



Universidad de Costa Rica

Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines

Trabajo final de graduación para optar por el grado de licenciatura en microbiología y química
clínica:

**El polimorfismo Inserción/Delección del gen de la Enzima Convertidora de
Angiotensina y su asociación con algunas complicaciones en pacientes con Diabetes
Mellitus tipo 2 de la zona de Montes de Oca, Curridabat y La Unión, período
marzo 2007- julio 2008**

Estudiante: Juan José Madrigal Sánchez

Tutora: Dra. Lizbeth Salazar Sánchez

Julio, 2010

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
VICERRECTORÍA DE DOCENCIA

FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA
CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO

Acta de presentación de Requisito Final de Graduación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el martes 06 de julio del año 2010 con el objeto de recibir el informe oral del estudiante **JUAN JOSÉ MADRIGAL SANCHEZ**, carné A22883, quien se acoge al Reglamento de Trabajos Finales de Graduación bajo la modalidad de **PRACTICA DE GRADUACIÓN**, para optar por el grado académico de **LICENCIADO EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA** y el título profesional de **DOCTOR EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA**.

Están presentes los siguientes miembros del tribunal:

Dr. Walter Rodríguez Romero **PRESIDENTE**
Dr. Max Ruiz Corella
Dra. Lisbeth Salazar Sánchez
Dra. Mayra Cartín Brenes
Dr. Pablo Alvarado Ulate

ARTICULO 1

El presidente informa que el expediente de **JUAN JOSÉ MADRIGAL SANCHEZ**, contiene todos los documentos de rigor, incluyendo el recibo de pago de los derechos de graduación. Declara que el postulante cumplió con todos los demás requisitos del plan de estudios correspondientes, y por lo tanto, se solicita que proceda a hacer la exposición.

ARTICULO 2

El postulante **JUAN JOSÉ MADRIGAL SANCHEZ**, hace la exposición oral de su trabajo de graduación título “El polimorfismo Inserción/Delección del gen de la enzima convertida de angiotensina y su asociación con algunas complicaciones en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2 de la zona de montes de Oca, Curridabat y la Unión en el periodo de marzo 2007- julio 2008”.

ARTICULO 3

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan al Postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

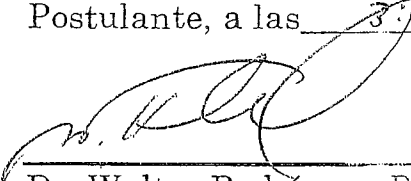
ARTICULO 4

El tribunal considera el trabajo final de graduación satisfactorio y le confiere la calificación de: 93,8 (Nueve treinta y ocho)
Aprobación con distinción

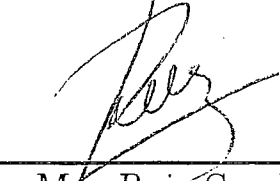
ARTICULO 5

El presidente del Tribunal comunica al Postulante el resultado de la deliberación y lo declara acreedor al grado de Licenciado en Microbiología y Química Clínica y al título profesional de Doctor en Microbiología y Química Clínica.

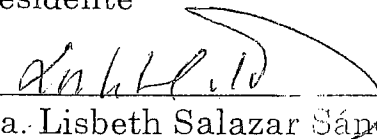
Se le indica la obligación de presentarse al acto público de juramentación al que será oportunamente convocado. Se da lectura al acta que firman los Miembros del Tribunal Examinador y al Postulante, a las 3:50 horas.



Dr. Walter Rodríguez Romero
Presidente



Dr. Max Ruiz Corella




Dra. Lisbeth Salazar Sánchez



Dra. Mayra Cartín Brenes



Dr. Pablo Alvarado Ulate



Juan José Madrigal Sánchez
Postulante

Dedicatoria

A ese ser de luz que me acompaña e ilumina desde hace años, con pequeñas muestras de grandeza le basta para llenarme de vitalidad y así yo no parar de crecer...

