



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**EVALUACION DE LAS VARIANTES: T130I DEL GEN
HNF4 α , G319S Y G574S DEL GEN HNF1 α EN
PERSONAS DE LA ETNIA SARAGURO – ECUADOR.**

Previo a la obtención del título
de Bioquímico Farmacéutico

AUTORA:

Andrea Karina Tamayo Guamán

DIRECTORA:

BQ. Ana Paulina Arévalo Jaramillo

Loja- Ecuador
2011

CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHO DE TESIS

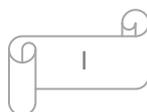
Yo, Andrea Karina Tamayo Guamán declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

Andrea Karina Tamayo Guamán.

TESISTA

Bq. Ana Paulina Arévalo Jaramillo

DIRECTORA DE TESIS



Bq.

Ana Paulina Arévalo Jaramillo

DIRECTORA DE TESIS

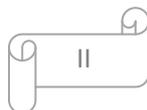
CERTIFICA:

Que una vez revisado el proyecto de investigación efectuado por la Srta. Andrea Karina Tamayo Guamán, previo a la obtención del Título de BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO, se autoriza su presentación final para la evaluación correspondiente.

Loja, Febrero 2011

Bq. Ana Paulina Arévalo Jaramillo

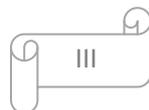
DIRECTORA



AUTORÍA

Las ideas, conceptos y resultados vertidos en el desarrollo del presente trabajo de investigación son de absoluta responsabilidad de su autora.

Andrea Karina Tamayo Guamán.



AGRADECIMIENTO.

Expreso mi gratitud:

A la Universidad Técnica Particular de Loja que por medio del Centro de Biología Celular y Molecular y la Escuela de Bioquímica y Farmacia me ha dado la oportunidad de formarme y preparar la presente investigación.

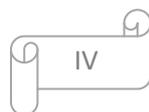
A mi padre Pedro Tamayo por su apoyo moral y económico durante mi carrera universitaria.

A mis hermanos: Alex, John y Lender por estar siempre a mi lado, por escucharme y apoyarme en mis locuras.

A mis sobrinos: Steffen y Ashly que me alegraron los fines de semana con su dulzura y sus locuras durante la trayectoria de mi carrera.

A mi tutora Bq. Ana Paulina Arévalo Jaramillo ya que sus palabras y confianza me dieron la fuerza necesaria para lograr el termino de mi investigación.

Andrea Karina Tamayo Guamán



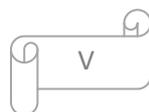
DEDICATORIA.

Este trabajo lo dedico:

A mis tres ángeles que siempre me dieron esa fuerza necesaria para superarme y seguir adelante.

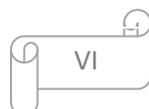
A mi madre Dra. Olga Guamán por apoyarme y estar siempre a mi lado en los buenos y malos momentos de mi vida.

Andrea Karina Tamayo Guamán



INDICE DE CONTENIDO.

Certificación de cesión de derechos	I
Certificación de autoría	II
Autoria	III
Agradecimiento	IV
Dedicatoria	V
Índice de Contenido	VI
Articulo Científico	X
Objetivos:	1
- General	
- Específicos	
1. Introducción	2
1.1. Factores Transcripcionales.	3
1.1.1. Factor nuclear de Hepatocitos 1 α (HNF1 α)	6
1.1.1.1. Polimorfismos G319S y G574S	8
1.1.2. Factor nuclear de Hepatocitos 4 α (HNF4 α)	9
1.1.2.1. Polimorfismo T130I	11
1.2. Pueblo indígena Saraguro del Ecuador	12
2. Materiales y Métodos	15
2.1. Población	15
2.2. Parámetros bioquímicos y antropométricos	15
2.3. Extracción de ADN.	16
2.4. Identificación de los polimorfismo	17
2.5. Análisis estadístico	17



3.	Resultados	19
3.1.	Características clínicas y antropométricas de la población Saraguro del Ecuador.	19
3.2.	Identificación del polimorfismo T130I del gen HNF-4 α	19
3.2.1.	Frecuencia alélica y genotípica de T130I	20
3.2.2.	Asociación de T130I con los diferentes parámetros bioquímicos y antropométricos.	21
3.2.3.	Asociación de T130I con obesidad y síndrome metabólico.	22
3.3.	Identificación de los polimorfismos G319S y G574S en el gen HNF-1 α	23
3.3.1.	Frecuencias alélica y genotípica de G319S y G574S	23
4.	Análisis	25
5.	Conclusiones	27
6.	Recomendaciones	28
7.	Anexos	29
8.	Bibliografía	30

INDICE DE TABLAS:

Tabla 1. Criterios de la ATP-III para el síndrome metabólico.	16
Tabla 2. Primers usados y temperatura de anillamiento (T _m)	17
Tabla 3. Parámetros clínicos y antropométricos de la población indígena Saraguro del Ecuador.	19
Tabla 4. Frecuencia genotípica de la variante T130I en la población indígena Saraguro del Ecuador.	20
Tabla 5. Frecuencia alélica de la variante T130I en la población indígena Saraguro del Ecuador	20
Tabla 6. Comparación de los parámetros bioquímicos y antropométricos en la población Saraguro del Ecuador según la presencia de la variante T130I del gen HNF4 α .	21
Tabla 7. Comparación de los parámetros bioquímicos y antropométricos en la población Saraguro del Ecuador según la presencia de la variante T130I del gen HNF4 α y la región de procedencia	22
Tabla 8. Asociación de T130I con obesidad y síndrome metabólico.	22
Tabla 9. Frecuencia genotípica de las variantes G319S y G574S en la población indígena Saraguro del Ecuador.	23
Tabla 10. Frecuencia alélica de las variantes G319S y G574S en la población indígena Saraguro del Ecuador	24

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Estructura básica de la superfamilia de los receptores nucleares.	3
Figura 2. Función de los factores de transcripción, Punto de iniciación de la transcripción (P.I.T)	5
Figura 3. Representación esquemática de la estructura proteica de HNF1 α , y sus respectivos dominios funcionales.	6
Figura 4. Dominios estructurales de HNF4 α .	10
Figura 5. Variante T130I ubicado en el dominio de union del DNA	12
Figura N° 6. Electroferograma de un individuo heterocigoto para la variante T130I.	20
Figura N° 7 Electroferograma de un individuo homocigoto para el alelo silvestre del SNP G319S.	23
Figura N° 8. Electroferograma de un individuo homocigoto para el alelo silvestre del SNP G574S.	23

EVALUATION OF THE HNF1a-G319S, HNF1a-G574S AND HNF4a-T130I VARIANTS IN PEOPLE OF ETHNIC SARAGURO – ECUADOR

Andrea K. Tamayo Guaman^{1*} y Ana P. Arévalo Jaramillo¹

¹Centro de Biología Celular y Molecular, Universidad Técnica Particular de Loja. S/N San Cayetano Alto, Loja - Ecuador

^{1*} aktamayo@utpl.edu.ec

ABSTRACT

Transcription factors play an important role in regulating gene expression; HNF1 α and HNF4 α belong to this super family. Diverse polymorphisms have been reported for these transcription factors associated with different clinical conditions. G319S and G574S variants of HNF1 α have been associated with diabetes, low insulin levels and changes in BMI. The T130I variant of HNF4 α is associated with DT2 and low HDL levels. The objective of this project was to identify the presence and frequency of the polymorphisms G319S, G574S and T130I in the indigenous population of Ecuador, and relate these variants with biochemical and anthropometric parameters for this purpose, we determined the presence of these genetic variants in a group of 103 subjects of Saraguro population from Ecuador. We found T130I variant in our population with a frequency of 35.9%. The HNF4a T130I variant showed association with low HDL levels in people of the Sierra region ($p=0.007$), this association was not maintained in the general population. The decrease in HDL levels only for this region could be due to the characteristic polygenic and multifactorial of HDL phenotype. G319S and G574S polymorphisms in the Saraguro population are absent, probably is due to the origin of this Ecuador indigenous group.

KEYWORDS: SNP, transcription factors, HNF1a, HNF4a, DT2, HDL.

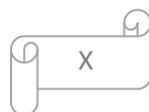
INTRODUCTION

The transcription factors play an important role in regulating gene expression. Currently known 50 proteins belonging to this superfamily gene, including hepatocyte nuclear factor 1 alpha (HNF1 α) and hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4 α). (Hernández J. *et.al* 2009)

Different polymorphisms have been reported in HNF1 α gene related to diabetes type 2 (DT2). The G319S variant was reported in the Oji-Cree population, in people with DT2, the G574S variant was identified in diabetic patients of african descent. (Navalón K. *et.al* 2006 and Triggs B. *et.al.* 2002)

The T130I variant of the HNF4 α gene affects a residue of the DNA binding region and is associated with DT2 and low HDL levels, it has been reported in japanese and mexican population (Menjivar M. *et al* 2008, Rodriguez A . *et.al.* 2006 and Zhu Q. *et al* 2003)

Due to the limited information about the genetic component of the Ecuadorian population and the increase of diseases such as DT2, metabolic syndrome and obesity, it is transcendental importance of determining the presence of these polymorphisms, as their identification could guide prevention and treatment of these diseases.



Due of to the limited information about the genetic component of the Ecuadorian population and the increase of diseases such as DT2, metabolic syndrome and obesity, is transcendental importance determine the presence of these polymorphisms, as their identification could guide prevention and treatment of these diseases.

The objective of the present work was to determine the presence and frequency of the G319S, G574S and T130I polymorphisms in the Saraguro population from Ecuador and evaluate the association between these polymorphisms and anthropometric and biochemical parameters.

MATERIALS AND METHODS

Subjects: The study is composed of 103 individuals, pertaining to the Saraguro ethnic group (43 individuals corresponding to the sierra region and 60 to the eastern, regions where these communities are settled.) We took a blood sample in fasting for 8 - 12 hours; these samples were taken acceptance previous each participant by signing the informed consent.

The inclusion criteria were: to belong to the Saraguro ethnicity (based on their self-definition), not to be familiar in first degree of another participant of the study, and be a native of the place by reference to three generations ago.

Biochemical and anthropometric parameters: The biochemical tests were realised in the Laboratorio Clínico de la Unidad de Medicina Familiar of the UTPL; the serum glucose, total cholesterol, HDL, LDL and triglycerides were measured using the Cobas c111 team - Roche, glycosylated hemoglobin levels were determined

using commercial kit Glycohemoglobin HbA₁Test - HUMAN.

We determined the body mass index (BMI), waist / hip ratio (WHR), as indicated by the WHO. Individuals were classified according to BMI: normal weight (BMI of 18.50 to 25) or overweight / obese (BMI > 25). DT2 was diagnosed according to WHO criteria and SM according to the National Cholesterol Education Program Expert Committee on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III [ATP III]).

Identification of polymorphisms: The DNA extraction was performed from peripheral blood using the commercial kit DNA Purification – Promega

The segments of interest were amplified by PCR using specific primers, according to the conditions indicated in **Table 1**.

The PCR products were purified with Wizard SV Gel kit and PCR Clean-Up System (Promega) and were verified in agarose gel using 2% ethidium bromide.

The sequencing was realised Departamento de Medicina Genómica of Instituto de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubirán (Mexico) and the Centro de Biología Celular y Molecular de la Universidad Técnica Particular de Loja, using the ABI3500 Genetic Analyzer from Applied Biosystems.

