miller y cols, 1988.

Obtención del botón de leucocitos:

1. Se toman de 5 a 10 ml de sangre periférica, en un tubo con anticoagulante y se colocan en un tubo de polipropileno de 50 ml
2. Agregar 30 ml (aprox.) de solución de tampón de lisis ($\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 9:1) y equilibrar en peso por pares de tubos
3. La mezcla se refrigera a 4°C por 10 min. para ayudar a la lisis de eritrocitos
4. Centrifugar a 3,900 rpm por 15 min
5. Decantar y lavar 3 veces con tampón de lisis
5. Volver a centrifugar y repetir los lavados por dos veces, hasta dejar blanco el botón

Extracción del DNA a partir del botón de leucocitos:

7. El botón limpio, se resuspende en 3 ml de solución tampón de lisis (Tris HCl 10 mM, NaCl 400 mM, EDTA Na_2 2 mM, pH 8.2)
3. El aislado de leucocitos se deja en digestión toda la noche a 37°C (12, 24 ó 48 h) con 0.2 ml de SDS 10%, 0.5 ml de solución proteinasa K (1 mg/ de proteinasa K en SDS 1% y EDTA Na_2 2 mM)
9. Adicionar 1 ml de solución saturada de NaCl (6 M)
0. Agitar vigorosamente por 15 segundos en vortex
1. Centrifugar a 3900 rpm por 15 min
2. Pasar el sobrenadante (sin tomar la sal), a un tubo de propileno de 15 ml que contenga 10 ml aprox. de etanol frío al 100%. Invertir hasta lograr la precipitación del DNA
3. Transferir ahora el DNA precipitado a un microtubo de 1.5 ml y lavarlo 2 veces con etanol 70 % frío. Se deja evaporar el etanol del DNA limpio
4. Disolver el DNA en solución tampón TE (Tris Hcl 10 mM, EDTA 0.2 mM, pH 7.5) por 2 h 37°C

ANEXO IV

DESCRIPCIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES

Extracción del DNA

Comúnmente se utilizan detergentes y solventes orgánicos que rompen las cadenas de DNA, seguidas por la precipitación de éste con sales y alcoholes. De esta manera son utilizados en la amplificación *In Vitro* de (PCR).

Cuantificación del DNA

Nos ayuda a medir las concentraciones del DNA por medio de un espectrofotómetro, en densidad óptica (D.O) de 260 nm y 280 nm, el valor de D.O 260/280 nm, debe de ser entre 1.8 y 2.0 para considerarse como satisfactoria.

Pureza del DNA

La electroforesis en geles de agarosa es una técnica analítica de separación de macromoléculas, a través de una corriente eléctrica moviliza al DNA separando las moléculas del DNA de acuerdo a su tamaño. La presencia de una banda nítida es indicativo que el DNA tiene una pureza adecuada, si se observa un barrido indica contaminación por sales y degradación del DNA.

Amplificación por PCR

Técnica por la cual se obtienen copias múltiples de moléculas de DNA relativamente cortas. La separación es dada por tres pasos: Desnaturalización, Hibridación y Enlongación.

Digestión con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción son proteínas que cortan a las moléculas del DNA en sitio específicos.

Geles de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida son los más utilizados ya que es químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparada de forma rápida y reproducible. Forma, además, geles insolubles en agua, y que permiten buena visualización de las bandas durante tiempo prolongado.

Electroforesis

La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico, estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos - y +), en dependencia de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional.

ANEXO V

PROCEDIMIENTOS UTILIZADOS

PROCEDIMIENTO PARA CUANTIFICAR DNA:

1. Encender el espectro y limpiar la celdilla
2. Verificar que el aparato este listo para leer (Factor 50)
3. Poner 1000 μ l de agua destilada en la celdilla
4. Añadir 5 μ l de la muestra de DNA, a la celdilla de cuarzo
5. Tapar con papel parafilm e invertir 2 o 3 veces para mezclar
6. Registrar el valor de absorbancia, relación y concentración
7. Limpiar la celdilla terminado de medir

TINCIÓN DE GELES CON NITRATO DE PLATA

PROTOCOLO:

1. Fijación (pre-tinción) en solución fijadora (etanol 10% y ácido acético 0.5%) por 5 min. agitación suave
2. Tinción con AgNO_3 al 0.2% disuelta en solución fijadora y de preferencia preparada en el momento, por 5 minutos, agitación suave y eliminar
3. Lavar con agua bidestilada por 20 seg, cambiar y otra vez por 2 min
4. Agregar solución reveladora (NaOH al 30% y formaldehído al 0.5%) hasta la aparición de bandas amarillas, agitación suave. (10-15 min), y eliminar
5. Enjuague con solución fijadora por 5 min y después con agua durante 10 min
6. Guardar el gel, sobre un papel filtro, y cubrir con una bolsa de plástico