GRACIAS Blanca Castro Garita

Agradecimientos

...A todos aquellos que de una u otra forma estuvieron ahí cuando mi ser los
necesitaba....
Todas las gracias!!

Contenido

<i>Dedicatoria</i>	<i>i</i>
<i>Agradecimientos</i>	<i>ii</i>
<i>Contenido</i>	<i>iii</i>
<i>Indice de cuadros</i>	<i>v</i>
<i>Indice de figuras</i>	<i>vi</i>
<i>Lista abreviaturas</i>	<i>vii</i>
<i>Resumen</i>	<i>viii</i>
<i>Justificación</i>	<i>1</i>
<i>Objetivos del proyecto</i>	<i>3</i>
Objetivo principal	<i>3</i>
Objetivos secundarios.....	<i>3</i>
<i>Antecedentes</i>	<i>4</i>
<i>Marco teórico</i>	<i>6</i>
Diabetes Mellitus	<i>6</i>
Tipos de Diabetes	<i>6</i>
Epidemiología.....	<i>9</i>
Situación en Costa Rica	<i>10</i>
Complicaciones	<i>11</i>
Nefropatía.....	<i>11</i>
Macrovasculares y de coagulación	<i>11</i>
Asociaciones con otros padecimientos	<i>13</i>
<i>Enzima convertidora de angiotensina</i>	<i>14</i>
<i>Procedimientos y metodología</i>	<i>15</i>
Pacientes.....	<i>15</i>
Estudios realizados	<i>16</i>
Obtención y estabilidad de las muestras	<i>16</i>
Análisis genético-molecular	<i>16</i>
Análisis de coagulación	<i>17</i>
Análisis de los datos	<i>18</i>
<i>Resultados</i>	<i>19</i>
<i>Discusión</i>	<i>26</i>
<i>Conclusiones</i>	<i>30</i>
<i>Bibliografía</i>	<i>31</i>
<i>Ανονος</i>	<i>36</i>

Anexo 1: Hojas de recolección de datos y consentimiento informado.....36

Índice de cuadros

Cuadro 1: Número de individuos de la población estudiada que presentaron eventos cerebrovasculares (AVC), cardiopatía isquémica, HTA, nefropatía y/o dislipidemia.....	20
($p < 0,05$)	20
Cuadro 2: Número de individuos que presentan eventos cerebrovasculares según el polimorfismo de la ECA	22
($p = 0,7647$)	22
Cuadro 3: Número de individuos que presentan cardiopatía isquémica según el polimorfismo de la ECA.....	22
($p = 0,2818$)	22
Cuadro 4: Número de individuos que presentan dislipidemia según el polimorfismo de la ECA	23
Cuadro 5: Número de individuos que presentan HTA según el polimorfismo de la ECA.....	23
($p = 0,4547$)	23
Cuadro 6: Número de individuos que presentan patología renal según el polimorfismo de la ECA.....	24
Cuadro 7: Número de individuos que presentan DM según el polimorfismo de la ECA.....	24
Cuadro 8: Modelo de regresión logística para evaluar la contribución del polimorfismo de la ECA en la aparición de la DM.....	25

Índice de figuras

Figura 1: Resumen de las alteraciones vasculares y de la coagulación en la DM (Traducido de Beckham et al., 2002)	13
Figura 2. Polimorfismo de intrón 16 de la ECA (Lizaraso et al., 2002).....	17
Figura 3: Polimorfismo de la ECA en casos vs controles	21

Lista abreviaturas

ADA: American Diabetes Association

ADN: Ácido desoxiribonucleico

CCSS: Caja Costarricense del Seguro Social

CIHATA: Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines

CONARE: Consejo Nacional de Rectores

DM: Diabetes Mellitus

DM-1: Diabetes Mellitus 1

DM-2: Diabetes Mellitus 2

EBAIS: Equipo Básico de Atención Integral en Salud

ECA: Enzima convertidora de angiotensina

Fgo: Fibrinógeno

GAM: Gran área metropolitana

HTA: hipertensión arterial

I/D: Inserción/delección

NU: Nitrógeno ureico

OPS: Organización Panamericana de la Salud

PAIS: Programa de Atención Integral en Salud

Pb: pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PIB: Producto Interno Bruto