Statistical Analysis: To analyze the results we used the SPSS v15.0. We calculated mean and standard deviation of different parameters, we calculated the genotypic and allelic frequencies, Hardy-Weinberg equilibrium was evaluated using the online resource of

the Institute of Human Genetics, Munich Germany (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). To evaluate the association between the variant and biochemical and anthropometric parameters were used General Linear Model Univariate and association analysis of polymorphisms with obesity and metabolic syndrome was performed using logistic regression after normalizing the data for blood pressure, glucose levels, TG, HDL and LDL. Was considered as statistical significance level $p < 0.05$.

RESULTS

The clinical and anthropometric characteristics of the 103 subjects studied are shown in **Table 2**.

The Saraguro population present almost all anthropometric and biochemical parameters within normal values except triglyceride levels and BMI, which are lightly increased.

In the study group was identified the presence of the T130I polymorphism, the genotype frequencies found are shown in **Table 3**. The allelic frequency for the variant is 0.189 (Table 4).

The observed frequencies of genotypes CC, CT and TT of the T130I are in Hardy-Weinberg equilibrium.

By the analysis of association between the variant T130I and the different anthropometric and biochemical traits not observed any statistically significant association (**Table 5**). However, when evaluating the data by region of origin, was found association between the genotype CT / TT of T130I and low HDL levels ($p = 0.007$) in the sierra region (**Table 6**). This association was performed using the dominant model,

considering the BMI, sex and age as covariates.

G574S and G319S variants of HNF1 α are absent in the population sampled, all individuals carry the wild type allele.

DISCUSSION

HNF4 α is a member of the family of nuclear receptors; it regulates the pancreatic islet insulin secretion in response to glucose, play an important role in the regulation of this and lipid metabolism. (Mejivar M. *et.al* 2008 and Rodriguez A. *et.al*. 2006)

To date, 20 variants have been described for exon 4 of HNF4 α , among which is the T130I variant, which is a change that affects a residue of the DNA binding region. This polymorphism has been reported in the Danish population, Japanese and Mexican, with a frequency of 4.7, 1.7 and 8% respectively. Also this variant was associated with DT2 and low HDL levels. (Mejivar M. *et.al* 2008, Rodriguez A. *et.al* 2006 and Zhu Q. *et.al*. 2003)

In the present it was study found that the T130I polymorphism in the Saraguro population has an allelic frequency of 18.9% (**Table 4**), being the highest among those mentioned above.

T130I was associated with low HDL levels in individuals from the Sierra region ($p = 0.007$) (**Table 6**), however this association did not continue to perform the analysis with the general population ($p = 0.72$). The decrease in HDL levels only in the sierra region could be due to the influence of environmental factors and lifestyle different between the two regions, since the phenotypic variability of HDL is a multifactorial and polygenic effect. (Andrade F. *et.al*. 2010, Cerrano A. *et.al* 2004 and CONAIE)

Different polymorphisms have been reported for the HNF1 α among which are: G319S, reported in the Oji-Cree population by Triggs B. *et.al.* 2002, it has an allelic frequency of 0.09. This variant has been found in closed populations and has been associated with DT2. (L. Harries *et al* 2008)

The G574S variant has an effect on HNF1 α transactivation potential on the insulin gene in pancreatic β cells, is considered a susceptibility allele for diabetes. This polymorphism has not been reported in European and Asian populations, appears to be specific for populations of African descent. (Navalón K. *et.al.* 2006)

In the indigenous population of Ecuador Saraguro G319S and G574S variants are absent.

The G319S variant has been reported only in Oji-Cree people of Canada, this is a closed community (Menjívar M *et.al.* 2008), so that changes in population size occur only as a result of births and deaths because this community does not

have a current immigration or emigration, this characteristic could explain the absence of this variant in other populations.

According to the theories about the origin of Saraguros of Ecuador, this indigenous group is credited with being descended of mitmacunas or mitimaes (Cuzco-Peru), another hypothesis is that Saraguros originated in Bolivia, based mainly on the cultural similarities with Paquizhapas. (CONAIE, INEC and Muyancela M. *et.al.* 1995). Based on this hypothesis is discarded the contribution of African genetics component for this population, reducing the probability of genetic polymorphisms of African descent as G574S.

ACKNOWLEDGEMENTS.

I thank the people of the indigenous community Saraguro for their cooperation. To the instituto de Ciencias Medicas Nutrición Salvador Zubiran - Mexico for technical assistance and the Centro de Biología Celular y Molecular (CBCM) of the Universidad Técnica Particular de Loja by technical and financial support.

Table 1. Primers and annealing temperature (Tm)

SNP	Gene	Exon	Primer	Tm	Size
T130I rs1800961	HNF4 α	4	F: 5'CCCTCATTCCACATGCTGATG-3' R: 5'CCCTCATTCCACATGCTGATG3'	63°C	401
G319S	HNF1 α	9	F: 5'GGCTATTTCTGCAGGGCGGAA 3' R: 5'GGGGTTAATTGTGGTGGATGGA 3'	63°C	481
G574S rs119305	HNF1 α	4	F: 5'CCAAGCAGGTAAGGTCCAGG-3' R: 5'CACAGTGACGGACAGCAACAG3'	63°C	334

Table 2. Clinical and anthropometric parameters of the Saraguro population.

Parameters	General Population		Reference Values
	(n=103)		
	Means	S.E.	
Age	40,31	17,5	
BMI(Kg/m2)	25,8	3,8	<25*
Waist (cm)	M: 83,15 W: 84,78	M: 8,16 W: 10,4	<102males <88women **
WHI	M: 0,88 W: 0,85	M: 0,06 W: 0,07	<1 males <0,85women**
SBP (mmHg)	115,17	24,2	120/80.*
DBP (mmHg)	74,6	12,2	
Glucose (mg/dl)	79,9	11,7	70-100 **
TG (mg/dl)	152,4	109,5	<150**
TC (mg/dl)	171,23	38,24	<200**
HDL (mg/dl)	M: 43,8 W: 42,87	M: 12,5 W: 11,96	30 -70 males**** 30 -90 women****
LDL (mg/dl)	96,8	28,2	<100**
HbA1c (%)	5,56	0,99	<5,7***

BMI = body mass index, IWH = Waist-Hip index, SBP = Systolic blood pressure, DBP = Diastolic blood pressure, TG = Triglycerides, TC = Total cholesterol, HDL = high density lipoprotein, LDL = Low density lipoprotein, HbA1c = glycosylated hemoglobin, W= Women, M= Males. Reference values (* WHO, **ATP-III, *** ADA,**** Interpretacion clínica del laboratorio)

Table 3. Genotypic frequency of the T130I variant of the population Saraguro of Ecuador

Genotype	Nº Subjects	Genotypic Frequency
CC	66	0.641
CT	35	0.34
TT	2	0.019
TOTAL	103	1

Table 4. Allele frequency of the T130I variant of the population Saraguro of Ecuador

Allele	Nº Allele	Allelic Frequency
C	167	0.811
T	39	0.189
TOTAL	206	1.000

Table 5. Comparison of biochemical and anthropometric parameters according to the presence of the T130I variant.

Parameters	Genotype		<i>p</i>
	C130C	C130T/T130T	
N	66	37	
BMI (kg/m²)	25.5 ± 3.4	26.3 ± 4.4	0.20
Waist (cm)	83.5 ± 9.3	85.8 ± 10.7	0.72
WHI	0.85 ± 0.07	0.88 ± 0.7	0.35
Systolic BP (mmHg)	114.1 ± 25.6	117.0 ± 21.6	0.27
Diastolic BP mmHg)	74.0 ± 11.0	75.6 ± 14.19	0.55
Glucose (mg/dl)	79.3 ± 11.0	80.8 ± 12.9	0.45
Triglycerides (mg/dl)	143.7 ± 108.2	167.9 ± 108.7	0.33
Cholesterol (mg/dl)	173.9 ± 35.8	166.3 ± 42.3	0.18
HDL (mg/dl)	44.9 ± 11.6	39.7 ± 12.1	0.72
LDL (mg/dl)	98.9 ± 27.1	92.9 ± 29.9	0.33
Hba1c %	5.6 ± 0.96	5.3 ± 1.0	0.28

The data presented represent the mean and standard deviation (SD) of the different parameters analyzed according to genotype. BMI = body mass index, WHR = Waist - Hip ratio, BP = Blood Pressure, HDL = High Density Lipoprotein, LDL = Low-Density Lipoprotein, HbA1c = Glycated Hemoglobin. P value vs CC genotypes compared. CT through the GLM Univariate (statistical significance level $p < 0.05$).

Table 6. Comparison of biochemical and anthropometric parameters according to the presence of the T130I variant and the region of origin

Parameters	Sierra Region			Eastern Region		
	Genotype		<i>p</i>	Genotype		<i>p</i>
	C130C	C130T/T130T		C130C	C130T/T130T	
N	31	12		36	24	
BMI (kg/m ²)	25.9 ± 3.7	25.5 ± 3.5	0.38	25.4 ± 3.4	27.1 ± 4.8	0.05
Waist (cm)	81.1 ± 9.9	83.9 ± 11.6	0.54	86.7 ± 9.3	87.4 ± 10.5	0.94
WHI	0.82 ± 0.71	0.84 ± 0.7	0.62	0.86 ± 0.58	0.87 ± 0.7	0.77
Systolic BP (mmHg)	114.8 ± 13.2	113.4 ± 15.7	0.88	115.6 ± 37.2	120.0 ± 25.2	0.22
Diastolic BP mmHg)	74.2 ± 10.5	73.0 ± 12.16	0.98	75.4 ± 12.0	77.6 ± 15.8	0.65
Glucose (mg/dl)	77.6 ± 9.9	79.9 ± 14.3	0.62	81.2 ± 12.4	81.3 ± 12.9	0.94
Triglycerides (mg/dl)	148.0 ± 113.7	145.6 ± 60.0	0.72	138.7 ± 116.3	177.9 ± 131.5	0.61
Cholesterol (mg/dl)	181.6 ± 29.9	161.3 ± 47.4	0.05	170.1 ± 42.4	171.9 ± 39.5	0.92
HDL (mg/dl)	46.2 ± 12.0	36.4 ± 8.7	0.007	42.6 ± 11.3	42.1 ± 13.9	0.84
LDL (mg/dl)	103.1 ± 27.9	95.5 ± 30.5	0.46	99.6 ± 25.7	94.3 ± 29.4	0.74
Hba1c %	6.0 ± 0.94	5.5 ± 0.93	0.09	5.2 ± 0.86	5.3 ± 1.0	0.72

The data presented represent the mean and standard deviation (SD) of the different parameters analyzed according to genotype. BMI = body mass index, WHR = Waist - Hip ratio, BP = Blood Pressure, HDL = High Density Lipoprotein, LDL = Low-Density Lipoprotein, HbA1c = Glycated Hemoglobin. P value vs CC genotypes compared. CT through the GLM Univariate (statistical significance level $p < 0.05$).