ANEXO VI

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y REACTIVOS

PREPARACIÓN

Solución Fijadora 1 litro
Etanol 10% 100 ml
Ácido acético 0.5% 5 ml
Aforar a un litro con agua bidestilada

Solución de Nitrato de Plata
 AgNO_3 0.2 g
Aforar a 100 ml con solución fijadora

Solución Reveladora 1 litro
NaOH 3% 30 g
Formaldehído 0.5% 5 ml
Aforar a un litro con agua bidestilada

TBE 10X

PESAR

	500 ml	1 litro
1. Trizma Base	53.889 g	157.7 g
2. EDTA	4.65 g	9.3 g
3. Ácido Bórico	27.51 g	55.02 g
4. Agua bidestilada	500 ml	1000 ml

PREPARACIÓN TBE 10X

Se pesa cada reactivo, se coloca 300 ml de agua bidestilada para 500 ml, en un vaso de precipitado de 500 ml, con un agitador magnético, cada reactivo es agregado para disolverse, na vez disuelto se coloca el otro reactivo. Al terminar se afora a la cantidad deseada

DTAB 8 % (Bromuro de deciltrimetilamonio)

1. Tris	0.1 M, pH 8.6	3 g
2. NaCl	1.5 M	17.55 g
3. EDTA	50 M	4.653 g
4. DTAB 8%		8 g /0.1 L

Disolver el Tris y ajustar a pH 8.6 con HCl en $\frac{1}{4}$ del volumen final, adicionar el DTAB, el NaCl, aforar y esterilizar con autoclave

Solución tampón de CTAB 5% (Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio)

1. (CTAB) 5% (5g/0.1 L)
2. NaCl 0.4 M (2.34 g/0.1 L)

Aforar a 50 ml de agua bidestilada estéril

Solución de NaCl 1.2 M

1. NaCl 1.2 M (7 g/0.1 L)

Disolver la sal en agua bidestilada estéril y aforar a 100 ml

Colorante JA6X (Azul de bromofenol-xilencianol)

Glicerol 7 ml

Azul de bromofenol 0.006 g

Xilencianol 0.006 g

Disolver en 3 ml de agua y mezclar

Solución TE

1. Tris base 0.06005 g/50 ml
2. EDTA 0.0186 g/50 ml

Disolver el tris y ajustar a pH de 7.5 con HCl en $\frac{1}{4}$ del volumen final, adicionar el EDTA, aforar y esterilizar con autoclave

Solución tampón de lisis

Cloruro de amonio (NH_4Cl) de 15.405 g

Aforar a 2 litros con agua bidestilada estéril

Eliminar 200 ml

Pesar 0.158 g de Bicarbonato de amonio ($\text{NH}_4 (\text{O}_3)$)

Aforar a 200 ml de la solución de cloruro de amonio

Solución B tampón de Miller

Tris Base 0.6055 g (pH 7.5)

NaCl 11.688 g

EDTA 0.3722 g (pH 0.3722)

Pesar todo en ese orden y disolver uno por uno

Ajustar a pH 8.2

Vaciar a Matraz de 1000 ml, esterilizar

Vaciar y aforar a 500 ml con agua estéril

Solución de proteinasa K (1 mg/50 µl)

1. Proteinasa K 5 mg/ml (50 mg)

2. SDS 5% (0.5 g)

EDTA 0.0007 M (0.0372 g/ 50 ml)

Gel de Agarosa al 0.6%

Pesar 0.6 g de agarosa

Poner en un matraz de 250 ml

Agregar 70 ml de solución TBE 1X

Poner 5 µl de jugo azul 6X

Acomodar las muestras de izquierda a derecha

Correr las muestras a 60 V, por 2 h

Gel de Bis-Acrilamida (29:1) al 6%

Agua destilada 35 ml

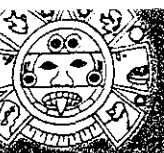
TBE 10X 5 ml

Bis-Acrilamida 10 ml

Persulfato de amonio 1000 ml

TEMED 5 µl

Se coloca en un tubo de 50 ml se agita rápidamente, y se vacía a la cámara electroforética, ya preparada y se coloca el peine correspondiente. El gel se pre-corre a 250 V por 10 min, antes de colocar la muestras, una vez colocadas las muestras de DNA, con 5 ml de jugo azul 6X, se deja a 250 V por 2 h



ASOCIACIÓN MEXICANA
DE GENÉTICA HUMANA, A.C.

**ASOCIACIÓN MEXICANA
DE GENÉTICA HUMANA, A. C.**



GOBIERNO DE NUEVO LEÓN
ESTADO DE PROGRESO

**XXX CONGRESO NACIONAL DE GENÉTICA HUMANA
Monterrey, Nuevo León, México**

**Del 16 al 19 de
Noviembre de 2005**

Impacto del Conocimiento del Genoma Humano en la Sociedad



PO4. POLIMORFISMOS EN EL GEN RECEPTOR DE VITAMINA D EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO I DEL NOROCCIDENTE DE MEXICO.