SRAA: Sistema renina-angiotensina-aldosterona

TP: Tiempo de protrombina

TTP: Tiempo parcial de tromboplastina

UCR: Universidad de Costa Rica

Resumen

La diabetes es un padecimiento de tipo crónico que afecta más del 5,3% de la población de más de 20 años en Costa Rica, esta prevalencia aumento con el tiempo lo cual implica elevados costos económicos para el estado. Hoy día se asocia la diabetes con la interacción de múltiples genes, lo cual hace suponer que en esta población el consejo genético podría cobrar importancia, conforme se vayan aclarando cuales interacciones de cuales genes interfieren con su pronóstico, ya sea negativo o positivo.

La ECA es una enzima reguladora del SRAA, la cual tiene efectos vasodilatadores; no obstante se está empezando a observar que no solo tiene efectos vasodilatadores sino también interviene en procesos como la dislipidemia, nefropatía e incluso cardiopatía isquémica.

En el presente estudio se buscó una asociación entre el polimorfismo I/D del gen ECA y algunas complicaciones (HTA, dislipidemia, nefropatía, cardiopatía isquémica) de la DM; también se analizaron los niveles de fibrinógeno de todos los individuos comprendidos por el estudio.

El estudio fue un estudio de casos y controles (109 y 116 respectivamente), en el cual se entrevisto a cada individuo para obtener información del mismo. Además se realizó un PCR para saber el polimorfismo I/D del gen ECA de cada individuo, junto con la determinación del fibrinógeno de cada participante del proyecto. La información obtenida fue procesada utilizando algunas herramientas estadísticas como lo son epinfo6d, así como el programa SPSS; también se averiguo si cada grupo cumplía o no con el equilibrio Hardy-Weinberg.

No se encontró asociación directa entre el polimorfismo estudiado y las complicaciones analizadas, salvo para la HTA. Tampoco se hallaron diferencias entre el comportamiento de la población diabética contra la población no diabética, esto para el polimorfismo en cuestión. El fibrinógeno se comportó como una variable confusa.

Se sugiere que la población costarricense se comporta distinto al comportamiento descrito por la literatura. Para poder inferir resultados para la población costarricense hacen falta estudios más profundos sobre el comportamiento de esta población respecto al polimorfismo I/D, además de adecuar el tamaño de la muestra.

Justificación

Costa Rica es un país en el cual los padecimientos de tipo infeccioso han ido decreciendo en su prevalencia, el lugar que ocupaban estos, ahora se está empezando a llenar con padecimientos de tipo más crónico. Un claro ejemplo de lo anterior es la DM, que se está convirtiendo en una epidemia mundial de tipo crónico y nuestro país no es la excepción a esto: se ha convertido en una enfermedad de alta incidencia y prevalencia (Ayala et al., 2006). A pesar de lo anteriormente descrito, en Costa Rica aún enfrentamos muchos vacíos de conocimiento con respecto a los factores de riesgo y su distribución epidemiológica, así como la efectividad de las intervenciones que permitirían controlar estos problemas de salud, por lo cual la investigación sobre la realidad nacional en este rubro se hace indispensable. Los estudios disponibles en el ámbito nacional que caracterizan a la población con DM, y sus asociaciones genéticas, son escasos y en su gran mayoría han sido desarrollados en localidades específicas (Ayala et al., 2006). Los grupos de riesgo de padecer las patologías de tipo crónico han ido cambiando a través del tiempo, por lo que es indispensable implementar sistemas de vigilancia que faciliten la investigación, el análisis y monitoreo que permitan identificarlos. (OPS, 2003)

Los marcadores de salud costarricense arrojan datos propios de un país desarrollado gracias, principalmente, a las mejoras que se han implementado en el sistema de salud tales como elevada cobertura de servicios y la asignación de una proporción del PIB en salud que ronda el 6% (CONARE, 2007) Estos esfuerzos han dado sus frutos en cuanto a la esperanza de vida de los costarricenses, la cual ha aumentado con el paso del tiempo: en la pirámide de población se observa que la estructura de Costa Rica ha cambiado dramáticamente en los últimos años, se redujo la cantidad de las personas más jóvenes (0-14 años) y se incrementó la proporción de personas con 65 años o más, esto es un parámetro importante para el estudio dado que el envejecimiento de la población está asociado con el incremento en el padecimiento de enfermedades de tipo crónico como lo es la DM (OPS, 2003).