REFERENCES

- Andrade F, Fiegenbaum M, Almeida S y Hutz M 2010 Influencia de combinaciones Genéticas en los Niveles de HDL-c en una Población del Sur del Brasil. Arq Bras Cardiol 95: 430 - 435
- Calderón M, Narváez N y Tenesaca D 2009 Impacto Socioeconómico de las Entidades Financieras socias de la Refse: Cooperativas Las Lagunas y Semilla del Progreso que apoyan al cantón Saraguro 2006 – 2007 Universidad Tecnica Particular de Loja. 42
- Cerrano A, Artieda M y Pocoví M 2004 Genes candidatos en las alteraciones del metabolismo de las HDL. Cardiovascular Risk Factors 13: 94 – 105.
- Cortés V, Quezada N, Rigotti A, Maiz A 2005 Nuevos receptores nucleares heterodiméricos: reguladores metabólicos con impacto en fisiopatología y su proyección terapéutica en dislipidemias y diabetes mellitas. Rev Méd Chile 133: 1483-1492
- Confederación de Nacionalidades Indígenas del Ecuador CONAIE. URL <http://www.conaie.org/>
- Ferrer J 2004. Diabetes autosómica dominante y defectos genéticos de reguladores transcripcionales .Cardiovascular Risk Factors 13: 209-218

- Guía informativa de regulación génica. 2008 URL <http://4electivo.blogspot.com/2008/09/guia-informativa-de-regulacion-genica.html>
- Grundy S, Becker D, Clark L, Cooper R, Denke M, Howard W, Hunninghake D, Illingworth R, Luepker R, McBride P, McKenney J, Pasternak R, Stone N y Horn L. 2002 Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) NIH Publication No. 02-5215
- Harries L, Sloman M, Sellers E, Hattersley A y Ellard S 2008 Diabetes Susceptibility in the Canadian Oji-Cree Population Is Moderated by Abnormal mRNA Processing of HNF1A G319S Transcripts DIABETES 57: 1978- 1982.
- Hegele R, Cao H, Harris S, Hanley A, Zinman B, Connelly P 200 The Private Hepatocyte Nuclear Factor-1 α G319S Variant Is Associated With Plasma Lipoprotein Variation in Canadian Oji-Cree Arterioscler Thromb Vasc Biol 20:217-222.
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos – Ecuador (INEC) URL <http://www.inec.gov.ec>
- Luco R. 2007 Funciones in vivo del regulador transcripcional HNF1 α (MODY3). Universidad de Barcelona. Facultad de Biología. Dpt de Bioquímica y Biología Molecular. Barcelona
- Muyancela M, Maldonado M, Chinkim L, Masaquiza J, Muñoz W, Macas F, Simbaña A, Tapuyo R, Tapuy B, Tenesaca P, Umajinga B, Vargas L, Villamil G y Yumbo A. 1995 Identidades Indias en el Ecuador contemporaneo. Gráficas Modelo 345- 346
- Navalón K, Mendoza L, Díaz M, Martínez M, Reyna H, A. Aguilar C, Riba L, Canizales S, Villarreal T, González A, Argueta V, Tusié M y Miliar A 2006 HNF-1 α G574S is a functional variant with decreased transactivation activity. Diabetic Medicine, 23:1295–1300
- Menjívar M, Granados MA, Montúfar I, Herrera M, Tusié MT, Canizales S, Aguilar CA y Ortiz MG 2008 High frequency of T130I mutation of HNF4A gene in Mexican patients with early-onset type 2 diabetes CLINICAL GENETICS 73: 185–187
- Organización Mundial de la Salud (OMS). URL <http://www.who.int>
- Nutricion Personalida 2010 Introducción a los receptores nucleares URL <http://nutricionpersonalizada.com/>
- Pollex R, Hanley A, Zinman B, Harris S, Khan S y Hegele R 2005 Synergism between mutant HNF1A and the metabolic syndrome in Oji-Cree Type 2 diabetes Diabetic medicine 22, 1510–1515
- Rodríguez A, Ortiz G, Menjívar M 2006 Evaluación del polimorfismo T130I del gen HNF-4 α como factor de riesgo de diabetes mellitua tipo 2 de inicio temprano en alumnos de la facultad de química de la UNAM Medigraphic Artemisa en Linea. 31:71
- Triggs B, Kirkpatrick R, Kelly S, Norquay L, Cattini P, Yamagata K , Hanley A, Zinman B, Harris S, Barrett P, y Hegele R 2002 HNF-1 α G319S, a transactivation-deficient mutant, is associated with altered dynamics of diabetes Honest in an Oji-Cree community PNAS 99: 4614–4619
- Vega M, Fernández C 2009 Factores transcripcionales en la célula β adulta Revista de Investigación Clínica. 61: 428-446

- Zhu Q, Yamagata K, Miura A , Shihara N, Horikawa Y, Takeda J, Miyagawa J y Matsuzawa Y. 2003 T130I mutation in HNF-4 α gene is a loss-of-function mutation in hepatocytes and is associated with late-onset Type 2 diabetes mellitus in Japanese subjects *Diabetologia* 46:567–573

OBJETIVOS:

GENERAL

- Identificar la presencia y calcular la frecuencia de las variantes: T130I del gen HNF4 α , G319S y G574S del gen HNF1 α en la población indígena Saraguro del Ecuador.

ESPECIFICOS

- Amplificar y secuenciar los exones: 4 y 9 del gen HNF1 α , y exón 4 del gen HNF4 α para identificar las variantes G319S, G574S y T130I respectivamente.
- Contrastar los resultados con los reportados en la literatura para otras poblaciones y buscar posibles asociaciones a distintos rasgos antropométricos y/o bioquímicos.

1. INTRODUCCION

Enfermedades como diabetes, obesidad, hipertensión, dislipidemias etc. tienen un origen multifactorial, es decir, surgen como resultado de la interacción de múltiples variantes genéticas y diversos factores ambientales, razón por la cual no siguen patrones hereditarios mendelianos y se les denomina enfermedades “complejas”.⁽¹⁾

El presente estudio se ha encaminado en la evaluación de variantes genéticas relacionadas con un mayor riesgo de desarrollar afecciones complejas como la diabetes tipo 2, síndrome metabólico y alteración a varios parámetros bioquímicos. La atención se ha concentrado en los polimorfismos de un solo nucleótido de sus siglas en inglés SNP, cuya frecuencia aproximada es de 1 en 1000 pb y representan el tipo de variación más abundante en las poblaciones humanas. Entre las variantes relacionados con estas afecciones encontramos: G319S y G574S del gen HNF1 α y T130I del gen HNF4 α , genes que codifican factores de transcripción implicados en el control de genes responsables del metabolismo celular.^(1,2,3,4)

Las variantes G319S y G574S han sido reportadas en personas indígenas de Canadá y población africana, estos polimorfismos estuvieron relacionados con la reducción en las concentraciones de colesterol total, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y apolipoproteína B, con la presencia de síndrome metabólico (SM) y diabetes tipo 2 (DT2). T130I del gen HNF4 α se ha reportado en población danesa, mexicana y japonesa, reportándose como un polimorfismo

¹ Hernández J, Martínez J, Valverde V 2009 Polimorfismos reguladores y su participación en la patogenia de enfermedades complejas en la era posgenómica. Salud pública de México 51: 455-462.

² Menjivar M, Granados MA, Montúfar I, Herrera M, Tusié MT, Canizales S, Aguilar CA y Ortiz MG 2008 High frequency of T130I mutation of HNF4A gene in Mexican patients with early-onset type 2 diabetes CLINICAL GENETICS 73: 185–187

³ Navalón K, Mendoza L, Díaz M, Martínez M, Reyna H, A. Aguilar C, Riba L, Canizales S, Villarreal T, González A, Argueta V, Tusié M y Miliar A 2006 HNF-1 α G574S is a functional variant with decreased transactivation activity. Diabetic Medicine, 23:1295–1300

⁴ Zhu Q, Yamagata K, Miura A, Shihara N, Horikawa Y, Takeda J, Miyagawa J y Matsuzawa Y. 2003 T130I mutation in HNF-4 α gene is a loss-of-function mutation in hepatocytes and is associated with late-onset Type 2 diabetes mellitus in Japanese subjects Diabetologia 46:567–573

de riesgo para DT2, y niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad (HDL).
(2,3,4,5)

1.1. FACTORES TRANSCRIPCIONALES

Los factores transcripcionales son receptores nucleares que juegan un importante rol en la regulación de la expresión génica. Actualmente se conocen 50 proteínas pertenecientes a esta superfamilia génica como el FOXO1, homeobox pancreático y duodenal 1 (PDX1), FOXA2, factor nuclear de hepatocitos 1 alfa (HNF1 α), factor nuclear de hepatocitos 4 alfa (HNF4 α) y muchos más.⁽⁶⁾

Todos los factores de transcripción poseen una notable similitud estructural entre sí, en la que se destacan los dominios: de unión al ADN, dominio de unión al ligando y el dominio de transactivación (Fig. 1), dominios que se encuentran distribuidos en las regiones N y C – terminal de la proteína.⁽⁶⁾

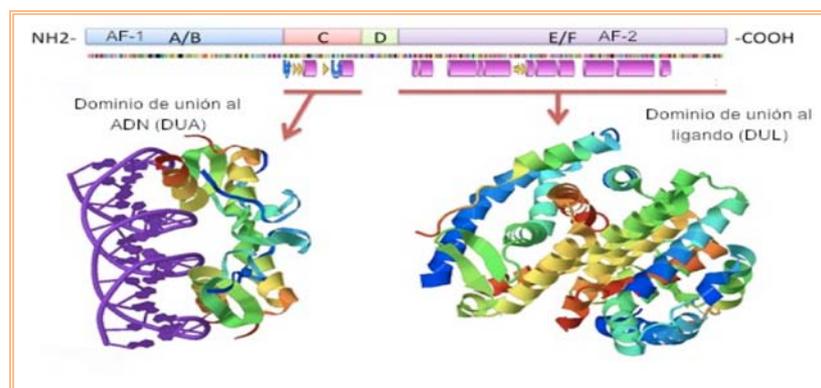


Figura 1. Estructura básica de la superfamilia de los receptores nucleares.⁽⁷⁾

Región N-terminal variable (A/B), es la más variable tanto en tamaño como en secuencia, y en muchos casos contiene un dominio de activación transcripcional conservada dependiente de ligando, denominado AF-1 y es

⁵ Triggs B, Kirkpatrick R, Kelly S, Norquay L, Cattini P, Yamagata K, Hanley A, Zinman B, Harris S, Barrett P, y Hegele R 2002 HNF-1 α G319S, a transactivation-deficient mutant, is associated with altered dynamics of diabetes in an Oji-Cree community PNAS 99: 4614–4619

⁶ Cortés V, Quezada N, Rigotti A, Maiz A 2005 Nuevos receptores nucleares heterodiméricos: reguladores metabólicos con impacto en fisiopatología y su proyección terapéutica en dislipidemias y diabetes mellitas. Rev Méd Chile 133: 1483-1492

⁷ Nutrición Personalizada 2010 Introducción a los receptores nucleares. URL <http://nutricionpersonalizada.com/>

objeto de fosforilación mediada por diferentes rutas de señalización y ésta modificación puede afectar significativamente la actividad transcripcional del factor de transcripción.⁽⁷⁾

El dominio conservado de unión a ADN (DUA) o región C (Fig.1) reconoce secuencias de ADN específicas en los genes diana.⁽⁷⁾

La región ligadora D no está bien conservada entre los diferentes receptores y sirve como una bisagra entre el dominio de unión al ADN (DUA) y el dominio de unión a ligando (DUL), permitiendo la rotación del DUA.⁽⁷⁾

La región conservada E contiene el dominio de unión a ligando (DUL), y una región C-terminal (F) de función desconocida. DUL es un dominio multifuncional que, además de unirse al ligando, media la homodimerización y la heterodimerización del factor de transcripción, la interacción con las proteínas de choque térmico, la actividad transcripcional dependiente de ligando y, en algunos casos, la represión transcripcional.⁽⁷⁾

Algunos receptores nucleares también tienen regiones requeridas para la activación transcripcional: el dominio de activación transcripcional conservada dependiente de ligando, llamado AF-2, localizado en la C-terminal del dominio de unión al ligando.⁽⁷⁾

Tal como se menciona anteriormente, los factores transcripcionales son proteínas que regulan la transcripción de ADN al unirse a secuencias específicas en los promotores y otros elementos *cis* de un gen determinado (Fig. 2). Estas secuencias específicas se denominan elementos de respuesta, y a pesar de ser indispensables para la unión del factor transcripcional al ADN, el efecto activador o represor de los factores transcripcionales sobre sus genes blanco depende de:

- La cantidad, localización y actividad del factor en el núcleo.
- Su interferencia o sinergia con otros factores transcripcionales y/o la maquinaria de transcripción (Fig. 2).