Rosalba Castellón Gil, Juan Manuel Oliva, Miguel Escalante, Tereza Muñoz Magallanes, Ingrid P Dávalos, Luis Figuera, Lucila Sandoval Ramírez.

Doctorado en Genética Humana, Universidad de Guadalajara, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, División de Genética, Guadalajara, Jalisco, C.P 44340, México. Email: rosalba_gil@hotmail.com

Palabras clave: Diabetes mellitus tipo I, gen *VDR*

Antecedentes: La diabetes mellitus tipo I (DM1) es una enfermedad autoinmune, caracterizada por la destrucción de células beta. En México la incidencia es 0.6 por 100,000 habitantes (1). En un estudio realizado en ratones diabéticos obesos (NOD) se demostró que el tratamiento con vitamina D impide el desarrollo de diabetes mellitus tipo I. El receptor de la vitamina D es un receptor nuclear que pertenece a la familia de los receptores de esteroide, tiene dos dominios uno de unión a vitamina D y otro que se une al ADN. El codón 352 del exón 9 de este gen es polimórfico y puede existir como ATC o ATT, siendo el primero (ATC, alelo "t") un sitio de reconocimiento para la enzima *TaqI*, mientras que con el cambio C → T (ATT, alelo "t") se pierde el sitio de restricción. Aquellos individuos que son homocigotos para el alelo "t" muestran un metabolismo activo de la vitamina D en suero. En un estudio realizado en población taiwanesa concluyeron que el genotipo "3" confiere mayor riesgo para desarrollar la enfermedad. En el sur de la India se encontró una transmisión del alelo b afectado por DM1 (3). En otro estudio en población india sugieren que el haplotipo "Bat" puede estar asociado a DM1 (4).

Objetivo: Identificar si existe asociación de los polimorfismos *BsmI*, *TaqI* y *FokI* del gen *VDR* en pacientes con DM1.

Materiales: Muestra de ADN obtenidas de sangre periférica de 33 pacientes con DM1, según diagnóstico de la Asociación Americana de Diabetes (ADA) y 33 controles del Banco de Sangre (CMNO, IMSS).

Metodología: Para ambos grupos se genotificaron los polimorfismos, *BsmI*, *TaqI* y *FokI* del gen *VDR*, mediante PCR-RFLP.

Resultados:

Cuadro 1. Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos de estudio en pacientes con DM1

Paciente	Frecuencias genotípicas					Frecuencias alélicas				
	bb	BB	Bb	B	b	tt	TT	Tt	T	t
Genotipo	0.636	0.121	0.243	0.292	0.70	0.091	0.606	0.303	0.559	0.16
%	63.6	12.1	24.2	29.2	70.7	9.1	60.6	30.3	55.9	16.9
	tt	TT	Tt	T	t	0.364	0.303	0.333	0.47	0.522
%	36.4	30.3	33.3	47.7	52.2	36.4	30.3	33.3	47.7	52.2

Controles	Frecuencias genotípicas					Frecuencias alélicas				
	bb	BB	Bb	B	b	tt	TT	Tt	T	t
Genotipo	0.333	0	0.667	0.40	0.60	0.030	0.667	0.303	0.524	0.18
%	33.3	0	66.7	40	60	3.03	66.7	30.30	52.40	18
	tt	TT	Tt	T	t	0	0.242	0.75	0.568	0.431
%	0	24.2	75.75	56.8	43.1	0	24.2	75.75	56.8	43.1

Cuadro 2. Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos en controles.

Conclusiones: No hubo diferencias estadísticamente significativas que sustenten la asociación de estos polimorfismos en nuestra población de estudio.

Bibliografía:

1. Karvonen M, Tuomilehto J & Libman I, Laporte R, 1993. For the WHO DIAMOND protect group. A review of the recent epidemiological data on the worldwide incidence of type I (insulin dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 36:883-892
2. Atkinson M A, Leiter EH, 1999. The NOD mouse model of type I diabetes: as good as it gets? *Nat. Med.* 5:601-604
3. McDermott M.F, Ramachandran A, Ogunkolade BW, Aganna E, Curtis D, Boucher BJ, Snehalatha C, Hitman GA, 1997. Allelic variation in the vitamin D receptor. Influence susceptibility to IDDM in Indian Asians. *Diabetologia* 28: 971-975
4. Pani MA, Knapp M, Donner H, Braun J, Baur MP, Usadei KH, and Badenhop K, 2000. Vitamin D receptor allele combinations influence genetics susceptibility to type I Diabetes in Germans. *Diabetes Vol.* 49.