Existe un componente genético en la DM, el daño no está en un sólo gen: se han descrito diferentes loci asociados al padecimiento de DM. Resulta de gran utilidad el

encontrar o descartar polimorfismos con ciertos padecimientos propios de la DM, esto para prevenir complicaciones o dar consejo genético a los pacientes para así alivianar la carga de esta enfermedad. Para el manejo de esta enfermedad sería, aún mejor, poder contar con un “marcador de complicaciones” que permita tomar medidas preventivas, el desarrollo de esquemas de tratamiento para evitar o retardar su aparición en el paciente diabético y, además, poder brindar mejoras en la calidad de vida de este grupo de pacientes.

En el ámbito académico, universitario y social, esta investigación será de gran beneficio al promover el estudio de las enfermedades crónicas y, de esta manera, repercutir en la docencia e investigación universitaria, permitir una proyección en el sistema de salud y contribuir a la salud de las comunidades. Todo esto corresponde a una manera de promover el bienestar de la sociedad costarricense y reafirmar el compromiso de la Universidad con el país.

Objetivos del proyecto

Objetivo principal

Analizar los polimorfismos I/D del gen ECA y su asociación con las complicaciones diabéticas en pacientes con DM-2 de los EBAIS de Montes de Oca y Tres Ríos.

Objetivos secundarios

- Investigar la frecuencia del polimorfismo del gen de la ECA en los pacientes diabéticos estudiados.
- Comparar la frecuencia del polimorfismo de la ECA en los pacientes analizados con: HTA, nefropatía, dislipidemia y cardiopatía isquémica.
- Analizar las alteraciones en los valores de Fgo en los pacientes diabéticos y explorar si existe alguna asociación con el polimorfismo I/D del gen ECA.

Antecedentes

Con los nuevos avances tecnológicos en el campo de la salud, las enfermedades a las que los humanos se enfrentan ha cambiado con el tiempo: se ha pasado de un período en el que el principal problema eran las enfermedades infecciosas, a uno en el que se han logrado controlar la mayoría de éstas y las principales patologías son las de tipo crónico como el cáncer, la hipertensión arterial y la DM (Ayala et al., 2006). Inclusive, se han descubierto asociaciones tan fuertes entre distintos padecimientos como lo es la resistencia a la insulina, la hipertensión arterial, la obesidad y la dislipidemia que algunos piensan que estas entidades son en verdad distintas partes de un único problema llamado síndrome metabólico (Rodríguez et al., 2008). Muchas investigaciones actualmente se dirigen a buscar aún más asociaciones entre estos padecimientos de origen metabólico; de esta manera tratando de armar el rompecabezas de interacciones moleculares que actualmente la ciencia está tratando de solucionar.

Para el adecuado funcionamiento del organismo, todas las células del cuerpo deben captar los nutrientes provenientes de la dieta que circulan por las vías sanguíneas. Esta labor se cumple satisfactoriamente gracias a un equilibrio muy bien regulado entre nutrientes, hormonas transportadoras y receptores celulares para estas hormonas. En caso de que se rompa este equilibrio, en cualquier punto, se podrían desencadenar fenómenos patológicos en prácticamente cualquier sistema fisiológico, dado que las células se quedarían sin abastecimiento de los recursos necesarios para una adecuada funcionalidad (Berne et al., 2001).