- El ambiente cromatínico del gen que regulan.⁽⁸⁾

Dada su participación en la modulación específica de la expresión de proteínas que le otorgan a una célula la capacidad de realizar las funciones características de su tipo celular diferenciado, los factores transcripcionales juegan un papel crucial durante el desarrollo y mantenimiento del fenotipo de un organismo.⁽⁸⁾

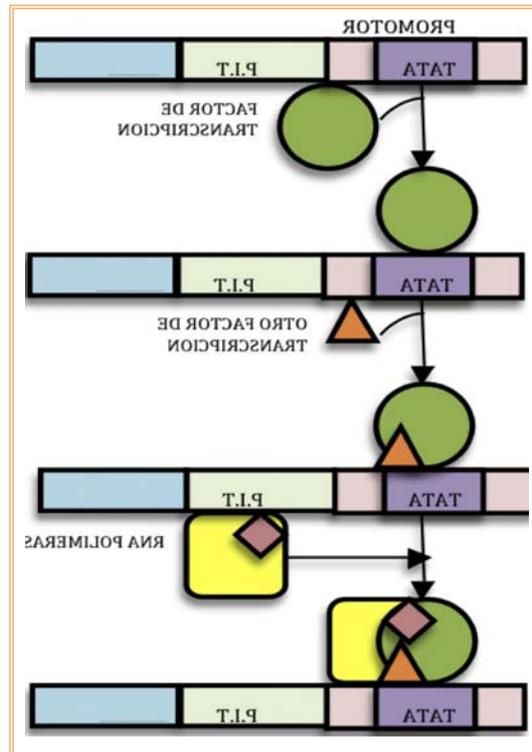


Figura 2. Función de los factores de transcripción, Punto de iniciación de la transcripción (P.I.T).⁽⁹⁾

La expresión y actividad de estos factores transcripcionales están reguladas a diferentes niveles.⁽⁸⁾

- Transcripcional.
- Por sinergia con otras proteínas (factores de crecimiento, insulina y otros factores transcripción)
- Por modificaciones post-transcripcionales.

⁸ Vega M, Fernández C 2009 Factores transcripcionales en las células β adulta Revista de investigación Clínica. 61: 428-446

⁹ Guía informativa de regulación génica. 2008 URL <http://4electivo.blogspot.com/2008/09/guia-informativa-de-regulacion-genica.html>

1.1.1. FACTOR NUCLEAR HEPATICO 1 α

El factor nuclear de hepatocitos 1 α (HNF1 α), es un factor de transcripción. El gen que lo codifica se lo conoce como factor de transcripción 1 (TCF1), se encuentra en el brazo largo del cromosoma 12q24.2 y consta de 10 exones que codifican una proteína de 630 aminoácidos.⁽¹⁰⁾

El HNF1 α se expresa en los hepatocitos, túbulo proximal renal, endotelio duodenal, saco vitelino y en las células β -pancreáticas. Este factor de transcripción regula la expresión de varios genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos como la piruvato quinasa, distintos transportadores de glucosa, insulina, y otros factores de transcripción como HNF1 β y HNF4 α .^(8,10,11)

HNF1 α está formado de 3 dominios: el dominio de dimerización N-terminal, el dominio de unión a DNA, y el dominio de transactivación C-terminal rico en serina y prolina (Fig. 3).⁽¹⁰⁾

Una particularidad en la estructura del HNF1 α es que su dominio de unión a ADN contiene una inserción de 21 aminoácidos altamente conservada entre las hélices 2 y 3, que no se encuentra en ninguna otra homeoproteína. Además se une a la secuencia de reconocimiento de ADN como un dímero y en ausencia de la secuencia de reconocimiento esta se dimeriza.^(10,11)

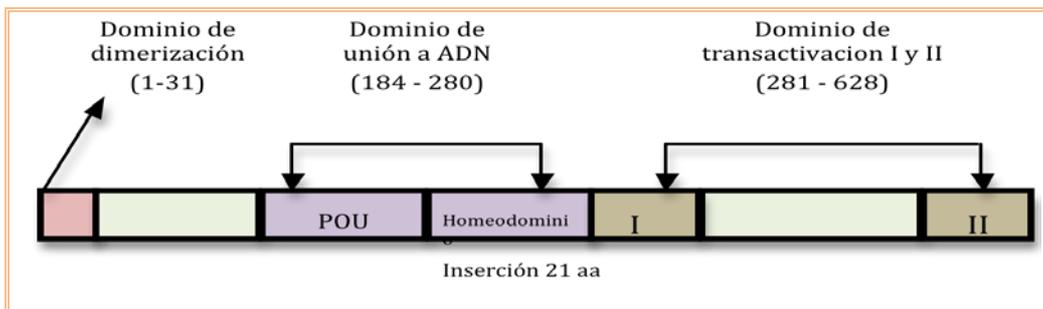


Figura 3. Representación esquemática de la estructura proteica del HNF1 α , y sus respectivos

¹⁰ Luco R. 2007 Funciones in vivo del regulador transcripcional HNF1 α (MODY3). Universidad de Barcelona. Facultad de Biología. Dpt de Bioquímica y Biología Molecular. Barcelona

¹¹ Yu M, Wang J, Li W, Zhi Yuan Y, Yan Li C, Hong Qian X, Xiang Xu W, Qun Zhan Y, Ming Yang X 2008. Proteomic screen defines the hepatocyte nuclear factor 1 α -binding partners and identifies HMGB1 as a new cofactor of HNF1 α Nucleic Acids Research. 36:1209–1219

dominios funcionales. Entre paréntesis se indica el número de los residuos de aminoácidos.⁽¹⁰⁾

HNF1 α existe en forma dimérica, bien formando homodímeros HNF1 α /HNF1 α , o heterodímeros HNF1 α /HNF1 β . Ambas clases de dímeros forman a su vez un complejo con dos moléculas de una proteína denominada Cofactor de Dimerización del HNF1. Este complejo tetramérico reconoce secuencias de ADN que se asemejan al motivo palindrómico CGTTAATNATTAACG, típicamente situados en la proximidad del inicio de transcripción de los genes regulados por HNF1. La unión al gen diana permite que HNF1 α induzca la activación de su transcripción.⁽¹²⁾

En el hígado, HNF α regula la transcripción de los genes implicados en el metabolismo de la glucosa, como la piruvato cinasa hepática (L-PK) y el transportador de glucosa GLUT2, en el páncreas controla la expresión de varios genes incluyendo el gen de la insulina y otros factores de transcripción como IPF-1 (factor 1 promotor de insulina).^(3,8)

Se conoce que el HNF1 α a nivel pancreático regula a HNF4 α y viceversa, formando un circuito de regulación positiva y se ha propuesto que estos dos factores transcripcionales actúan en conjunto para regular la transcripción de algunos de sus genes diana⁽⁸⁾. La expresión del HNF1 α en el páncreas a nivel embrionario es bajo, pero a medida que aparecen células endocrinas y exocrinas diferenciadas los niveles se incrementan en ambos tipos celulares de un modo regulado. Es importante resaltar que los niveles de expresión de este factor de transcripción en las células endocrinas, y en particular las células beta, es especialmente bajo respecto al resto de tejidos, sugiriendo que la concentración de HNF1 α en células beta está altamente regulada.^(10,12)

A nivel de islotes pancreáticos la ausencia de HNF1 α se asocia con la expresión defectuosa de transcritos del transportador de glucosa GLUT2, piruvato cinasa y otros genes metabólicos.⁽¹²⁾

¹² Ferrer J 2004. Diabetes autosómica dominante y defectos genéticos de reguladores transcripcionales. Cardiovascular Risk Factors 13: 209-218

Otro hallazgo significativo derivado del análisis de ratones knockout HNF1 α , es que este factor de transcripción a nivel epigenético es capaz de reclutar a la proteína coactivadora p300 al promotor de GLUT2 para la iniciación de la transcripción.⁽⁸⁾ También participa en la hiperacetilación de las histonas H3 y H4 de los promotores de GLUT2 y L-PK en el páncreas (no así en el hígado), lo cual le confiere un papel importante en la regulación de la expresión de genes relacionados con el metabolismo de la glucosa específicamente para la célula β .⁽¹²⁾

1.1.1.1. Polimorfismos G319S y G574S

Entre las variantes genéticas reportadas para HNF1 α se encuentran G319S y G574S.

En G319S se produce un cambio de una guanina por una adenina, lo que causa una sustitución de una glicina por una serina en el codón 319 de la proteína. Esta posición se encuentra en el extremo C-terminal del dominio de transactivación, junto al dominio de unión al ADN (Fig. 2).^(13,14)

Este polimorfismo se reportó en la población de Oji-Cree de Manitoba y el noroeste de Ontario, en personas con diabetes tipo 2 (DT2), con una frecuencia alélica de 0,09.^(5,15)

Estudios funcionales in vitro de la proteína con G319S mostraron un descenso del 54 % de la actividad de transactivación en comparación con la proteína de tipo silvestre.⁽¹³⁾

El fenotipo que presentan los sujetos con esta variante es: defecto en la secreción de insulina, inicio temprano de la DT2, niveles bajos de insulina, SM, reducción en las concentraciones colesterol total, LDL y apo B, además en

¹³ Harries L, Sloman M, Sellers E, Hattersley A y Ellard S 2008 Diabetes Susceptibility in the Canadian Oji-Cree Population Is Moderated by Abnormal mRNA Processing of HNF1A G319S Transcripts DIABETES 57: 1978- 1982

¹⁴ Raine B, Kirkpatrick R, Kelly S, Norquay L, Cattini P, Yamagata K, Hanley A, Zinman B, Harris S, Barrett P, y A. Hegele R. 2002 HNF-1 α G319S, a transactivation-deficient mutant, is associated with altered dynamics of diabetes Honest in an Oji-Cree community. PNAS 99: 4614–4619

¹⁵ Sellers E, Blydt T, Dean H, Gibson I, Birk P, Ogborn M 2008 Macroalbuminuria and Renal Pathology in First Nation Youth With Type 2 Diabetes Diabetes Care 32: 786-790

ciertos casos se ha asociado a índice de masa corporal ligeramente bajo.^(5,13,16,17)

La variante G574S se encuentra en el exón 9 del factor nuclear hepático 1 α , y corresponde al cambio de una guanina por una adenina, lo que se traduce en la sustitución de una glicina por una serina en la posición 574 de la proteína.⁽¹⁸⁾

Este polimorfismo ha sido reportado en población mexicana, afro-americana y afro-descendiente del Caribe, que presentan diferentes tipos de diabetes (diabetes atípica propensa a la cetosis, diabetes tipo1-DT1 y DT2); esta variante no se ha encontrado en personas de ascendencia europea o asiática.⁽³⁾

G574S afecta el potencial de transactivación de HNF1 α en el promotor de la insulina en las células β pancreáticas, aunque ha sido difícil demostrar su papel en el desarrollo de la diabetes en estudios de asociación caso-control, esta variante puede desempeñar un papel importante como un alelo susceptibilidad a la diabetes.⁽³⁾

1.1.2. FACTOR NUCLEAR HEPATICO 4 α .

El factor nuclear de hepatocitos 4 α (HNF4 α), es un miembro de la familia de receptores nucleares, el gen que lo codifica se lo conoce como factor de transcripción 20 (TCF20) esta ubicado en el brazo largo del cromosoma 20q12-13.1 y consta de 10 exones que codifican una proteína de 474 aminoácidos.^(4,32)

Se expresa en el hígado, riñón, intestino y en las células β -pancreáticas.⁽¹⁹⁾

¹⁶ Hegele R, Cao H, Harris S, Hanley A, Zinman B, Connelly P 200 The Private Hepatocyte Nuclear Factor-1 α G319S Variant Is Associated With Plasma Lipoprotein Variation in Canadian Oji-Cree *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:217-222.