Una situación en la que se rompe el equilibrio es en la diabetes, que se refiere a un conjunto de trastornos que comparten la característica principal de provocar niveles elevados de glucosa en la sangre. La hiperglicemia es causa directa de diversas complicaciones en el organismo (Olefsky, 2001). Dicha patología se debe a una cantidad de insulina disminuida o nula, o la incapacidad de los receptores de insulina en las células para responder adecuadamente ante la presencia de ésta (Beckham et al., 2006).

La insulina es una hormona anabólica producida en las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas, que interviene en el aprovechamiento metabólico de los nutrientes, principalmente, en el anabolismo de los carbohidratos (Berne et al., 2001).

Marco teórico

Diabetes Mellitus

La Diabetes mellitus es un conjunto de desórdenes metabólicos que comparten en común el fenotipo de hiperglicemia. Hay distintos tipos de diabetes y corresponden a una compleja interacción de genes, el ambiente y estilos de vida.

Los factores que contribuyen a la hiperglicemia pueden deberse a una secreción disminuida o ausente de insulina, utilización de la glucosa disminuida o producción de glucosa aumentada.

La falta de regulación del metabolismo de la glucosa causa diversos cambios fisiopatológicos en múltiples órganos. Estos se comentarán más adelante (Kasper et al, 2006).

Tipos de Diabetes

Una de las clasificaciones de la diabetes más utilizadas es la siguiente (Alberti et al., 2004):

I. Diabetes tipo 1: en la cual hay una destrucción de células β , llevando a la deficiencia absoluta de insulina.

A. Inmune.

B. Idiopática.

II. Diabetes tipo 2: que puede ser por resistencia a la insulina con deficiencia relativa de insulina o a ser predominantemente por defecto en la secreción con resistencia a la insulina.

III. Otros tipos específicos:

A. Defectos genéticos en la función de la célula beta:

1. Cromosoma 12 (MODY3).

2. Cromosoma 7, glucokinasa (MODY2).

3. Cromosoma 20 (MODY1).

4. Cromosoma 13, factor promotor de la insulina-1 (IPF-1; MODY4).
5. Cromosoma 17 (MODY5).
6. Cromosoma 2 (MODY6).
7. ADN mitocondrial.
8. Otros.

B. Defectos genéticos en la acción de la insulina:

1. Resistencia a la insulina de tipo A.
2. Leprechaunismo.
3. Síndrome de Rabson-Mendenhall.
4. Diabetes lipoatrófica.
5. Otros.

C. Enfermedades del páncreas exocrino:

1. Pancreatitis.
2. Trauma/pancreatectomía.
3. Neoplasia.
4. Fibrosis quística.
5. Hemocromatosis.
6. Cálculos.
7. Otros.

D. Endocrinopatías:

1. Acromegalia.
2. Síndrome de Cushing.
3. Glucagonoma.
4. Feocromocitoma.
5. Hipertiroidismo.

6. Somatostatinoma.

7. Aldosteronoma.

8. Otros.

E. Inducido por químicos o drogas:

1. Vacor.

2. Pentamidine.

3. Ácido nicotínico.

4. Glucocorticoides.

5. Hormona tiroidea.

6. Diazóxido.

7. Agonistas β - adrenérgicos.

8. Tiazidas.

9. Dilantín.

10. Interferón alfa.

11. Otros.

F. Infecciones:

1. Rubéola congénita.

2. Citomegalovirus.

3. Otros.

G. Formas poco comunes de diabetes autoinmune:

1. Síndrome del hombre rígido.

2. Anticuerpos contra el receptor de insulina.

3. Otros.

H. Otros síndromes genéticos asociados con diabetes.

IV. Diabetes mellitus gestacional

Existe, además, un estado llamado pre-diabetes, el cual es un cuadro donde se contempla a las personas con intolerancia a los carbohidratos y glicemia alterada en ayunas y al azar, pero que no llega a niveles tan altos de glucosa en sangre como para ser diagnosticado como diabetes; no todas las personas con estos síntomas llegan a padecer de DM, algunas pueden alcanzar una glicemia normal con solo un cambio en su estilo de vida. Hoy día se empieza a considerar como un estado diabético silente en el cual el paciente no presenta todos los síntomas clásicos de la diabetes, pero se ha asociado fuertemente con altos riesgo de padecimiento cardiovascular (ADA, 2004).