¹⁷ Pollex R, Hanley A, Zinman B, Harris S, Khan S y Hegele R 2005 Synergism between mutant HNF1A and the metabolic syndrome in Oji-Cree Type 2 diabetes *Diabetic medicine* 22, 1510–1515

¹⁸ Collet C, Ducorps M, Mayaudon H, Dupuy O, Ceppa F, Boutin P, Froguel P, Bauduceau B 2002 Prevalence of the missense mutation GLY574SER in the hepatocyte nuclear factor -1 α in africans with diabetes *Diabetes Metab* 28: 39-44

³² www.ensembl.org

Muchos receptores nucleares de esta familia están sujetos a regulación por hormonas o metabolitos, pero no se ha descrito de forma concluyente un ligando para HNF4 α , por lo que se considera un receptor huérfano.^(12,19)

HNF-4 α consta de varios dominios funcionales: un dominio de transactivación N-terminal (AF-1), un dominio de unión al ADN y una región C-terminal funcional compleja que se forma de un dominio de unión a ligando, un interfaz de dimerización y un dominio de transactivación (AF-2) (Fig.3).⁽⁴⁾

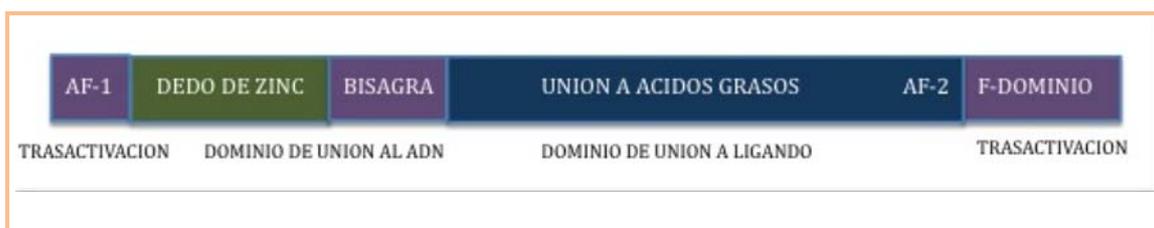


Figura 4. Dominios estructurales del HNF4 α .⁽²⁰⁾

El dominio de unión del ligando de este factor de transcripción presenta ácidos grasos, pero se considera que estos son un componente constitutivo de la estructura de HNF4 α , más no una molécula capaz de regular de forma aguda la función de HNF4 α . No obstante, independientemente de una hipotética función fisiológica de estos ácidos grasos, se los considera una diana atractiva para crear ligandos artificiales capaces de modular la función de HNF4 α farmacológicamente.⁽¹²⁾

Este factor es fundamental para el metabolismo de carbohidratos pues funciona como transactivador de varios genes como la piruvato cinasa de tipo L (L-PK), aldolasa B (AldoB), GLUT2, receptor activado por proliferadores peroxisómicos tipo alfa (PPAR α), genes mitocondriales como la proteína desacoplante (UCP2) y el mismo gen de insulina, este último tanto directa como indirectamente a través de HNF1 α .^(19,20)

HNF4 α se encuentra funcionalmente relacionado con el HNF1 α , debido a que se regulan entre sí formando una red común de los factores de transcripción

¹⁹ Bagwell A, Bento J, Mychaleckyj J, Freedman B, Langefeld C, Bowden D 2005. Genetic Analysis of *HNF4A* Polymorphisms in Caucasian-American Type 2 Diabetes. *A.M. Bagwell and Associates* 54:1185 – 1190

²⁰ Lu P, Bae G, Melikishvili M, Wu G, Adkins B, Fried M, y Chi Y 2008. Structural Basis of Natural Promoter Recognition by a Unique Nuclear Receptor, HNF4 α *Journal of biological chemistry* 283: 33685- 33697

que controlan el desarrollo y función de los islotes pancreático y de hepatocitos. ^(8,19, 20)

HNF4 α es necesario para una correcta secreción de insulina en respuesta a glucosa, probablemente a nivel del canal de potasio sensible a ATP o por un desequilibrio energético a nivel mitocondrial. ⁽⁸⁾

La información sobre el rol de HNF4 α en el páncreas aportada por los estudios animales ha sido más pobre que en el caso de HNF1 α , ya que mutaciones homocigotas nulas *Hnf4a* tienen un efecto letal temprano ^(8,12).

Varios estudios han demostrado que HNF4 α controla la expresión de HNF1 α en células hepáticas y del endodermo, y existe evidencia genética humana que apoya esta regulación en islotes pancreáticos.

En ratones HNF1 α es necesario para la expresión de HNF4 α , aunque esto ocurre sólo en islotes pancreáticos, esto es debido a que en islotes pancreáticos existe un promotor alternativo de HNF4 α , denominado P2, que confiere dependencia a HNF1 α . Esta dependencia ocurre también en humanos, ya que una mutación en el promotor de P2 que reduce la afinidad de HNF1 α por su secuencia diana produce diabetes de iniciación juvenil tipo 1 de sus siglas en inglés MODY1 en algunas personas. ⁽¹²⁾

1.1.2.1. Polimorfismo T130I

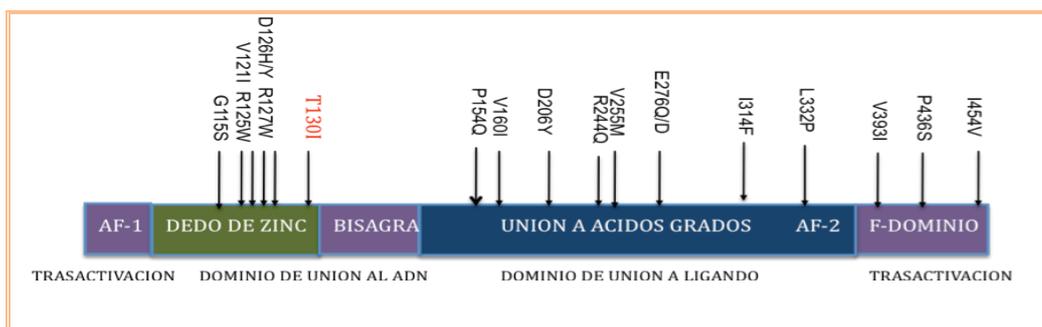


Figura 5. Variante T130I ubicado en el dominio de union del DNA. ⁽²⁰⁾

El polimorfismo T130I, se produce por un cambio de una citosina por una timina, lo que causa la sustitución de una treonina por una isoleucina en el

aminoácido 130 de la proteína. T130I es una variante que afecta a un residuo de la región de unión a ADN. ^(4,21)

Este polimorfismo se ha reportado en población danesa, japonesa y mexicana con una frecuencia de 4.7, 1.7 y 8% respectivamente. Esta relacionada con DT2 y niveles bajos de HDL. ^(2,4,21)

La variante T130I del gen HNF4 α se asocia con una pérdida de función de la proteína del 46.2% al menos en los hepatocitos, no está claro por qué la variante sólo afecta a la actividad de transactivación en las células hepáticas; la hipótesis que se maneja es una modificación post traduccional que sólo ocurre en estas células. ^(2,4)

1.2. PUEBLO INDIGENA SARAGURO DEL ECUADOR

Según el INEC se reportan 13 nacionalidades y 16 pueblos indígenas distribuidos en todo el territorio ecuatoriano. La nacionalidad Quichua es la mas representativa del Ecuador, de acuerdo al censo de población y vivienda del año 2001 se reportaron 408.395 individuos Quichuas⁽²³⁾. El pueblo Saraguro pertenece a esta nacionalidad, es uno de los mas distintivos, ya que sus comunidades se distribuyen tanto en la región interandina como en la amazónica.

Existen pocos datos publicados en las bases nacionales sobre la realidad de salud del pueblo Saraguro, de lo reportado se puede destacar que la diabetes es la sexta causa de morbilidad en el cantón de Saraguro con una frecuencia de 0,39%, seguida por epilepsia 0,33%, hepatitis A 0,23% y depresión 0,21%. ⁽²²⁾

Este pueblo se encuentra asentado en un vasto territorio, en sentido horizontal, se extiende desde el extremo noroccidental de la provincia de Loja en la región

²¹ Rodríguez A ,Ortiz G, Menjivar M 2006 Evaluación del polimorfismo T130I del gen HNF-4 α como factor de riesgo de diabetes mellitua tipo 2 de inicio temprano en alumnos de la facultad de química de la UNAM Medigraphic Artemisa en Linea. 31:71

²² Calderón M, Narváez N y Tenesaca D 2009 Impacto Socioeconómico de las Entidades Financieras socias de la Refse: Cooperativas Las Lagunas y Semilla del Progreso que apoyan al cantón Saraguro 2006 – 2007 Universidad Tecnica Particular de Loja. 42

Interandina, hasta las cercanías de la Cordillera del Cóndor en la provincia de Zamora Chinchipe en la región Amazónica. Se estima que su población fluctúa entre los 37.000 y 60.000 habitantes, organizados en alrededor de 183 comunidades.⁽²³⁾

El idioma materno es el Kichwa. No existe una etimología definida para el término Saraguro, por el contrario, se dan diversas interpretaciones. Para algunos, el nombre proviene de sara (maíz) y guru (gusano), por tanto, Saraguro significaría gusano del maíz. Para otros, su denominación haría referencia a las mazorcas secas de maíz, o provendría de sara y jura (germinado), es decir, significaría maíz que germina o crece, lo que sí está claro, independientemente de su significado, es que su nombre está estrechamente ligado al maíz y reafirma la importancia, económica, social y simbólica que este tiene en la vida del pueblo Saraguro.⁽²⁴⁾

Se considera que antes de la conquista incásica los Saraguro formaban parte de los Paltas que fueron conquistados por los Incas, pero dada la resistencia que presentaron fueron castigados con su traslado a tierras del Perú y reemplazados por poblaciones de "mitmaccunas".⁽²⁴⁾

En consecuencia con esta hipótesis, a los Saraguros se les atribuye ser descendientes de los mitmaccunas o mitimaes que vinieron originariamente desde El Collao, departamento del Cuzco Perú, y que formaban parte de las poblaciones transplantadas por el imperio Inca con fines político-militares, para lograr una efectiva administración del territorio conquistado, por ello se sostiene que los actuales Saraguros descienden del linaje de los Incas. Otra hipótesis afirma que los Saraguros son originarios de Bolivia, basándose fundamentalmente en las similitudes culturales con los Paquizhapas, indígenas de la zona Boliviana de Urdaneta.⁽²⁴⁾

El pueblo Saraguro es una de las culturas con mucha identidad propia tomando

²³ Instituto Nacional de Estadísticas y Censos – Ecuador (INEC) URL <http://www.inec.gov.ec>

²⁴ Confederación de Nacionalidades Indígenas del Ecuador CONAIE. URL <http://www.conaie.org/>

en cuenta que aún mantienen sus costumbres ancestrales, a pesar de la influencia del mundo globalizado, valoran la educación y figuran entre los indígenas más cultos de Ecuador. ⁽²⁵⁾

Existen pocas investigaciones acerca del componente genético de las comunidades indígenas del Ecuador, en el estudio realizado por Espinosa L. 2010 en la población Saraguro se encontró que el polimorfismo R230C del gen ABCA1 se halla relacionado con los niveles bajos de HDL, confirmando a esta población un mayor riesgo a desarrollar enfermedades como diabetes, obesidad y síndrome metabólico.

Debido a la poca información sobre el componente genético local y al incremento de enfermedades como DT2, síndrome metabólico y obesidad, resulta de trascendental importancia determinar si la población indígena Saraguro del Ecuador presenta los polimorfismo T130I del gen HNF4 α y G319S y G574S del gen HNF1 α ya que su identificación podría orientar a la prevención y tratamiento de estas enfermedades.

²⁵Ecuador Mágico 2006. URL <http://www.ecuadormagic.com>

2. MATERIALES Y METODOS.

2.1. POBLACION.

El estudio incluye un total de 103 personas nativas de la comunidad Saraguro, 43 pertenecientes a la región sierra y 60 a la región oriental del país; el rango de edad del grupo estudiado es de 15 – 68 años.

Los criterios de inclusión que se tomaron en cuenta en este trabajo fueron: pertenecer a la etnia Saraguro (basado en su autodefinición), no ser familiar en primer grado de otro participante del estudio, y ser oriundo del lugar tomando como referencia tres generaciones atrás.

A todos los participantes se les tomó una muestra de sangre periférica en ayuno de 8 - 12 horas, para medir los parámetros bioquímicos y extraer el ADN; estas muestras fueron tomadas previa aceptación de cada participante mediante la firma de un consentimiento informado.

2.2. PARAMETROS BIOQUÍMICOS Y ANTROPOMÉTRICOS.

Las pruebas bioquímicas se realizaron en el Laboratorio Clínico de la Unidad de Medicina Familiar de la Universidad Técnica Particular de Loja, usando kits comerciales y métodos estandarizados. La glucosa sérica, los niveles plasmáticos de colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidad (HDL), lipoproteína de baja densidad (LDL) y triglicéridos (TG) se midieron utilizando el equipo Cobas c111 - Roche, los niveles de hemoglobina glicosilada se determinaron a través del kit comercial Glycohemoglobin HbA₁Test - HUMAN.

El índice de masa corporal (IMC) e índice cintura – cadera (ICC), se determinaron según las siguientes fórmulas:

$$IMC = \frac{masa(kg)}{estatura(m^2)} \quad ICC = \frac{cintura(cm)}{cadera(cm)}$$

Se analizó la presencia de diabetes tipo 2 (DT2), síndrome metabólico (SM) y obesidad según los siguientes criterios:

- De acuerdo con los criterios de la Organización Mundial de la Salud, se diagnostica DT2 a todos aquellos individuos con glucemia en ayuno ≥ 126 mg/dL⁽²⁶⁾ (Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2009).
- Para el diagnóstico de SM se utilizó el criterio establecido por “National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults” (Adult Treatment Panel III [ATP-III]),⁽²⁷⁾ según la Tabla 1:

Tabla 1. Criterios de la ATP-III para el síndrome metabólico.

Factor de Riesgo	Niveles de Inclusión
Obesidad central	<i>Cintura > 102cm en hombres, >88cm en mujeres.</i>
Niveles bajos de HDL-C	HDL-C < 40 mg/dl en hombres, < 50mg/dl en mujeres.
Hipertrigliceridemia	Triglicéridos séricos ≥ 150 mg/dl
Hipertensión arterial	Presión arterial $\geq 138/85$ o uso de medicamentos antihipertensivos.
Glucosa plasmática en ayuno	Glucemia ≥ 100 mg/dl o uso de hipoglucemiantes.

La presencia de al menos 3 de estos criterios en un individuo es diagnóstico de Síndrome Metabólico.⁽²⁶⁾

- La determinación de obesidad o sobrepeso se hizo en base a la clasificación de la obesidad según el IMC de la Organización Mundial de la Salud,⁽²²⁾ en la cual, se diagnostica sobrepeso u obesidad a los individuos con un $IMC \geq 25$ kg/m²

2.3. EXTRACCION DE ADN.

La extracción de ADN se realizó a partir de sangre venosa con EDTA utilizando el kit “Wizard Genomic DNA Purification – Promega”, y se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8% usando bromuro de etidio.

²⁶ Organización mundial de la Salud URL. <http://www.who.int>

²⁷ Grundy S, Becker D, Clark L, Cooper R, Denke M, Howard W, Hunninghake D, Illingworth R, Luepker R, McBride P, McKenney J, Pasternak R, Stone N y Horn L. 2002 Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) NIH Publication No. 02-5215

2.4. IDENTIFICACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS

La identificación de los SNP: G319S, G574S del gen HNF1 α y T130I del gen HNF4 α , se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación, utilizando primers específicos (Tabla 2), mismos que fueron diseñados y revisados usando los programas FastPCR y OligoCalc,⁽²⁸⁾ respectivamente.

Tabla 2. Primers usados y temperatura de anillamiento (T_m)

SNP	Gen	Exón	Primer	T_m	Tamaño
T130I rs1800961	HNF4 α	4	F: 5'CCCTCATTCCACATGCTGATG-3' R: 5'CCCTCATTCCACATGCTGATG3'	63°C	401
G319S No reportado	HNF1 α	9	F: 5'GGCTATTTCTGCAGGGCGGAA 3' R: 5'GGGGTTAATTGTGGTGGATGGA 3'	63°C	481
G574S rs119305	HNF1 α	4	F: 5'CCAAGCAGGTAAGGTCCAGG-3' R: 5'CACAGTGACGGACAGCAACAG3'	63°C	334

Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización inicial a 96°C por 7 minutos, 37 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95°C por 30 segundos, anillamiento dependiendo de la combinación de primers (Tabla 2) por 30 segundos, extensión a 72°C por 30 segundos), extensión final a 72°C por 10 minutos.

Los productos de PCR fueron purificados usando el kit “Wizard SV gel and PCR Clean-Up System - Promega” y se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% usando bromuro de etidio.

La secuenciación se realizó en el Instituto de Ciencias Medicas Nutrición Salvador Zubiran – México y en el Centro de Biología Molecular y Celular de la Universidad Técnica Particular de Loja, utilizando el analizador genético ABI3500 de Applied Biosystems. Los electroferogramas se analizaron usando los programas Bioedit y CodonCode Aligner.

2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para analizar los resultados se utilizó el programa estadístico SPSS v15.0. Se calcularon medias y desviación estándar de los distintos parámetros, se

²⁸ URL <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoCalc.html>

calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas, el equilibrio de Hardy-Weinberg se evaluó utilizando el recurso online del Instituto de Genética Humana de Munich Alemania.⁽²⁹⁾

Para evaluar la asociación entre las variantes y los parámetros bioquímicos y antropométricos se utilizó el Modelo Lineal General Univariante y el análisis de asociación de los polimorfismos con obesidad y síndrome metabólico se realizó mediante regresión logística. Se normalizaron los datos correspondientes a presión arterial, niveles de glucosa, TG, HDL y LDL. Se consideró como nivel de significancia estadística $p < 0.05$.

²⁹ <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>

3. RESULTADOS

3.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y ANTROPOMÉTRICAS DE LA POBLACIÓN SARAGURO DEL ECUADOR.

En la Tabla 3 se muestra la media y desviación estándar de los parámetros clínicos y antropométricos de la población estudiada, según el sexo.

Tabla 3. Parámetros clínicos y antropométricos en la población indígena Saraguro del Ecuador.

Parámetros	Población General (n=103)		Valores de referencia
	Media	D.E.	
Edad	40,31	17,5	
IMC (Kg/m ²)	25,8	3,8	<25*
Cintura (cm)	H: 83,15 M: 84,78	H: 8,16 M: 10,4	<102hombre <88mujer **
IIC	H: 0,88 M: 0,85	H: 0,06 M: 0,07	<1 hombre <0,85mujer**
PAS (mmHg)	115,17	24,2	120/80.*
PAD (mmHg)	74,6	12,2	
Glucosa (mg/dl)	79,9	11,7	70-100 **
TG (mg/dl)	152,4	109,5	<150**
CT (mg/dl)	171,23	38,24	<200**
HDL (mg/dl)	H: 43,8 M: 42,87	H: 12,5 M: 11,96	30 -70 hombre**** 30 -90 mujer****
LDL (mg/dl)	96,8	28,2	<100**
HbA1c (%)	5,56	0,99	<5,7***

IMC=Índice de masa corporal, IIC=Índice cintura-cadera, PAS= Presión arterial sistólica, PAD=Presión arterial diastólica, TG=Triglicéridos, CT=Colesterol total, HDL=Lipoproteína de alta densidad, LDL=Lipoproteína de baja densidad, HbA1c=Hemoglobina glicosilada, H= Hombre, M= Mujer. Valores de referencia (*OMS, **ATP-III, ***ADA,, ****Interpretación clínica del laboratorio³⁰)

3.2. IDENTIFICACIÓN DEL POLIMORFISMO T130I DEL GEN HNF4 α .

En el grupo estudiado se identificó la presencia de T130I que corresponde al cambio de una citosina por una timina (Fig. 6). La frecuencia genotípica del homocigoto para T130I en la población es de 1,9% y heterocigota es de 34%

³⁰ Mejía G. y Ramelli M 200 Interpretación clínica del laboratorio. Sexta ed. Panamericana, Bogotá.

(Tabla 4), la frecuencia para el alelo C es del 81.1% y para el alelo T es del 18,9% (Tabla 5).

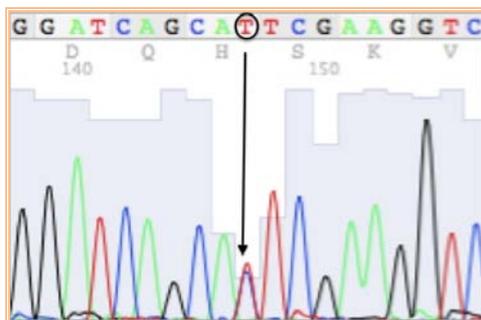


Figura N° 6. Electroferograma de un individuo heterocigoto para la variante T130I. La flecha indica la presencia de 2 nucleótidos diferentes. La curva azul indica la presencia de citosina para un alelo y la roja la presencia de timina para el otro.

3.2.1. FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DE T130I

Tabla 4. Frecuencia genotípica de la variante T130I en la población indígena Saraguro del Ecuador.

Genotipo	Nº Individuos	Frecuencia Genotípica
CC	66	0.641
CT	35	0.34
TT	2	0.019
TOTAL	103	1

Tabla 5. Frecuencia alélica de la variante T130I en la población indígena Saraguro del Ecuador

Alelos	Nº Alelos	Frecuencia Alélica
C	167	0.811
T	39	0.189
TOTAL	206	1

Las frecuencias observadas de los genotipos CC, CT y TT, del polimorfismo T130I estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg en la población analizada.

3.2.2. ASOCIACIÓN DE T130I CON LOS DIFERENTES PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y ANTROPOMÉTRICOS.

Realizando el análisis de asociación entre el genotipo y los diferentes rasgos antropométricos y bioquímicos de la población total no se observó ninguna asociación estadísticamente significativa (Tabla 6).

Al analizar los datos por regiones (Sierra/Oriente), se obtuvo que los individuos de la región sierra (Tabla 7) del genotipo CT/TT presentaron niveles de HDL significativamente más bajos (36.4 ± 8.7 mg/dL), que los individuos de genotipo normal CC (46.2 ± 12.0 mg/dl) $p=0.007$. Esta asociación se realizó utilizando el modelo dominante, considerando el sexo, edad e IMC como covariables.

Tabla 6. Comparación de los parámetros bioquímicos y antropométricos en la población Saraguro del Ecuador según la presencia de la variante T130I del gen HNF4 α .