La DM-1 se da, principalmente, en personas jóvenes de ahí que se le conozca también como diabetes de comienzo juvenil. Se desarrolla por la destrucción total de las células beta con una consecuente producción nula de insulina, es por ello que también se le conozca como diabetes insulino-dependiente. La causa exacta no se conoce aunque se asocia con el estrés, infecciones, toxinas, desórdenes inmunológicos y diversos genes. Es mucho menos frecuente que la DM-2: uno de cada 20 diabéticos padece DM-1 (Guerrero, 2007).

La DM-2 se presenta con más frecuencia en edades avanzadas y se asocia sobretodo con obesidad, aunque también se relaciona con factores genéticos, hormonales y ambientales. Se produce por la incapacidad de las células de interactuar con la insulina y como resultado se produce una incapacidad de la glucosa de ingresar a las células, aunado a esto, la deficiente secreción de insulina por parte del páncreas. Es común que la aparición de este tipo de DM sea paulatina, por el normal deterioro del páncreas con el paso del tiempo. El 90-95% de los diabéticos presentan DM 2 (Olefsky 2001).

Epidemiología

Hoy día en el mundo entero se cuentan más de 143 millones de personas con DM (Roselló-Araya et al., 2004) convirtiendo este padecimiento en uno de los principales problemas de salud mundial, ya que implica grandes costos económicos por evolución de la enfermedad por el tratamiento, sino por la mortalidad temprana

invalidez laboral y costos asociados a las complicaciones propias de la DM. Las hospitalizaciones por urgencias en diabéticos son 4 veces más frecuentes comparado con la población en general, a pesar de que esta última cifra podría ser drásticamente disminuida con una educación adecuada (Hart et al., 1998).

En Estados Unidos, entre un 6 y un 7 por ciento de la población es diabética (aproximadamente 16 millones de personas); la Diabetes para ese país es la sexta causa más frecuente de muerte y en 1997 murieron 193 000 personas debido a esta enfermedad, sin embargo, este valor está subestimado porque la Diabetes contribuye a las muertes por otras causas, como las enfermedades cardiovasculares (Olefsky, 2001). La Diabetes es una enfermedad que resulta costosa económicamente en el sistema de salud (en el 2002 en Estados Unidos se gastaron 132 mil millones de dólares) y, además, la incidencia y prevalencia en el mundo está en aumento (Jones et al., 2006).

Situación en Costa Rica

En Costa Rica, a pesar de no tener una encuesta directa se calcula que para el año 1998 la prevalencia de DM auto-reportada era de 4,8% en las personas de 20 años y más, para el año 2006 se estimó que el porcentaje de pacientes diabéticos llegaba al 5,3% en la población de 20 años y más (Ayala et al, 2006), poniéndose de manifiesto la importancia que ha cobrado la enfermedad con el pasar de los años para las autoridades de salud en Costa Rica. Si se divide la población por edades, la prevalencia para los mayores de 40 años es de un 9,4% y para adultos mayores en un 23,4% (Brenes, 2007).

Según la encuesta CARMEN (OPS, 2009) para la población diabética el porcentaje por sexos indica que la prevalencia es mayor en mujeres (3,4%) que en hombres (2,2%), la edad promedio de muerte son los 65 años, además, se sabe que la prevalencia de DM es más baja en las áreas rurales, tanto dentro como fuera del Valle Central (Ministerio de Salud, 2002). En el caso del área urbana se presentó una cifra de 10,2% tanto fuera como dentro del Valle Central (Ministerio de Salud, 2003). A pesar del incremento en el número de diabéticos, no se cuenta con datos oficiales

constantemente actualizados, ni estudios que profundicen sobre la realidad de esta población en Costa Rica.