Parámetros	Genotipo		p
	C130C	C130T/T130T	
N	66	37	
IMC (kg/m ²)	25.5 \pm 3.4	26.3 \pm 4.4	0.20
Cintura (cm)	83.5 \pm 9.3	85.8 \pm 10.7	0.72
ICC	0.85 \pm 0.07	0.88 \pm 0.7	0.35
PA Sistólica (mmHg)	114.1 \pm 25.6	117.0 \pm 21.6	0.27
PA Diastólica (mmHg)	74.0 \pm 11.0	75.6 \pm 14.19	0.55
Glucosa (mg/dl)	79.3 \pm 11.0	80.8 \pm 12.9	0.45
Triglicéridos (mg/dl)	143.7 \pm 108.2	167.9 \pm 108.7	0.33
Colesterol (mg/dl)	173.9 \pm 35.8	166.3 \pm 42.3	0.18
HDL (mg/dl)	44.9 \pm 11.6	39.7 \pm 12.1	0.72
LDL (mg/dl)	98.9 \pm 27.1	92.9 \pm 29.9	0.33
Hba1c %	5.6 \pm 0.96	5.3 \pm 1.0	0.28

Los datos presentados representan la media y desviación estándar (D.E.) de los distintos parámetros analizados según el genotipo. IMC= Índice de masa corporal, ICC= Índice cintura – cadera, PA= Presión arterial, HDL= Lipoproteína de alta densidad, LDL= Lipoproteína de baja densidad, HbA1c=Hemoglobina glicosilada. Valor de P comparando los genotipos CC vs. CT a través del MLG Univariante (nivel de significancia estadística $p<0.05$).

Tabla 7. Comparación de los parámetros bioquímicos y antropométricos en la población Saraguro del Ecuador según la presencia de la variante T130I del gen HNF4 α y la región de procedencia

Parámetros	Región Sierra			Región Oriente		
	Genotipo		<i>p</i>	Genotipo		<i>p</i>
	C130C	C130T/T130T		C130C	C130T/T130T	
N	31	12		36	24	
IMC (kg/m²)	25.9 \pm 3.7	25.5 \pm 3.5	0.38	25.4 \pm 3.4	27.1 \pm 4.8	0.05
Cintura (cm)	81.1 \pm 9.9	83.9 \pm 11.6	0.54	86.7 \pm 9.3	87.4 \pm 10.5	0.94
ICC	0.82 \pm 0.71	0.84 \pm 0.7	0.62	0.86 \pm 0.58	0.87 \pm 0.7	0.77
PA Sistólica (mmHg)	114.8 \pm 13.2	113.4 \pm 15.7	0.88	115.6 \pm 37.2	120.0 \pm 25.2	0.22
PA Diastólica (mmHg)	74.2 \pm 10.5	73.0 \pm 12.16	0.98	75.4 \pm 12.0	77.6 \pm 15.8	0.65
Glucosa (mg/dl)	77.6 \pm 9.9	79.9 \pm 14.3	0.62	81.2 \pm 12.4	81.3 \pm 12.9	0.94
Triglicéridos (mg/dl)	148.0 \pm 113.7	145.6 \pm 60.0	0.72	138.7 \pm 116.3	177.9 \pm 131.5	0.61
Colesterol (mg/dl)	181.6 \pm 29.9	161.3 \pm 47.4	0.05	170.1 \pm 42.4	171.9 \pm 39.5	0.92
HDL (mg/dl)	46.2 \pm 12.0	36.4 \pm 8.7	0.007	42.6 \pm 11.3	42.1 \pm 13.9	0.84
LDL (mg/dl)	103.1 \pm 27.9	95.5 \pm 30.5	0.46	99.6 \pm 25.7	94.3 \pm 29.4	0.74
Hba1c %	6.0 \pm 0.94	5.5 \pm 0.93	0.09	5.2 \pm 0.86	5.3 \pm 1.0	0.72

Los datos presentados representan la media y desviación estándar (D.E.) de los distintos parámetros analizados según el genotipo. IMC= Índice de masa corporal, ICC= Índice cintura – cadera, PA= Presión arterial, HDL= Lipoproteína de alta densidad, LDL= Lipoproteína de baja densidad, HbA1c=Hemoglobina glicosilada. Valor de *P* comparando los genotipos CC vs. CT a través del MLG Univariante (nivel de significancia estadística $p < 0.05$).

3.2.3. ASOCIACIÓN DE T130I CON OBESIDAD Y SÍNDROME METABÓLICO

Como se muestra en la Tabla 8, al realizar el análisis de asociación de las variantes con obesidad y síndrome metabólico mediante regresión logística no se obtuvo ningún valor estadísticamente significativo.

Tabla 8. Asociación de T130I obesidad y síndrome metabólico.

Transtornos Metabólicos	Exp. (B)	Lim. Inferior	Lim. Superior
SM	2.759	0,876	8.69
OBESIDAD	1.738	0,758	3.98

3.3. IDENTIFICACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS G319S Y G574S DEL GEN HNF1 α .

En el grupo analizado no se encontró la presencia de las variantes G319S y G574S. Todos los individuos presentaron el alelo silvestre, es decir guanina, situación que se muestra en la Tabla 10 donde se indica las frecuencias alélicas para las variantes.

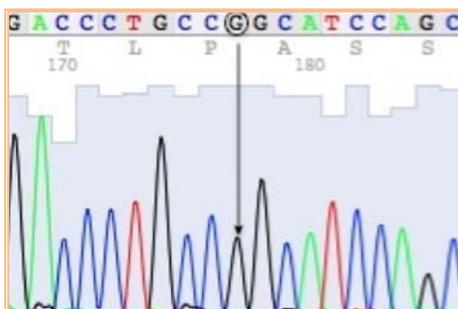


Figura Nº 7 Electroferograma de un individuo homocigoto para el alelo silvestre del SNP G319S.

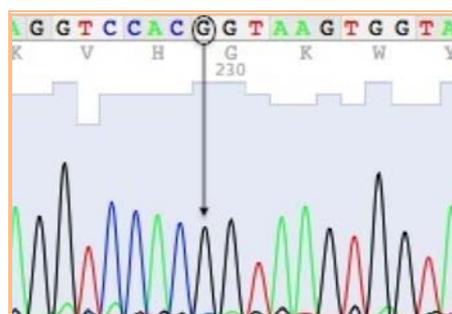


Figura Nº 8. Electroferograma de un individuo homocigoto para el alelo silvestre del SNP G574S.

3.3.1. FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DE G319S Y G574S

Tabla 9. Frecuencia genotípica de la variante G319S y G574S en la población indígena Saraguro del Ecuador.

Genotipo	Nº Individuos	Frecuencia Genotípica
GG	103	1
GA	0	0
AA	0	0
TOTAL	103	1

Tabla 10. Frecuencia alélica de la variante G319S y G574S en la población indígena Saraguro del Ecuador

Alelos	Nº Alelos	Frecuencia Alélica
G	206	1
A	0	0
TOTAL	206	1

4. ANALISIS

HNF4 α es miembro de la familia de receptores nucleares; en los islotes pancreáticos regula la secreción de insulina como respuesta a la glucosa, jugando un papel importante en la regulación de ésta y el metabolismo lipídico. (2,21)

A la fecha, se han descrito alrededor de veinte variantes para el exón 4 del gen HNF4 α , entre las cuales se encuentra la variante T130I, que es un cambio que afecta a un residuo de la región de unión a ADN. Este polimorfismo se ha reportado en población danesa, japonesa y mexicana, con una frecuencia de 4.7, 1.7 y 8%, respectivamente. Además esta variante estuvo asociada a DT2 y a niveles bajos de HDL. (2,4, 21)

En el presente trabajo se encontró que la frecuencia alélica del polimorfismo T130I en la población indígena Saraguro del Ecuador es de 18.9% (**Tabla 5**), siendo la más alta de entre las mencionadas anteriormente.

T130I estuvo asociado a niveles bajos de HDL en individuos de la etnia Saraguro asentados en la región sierra del país ($p=0.007$) (**Tabla 7**), sin embargo, esta asociación no se mantuvo al realizar el análisis con la región oriental ($p= 0.84$) (**Tabla 7**) y población general ($p= 0.72$) (**Tabla 6**). Esta disminución en la concentración de HDL únicamente para los individuos serranos, podría deberse a la influencia de factores ambientales y estilo de vida diferente entre ambas regiones, ya que la variabilidad fenotípica de HDL es un efecto multifactorial y poligenico. (24,31,32)

Se han reportado diversos polimorfismos para el factor de transcripción HNF1 α entre los cuales tenemos: G319S, reportada en la población Oji-Cree por Triggs B *et al.* 2002 con una frecuencia alélica de 0.09. Esta variante ha sido encontrada en poblaciones cerradas y ha sido asociada a DT2. (13)

La variante G574S afecta el potencial de transactivación de HNF α sobre el gen de la insulina en las células β pancreáticas, es considerado como un alelo de susceptibilidad para el desarrollo de diabetes. Este polimorfismo no ha sido reportado en poblaciones de origen europeo y asiático, parece ser específica para las poblaciones de ascendencia africana.(3)

³¹ Andrade F, Fiegenbaum M, Almeida S y Hutz M 2010 Influencia de combinaciones Genéticas en los Niveles de HDL-c en una Población del Sur del Brasil. Arq Bras Cardiol 95: 430 – 435

³² Cerrano A, Artieda M y Pocoví M 2004 Genes candidatos en las alteraciones del metabolismo de las HDL. Cardiovascular Risk Factors 13: 94 – 105.

Las frecuencias para G574S reportadas en las poblaciones: america-africana, afrocaribeña, senegales y meztisa mexicana fueron de 7.1, 11.1, 19 y 3.4% respectivamente. Los mestizos mexicanos son el resultado de la mezcla de varias poblaciones, con predominio de España-Europa (50-60%), America y la India (37-49%) y África (1-3%) ⁽³⁾

En la población indígena Saraguro del Ecuador las variantes G319S y G574S están ausentes.

La variante G319S solo ha sido reportada en la población Oji-Cree de Canada, esta es una comunidad cerrada⁽²⁾, es difícil que el polimorfismo se distribuya debido a que esta comunidad no posee una corriente inmigratoria o emigratoria, de forma que los cambios en la dimensión de la población ocurren solamente como resultado de los nacimientos y defunciones; lo que podría explicar la ausencia de esta variante en otras poblaciones.

De acuerdo con las teorías sobre el origen del pueblo Saraguro del Ecuador, estos conformaban “la zona de los paltas”, o tendrían descendencia de los mitmaccunas o mitimaes (Cuzco-Perú), finalmente otras hipótesis sostienen que los Saraguros provienen de Bolivia, basado principalmente en las similitudes culturales con Paquizhapas. ^(23,24,33) Sobre la base de estas hipótesis se descarta la contribución del componente genético africano para esta población, disminuyendo la probabilidad de presentar polimorfismos genéticos de descendencia africana como es el caso de G574S.

³³ Muyasela M, Maldonado M, Chinkim L, Masaquiza J, Muñoz W, Macas F, Simbaña A, Tapuyo R, Tapuy B, Tenesaca P, Umajinga B, Vargas L, Villamil G y Yumbo A. 1995 Identidades Indias en el Ecuador contemporáneo. Gráficas Modelo 345- 346

5. CONCLUSIONES:

- Se identificó el polimorfismo T130I del gen HNF1 α en el grupo indígena Saraguro del Ecuador analizado, con una frecuencia alélica de 0.18.
- Las variante G319S y G574S del gen HNF4 α están ausentes en la población Saraguro analizada.

6. RECOMENDACIONES.

- Determinar la frecuencia del polimorfismo T130I del gen HNF4 α en personas con diabetes tipo 2 y analizar los efectos de dicho polimorfismo mediante estudios de caso control.
- Determinar la frecuencia del polimorfismo G574S del gen HNF4 α en poblaciones Afroecuatoriana y mestizo-ecuatoriana con diabetes tipo 2.

7. ANEXO

Anexo1. Consentimiento Informado.



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

INTRODUCCIÓN: La siguiente información describe el protocolo y su papel como participante. El investigador contestará cualquier pregunta sobre el tema.

PROPOCEDIMIENTO DEL ESTUDIO: El propósito del estudio es identificar la susceptibilidad a padecer enfermedades como diabetes mellitus y obesidad en grupos poblacionales.

PROCEDIMIENTOS A SEGUIR: Usted ha sido invitado a participar en el estudio para evaluar la presencia de algunas variantes en el material genético que podrían conferir riesgos a padecer ciertas enfermedades como diabetes mellitus y obesidad. Su participación sólo requiere de la toma de una muestra de sangre y del llenado de un cuestionario para evaluar su historia médica.

MOLESTIAS POR SU PARTICIPACIÓN: Se obtendrá una muestra de sangre por la mañana, con un ayuno de 8-12 hrs. La cantidad total de sangre obtenida no implica riesgos para su salud.

BENEFICIO PARA LOS PARTICIPANTES: Los resultados aportarán información importante sobre el estado de salud de la persona, relacionado con diabetes mellitus, obesidad. Dada la duración del estudio, si en el futuro surgieran nuevos datos que pudieran beneficiarlo, los investigadores haremos lo posible por comunicárselo.

CONFIDENCIALIDAD: Los datos obtenidos de su persona son absolutamente confidenciales, no pueden ser utilizados con otro fin. Usted será informado de cualquier hallazgo obtenido en esta investigación. El DNA obtenido solo será empleado para fines de investigación.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA:

Yo _____ declaro libre y voluntariamente que acepto participar en este estudio. Es de mi conocimiento que seré libre de retirarme de la presente investigación en el momento que lo desee. También puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación en el estudio. Debo informar, tan pronto como sea posible, a los investigadores, de cualquier cambio importante que ocurra en mi estado de salud, incluyendo el consumo de medicamentos, suspensión o inicio de algún hábito (ej. Tabaquismo) o cambio de domicilio. Las muestras obtenidas sólo para ser utilizada para los fines de investigación.

He comprendido el contenido de ésta carta de consentimiento, mis dudas han sido resueltas y voluntariamente acepto participar:

Firma del investigador

Firma del paciente

Fecha:

8. BIBLIOGRAFIA

- Andrade F, Fiegenbaum M, Almeida S y Hutz M 2010 Influencia de combinaciones Genéticas en los Niveles de HDL-c en una Población del Sur del Brasil. Arq Bras Cardiol 95: 430 – 435
- Bagwell A, Bento J, Mychaleckyj J, Freedman B, Langefeld C, Bowden D 2005. Genetic Analysis of *HNF4A* Polymorphisms in Caucasian-American Type 2 Diabetes. A.M. Bagwell and Associates 54:1185 – 1190.
- Barrio R 2007 Diabetes monogénicas: enfoque diagnóstico y tipos más frecuentes. Avances en diabetología 23: 333-340.
- Cerrano A, Artieda M y Pocoví M 2004 Genes candidatos en las alteraciones del metabolismo de las HDL. Cardiovascular Risk Factors 13: 94 – 105.
- Checa M 2007 Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratoria Ismael Cosío Villegas. 20:213-221.
- Confederación de Nacionalidades Indígenas del Ecuador CONAIE. URL <http://www.conaie.org/>.
- Cortés V, Quezada N, Rigotti A, Maiz A 2005 Nuevos receptores nucleares heterodiméricos: reguladores metabólicos con impacto en fisiopatología y su proyección terapéutica en dislipidemias y diabetes mellitas. Rev Méd Chile 133: 1483-1492.
- Escuela de Gobierno y Políticas Públicas y Fundación Konrad Adenauer 2007 Políticas Públicas para Pueblos Indígenas en el Ecuador del Siglo XXI Memorias del Seminario Nacional. URL coordinacion@escueladegobierno.edu.ec.
- Ellard S y Colclough K 2006 Mutations in the Genes Encoding the Transcription Factors Hepatocyte Nuclear Factor 1 Alpha (HNF1 α) and 4 Alpha (HNF4 α) in Maturity-Onset Diabetes of the Young HUMAN MUTATION 27:854-869.
- Fernández J 2006 Principios básicos de biología molecular: del almacenamiento de la información al desarrollo de la función. XLVIII Reunión Nacional de la AEHH y XXII Congreso Nacional de la SETH. Programa educacional. Haematologica/edición española. 91(Supl 1): 6-10.
- Ferrer J 2004. Diabetes autosómica dominante y defectos genéticos de reguladores transcripcionales. Cardiovascular Risk Factors 13: 209-218.
- García F, Solís J, Calderón J, Luque E, Neyra L, Manrique H, Cancino R, Castillo O, Cornejo S, Rodríguez E, Freundt J, Escudero R, Zacarías E 2007. Prevalencia de diabetes mellitus y factores de riesgo relacionados en una población urbana. Rev Soc Peru Med Interna 20:90.
- Guía informativa de regulación génica. 2008 URL <http://4electivo.blogspot.com/2008/09/guia-informativa-de-regulacion-genica.html>.
- Iniesta R, Guinó E, Moreno V 2005 Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. Gac Sanit. 19:333-341.
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos – Ecuador (INEC) URL <http://www.inec.gov.ec>.

- Harries L, Sloman M, Sellers E, Hattersley A y Ellard S 2008 Diabetes Susceptibility in the Canadian Oji-Cree Population Is Moderated by Abnormal mRNA Processing of HNF1A G319S Transcripts *DIABETES* 57: 1978- 1982.
- Hegele R, Cao H, Harris S, Hanley A, Zinman B, Connelly P 200 The Private Hepatocyte Nuclear Factor-1 α G319S Variant Is Associated With Plasma Lipoprotein Variation in Canadian Oji-Cree *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:217-222.
- Hernández J, Martínez J, Valverde V 2009 Polimorfismos reguladores y su participación en la patogenia de enfermedades complejas en la era posgenómica. *Salud pública de México* 51: 455-462.
- Jafar B, Groves C, Gjesing A, Herrera B, Winckler W, Stringham H, Morris A, Lauritzen T, Doney A, Morris A, Weedon M, Swift A, Kuusisto J, Laakso M, Altshuler D, Hattersley A, Collins F, Boehnke M, Hansen T, Pedersen O, Palmer C, Frayling T, Consortium D, Gloyn A, McCarthy M 2010 A role for coding functional variants in HNF4A in type 2 diabetes susceptibility *Diabetologia*.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). URL <http://www.who.int>.
- Luco R. 2007 Funciones in vivo del regulador transcripcional HNF1 α (MODY3). Universidad de Barcelona. Facultad de Biología. Dpt de Bioquímica y Biología Molecular. Barcelona.
- Lu P, Bae G, Melikishvili M, Wu G, Adkins B, Fried M, y Chi Y 2008. Structural Basis of Natural Promoter Recognition by a Unique Nuclear Receptor, HNF4 α *Journal of biological chemistry* 283: 33685- 33697.
- Navalón K, Mendoza L, Díaz M, Martínez M, Reyna H, A. Aguilar C, Riba L, Canizales S, Villarreal T, González A, Argueta V, Tusié M y Miliar A 2006 HNF-1 α G574S is a functional variant with decreased transactivation activity. *Diabetic Medicine*, 23:1295–1300.
- Menjívar M, Granados MA, Montúfar I, Herrera M, Tusié MT, Canizales S, Aguilar CA y Ortiz MG 2008 High frequency of T130I mutation of HNF4A gene in Mexican patients with early-onset type 2 diabetes *CLINICAL GENETICS* 73: 185–187.
- Mejia G. y Ramelli M 200 Interpretación clínica del laboratorio. Sexta ed. Panamericana, Bogota.
- Ministerio de la Salud Publica del Ecuador (MSP) URL <http://www.msp.gov.ec>.
- Muyancela M, Maldonado M, Chinkim L, Masaquiza J, Muñoz W, Macas F, Simbaña A, Tapuyo R, Tapuy B, Tenesaca P, Umajinga B, Vargas L, Villamil G y Yumbo A. 1995 Identidades Indias en el Ecuador contemporaneo. *Gráficas Modelo* 345- 346
- Pizarro M, Torrealba N, Bravo R, González L, Lavandero S 2009. Polimorfismo Pro 72Arg del gen *TP53* y enfermedad coronaria *Revista Chile Cardiologis* 28: 385-387.
- Pollex R, Hanley A, Zinman B, Harris S, Khan S y Hegele R 2005 Synergism between mutant HNF1 α and the metabolic syndrome in Oji-Cree Type 2 diabetes *Diabetic medicine* 22, 1510–1515.
- Rodríguez A ,Ortiz G, Menjívar M 2006 Evaluación del polimorfismo T130I del gen HNF-4 α como factor de riesgo de diabetes mellitua tipo 2 de inicio temprano en alumnos de la facultad de química de la UNAM *Medigraphic Artemisa en Linea*. 31:71.

- Raine B, Kirkpatrick R, Kelly S, Norquay L, Cattini P, Yamagata K, Hanley A, Zinman B, Harris S, Barrett P, y A. Hegele R. 2002 HNF-1 α G319S, a transactivation-deficient mutant, is associated with altered dynamics of diabetes Honest in an Oji-Cree community. PNAS 99: 4614–4619.
- Rydén L, Standl E, Bartnik M, Van den Berghe G, Betteridge J, Boer M, Cosentino F, Jönsson B, Laakso M, Malmberg K, Priori S, Östergren J, Tuomilehto J, Thrainsdottir I 2007. Guías de práctica clínica sobre diabetes, prediabetes y enfermedades cardiovasculares: versión resumida. Revista Especializada Cardiología. 60: 525.e1-e64.
- Sellers E, Blydt T, Dean H, Gibson I, Birk P, Ogborn M 2008 Macroalbuminuria and Renal Pathology in First Nation Youth With Type 2 Diabetes Diabetes Care 32: 786-790.
- Triggs B, Kirkpatrick R, Kelly S, Norquay L, Cattini P, Yamagata K, Hanley A, Zinman B, Harris S, Barrett P, y Hegele R 2002 HNF-1 α G319S, a transactivation-deficient mutant, is associated with altered dynamics of diabetes Honest in an Oji-Cree community PNAS 99: 4614–4619.
- Torrages S. 2006 Deabetes mellitas tipo 2 . 25: 96-97.
- Valdés S, Rojo-Martínez G, Soriguer F 2007. Evolución de la prevalencia de la diabetes tipo 2 en población adulta española. Revista española de Cardiología. 129:352 - 5 . URL http://www.revespcardiol.org/cardio/ctl_servlet?_f=40&ident=13109554&print=1.
- Vega M, Fernández C 2009 Factores transcripcionales en la célula β adulta Revista de Investigación Clínica. 61: 428-446.
- Yu M, Wang J, Li W, Zhi Yuan Y, Yan Li C, Hong Qian X, Xiang Xu W, Qun Zhan Y, Ming Yang X 2008. Proteomic screen defines the hepatocyte nuclear factor 1a-binding partners and identifies HMGB1 as a new cofactor of HNF1a Nucleic Acids Research. 36:1209–1219.
- Zhu Q, Yamagata K, Miura A, Shihara N, Horikawa Y, Takeda J, Miyagawa J y Matsuzawa Y. 2003 T130I mutation in HNF-4 α gene is a loss-of-function mutation in hepatocytes and is associated with late-onset Type 2 diabetes mellitus in Japanese subjects Diabetologia 46:567–573.