Complicaciones

Dentro de las complicaciones más frecuentes se encuentran la dislipidemia, la nefropatía y las alteraciones vasculares dentro de las cuales caben la hipertensión y la cardiopatía isquémica. Además, la diabetes es la mayor causa de amputaciones de miembros y en el embarazo, una mujer diabética tiene cinco veces más posibilidades de que su hijo tenga alguna malformación (Olefsky, 2001).

Nefropatía

La nefropatía está presente entre el 3 y el 35% de los pacientes diabéticos (Goday, 2002), la diabetes produce lesiones en los riñones que son inconfundibles con otra enfermedad. En Estados Unidos el 40% de las insuficiencias renales terminales se deben a diabetes (Olefsky, 2001).

La nefropatía en DM es un síndrome caracterizado por: aumento de la presión arterial, alteraciones en la función endotelial y por aumento en los lípidos junto con albuminuria persistente en más de 300 miligramos en 24 horas, disminución lenta y constante de la tasa de filtración glomerular y alteraciones de las pruebas de función renal como NU y creatinina lo cual es muy indicativo de daño renal. (Gross, 2005).

Macrovasculares y de coagulación

Las personas diabéticas tienen un riesgo de 2 a 4 veces mayor que la población general de desarrollar enfermedad arterial coronaria y tienen un riesgo de sufrir un infarto agudo de miocardio tan elevado como aquella persona que ya ha tenido uno (Beckham et al., 2002).

En la diabetes, la hiperglicemia, el exceso de ácidos grasos libres y la resistencia a la insulina interfieren con la función normal de la célula endotelial (figura 1), aumentan la vasoconstricción y la inflamación, además, promueven la trombosis. Disminuye el óxido nítrico mientras que aumentan la endotelina-1 y la angiotensina II: esto conlleva

a un aumento del tono vascular y a la proliferación y migración del músculo liso. Además, se activan los factores de transcripción nucleares como por ejemplo el NF- κ B que induce la expresión de genes inflamatorios, con liberación de quimioquinas que atraen a leucocitos y, de esta manera, se producen citocinas inflamatorias y se aumenta la expresión de moléculas de adhesión celular. También, se aumenta la producción del factor tisular y del inhibidor del activador del plasminógeno 1, creando un entorno protrombótico, mientras que disminuye el óxido nítrico y aumenta la prostaciclina. Asimismo, se ha visto que la diabetes aumenta los factores de la coagulación, como el factor VII y disminuye algunos agentes anticoagulantes, como la antitrombina III y la proteína C (Beckham et al, 2002).

La cardiopatía diabética es una realidad demostrada por estudios epidemiológicos, clínicos, necróticos y experimentales; su repercusión clínica es la insuficiencia cardíaca congestiva. A pesar de que el paciente no presente clínica alguna, ya existen algunas alteraciones morfo-funcionales del miocardio. Es importante resaltar que este tipo de padecimiento no depende del tiempo de evolución de la DM, por esta razón no es necesario enfocarse en población de edades avanzadas para encontrar dicha afección. (www.portalesmedicos.com, 2007)

Con frecuencia las personas que padecen DM también sufren de obesidad además de trastornos en el metabolismo de los lípidos, los cuales son factores de riesgo de la aterosclerosis. Algunos autores han relacionado el padecimiento de DM con niveles elevados de Fgo, lo cual explicaría la gran cantidad de personas diabéticas que en el transcurso de su vida sufren de enfermedad aterosclerótica. El Fgo juega un papel importante en el desarrollo de alteraciones que caracterizan la dislipidemia diabética como lo son el HDL-colesterol disminuido y los triglicéridos aumentados (Pérez et al, 2004). Se ha demostrado una asociación directa entre los niveles plasmáticos elevados de Fgo y el aumento de cardiopatía isquémica, por esa razón el Fgo se puede tomar como un parámetro ya conocido que se asocia directamente con padecimientos cardiovasculares. (www.portalesmedicos.com, 2007)

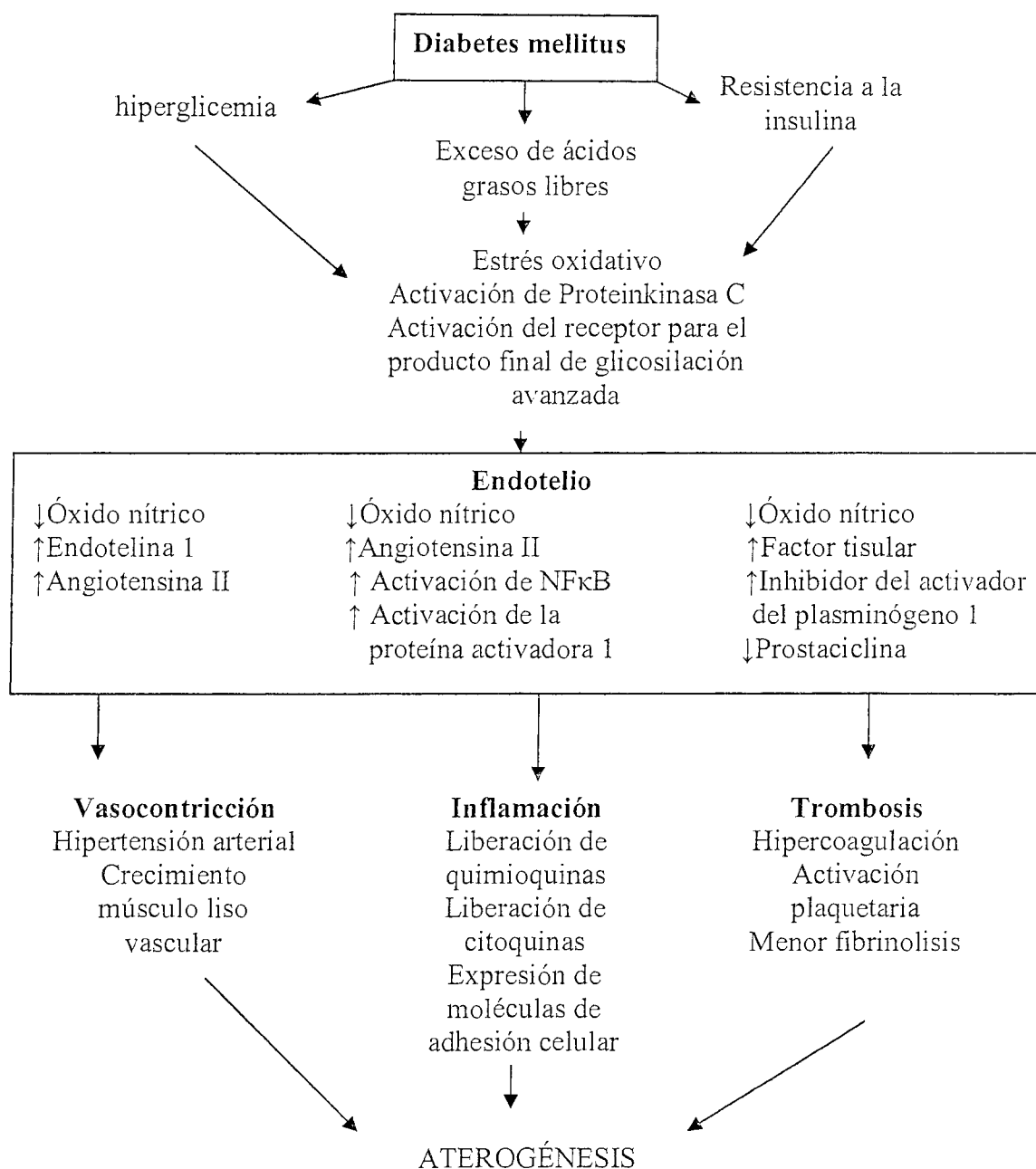


Figura 1: Resumen de las alteraciones vasculares y de la coagulación en la DM (Traducido de Beckham et al., 2002)

Asociaciones con otros padecimientos

La DM, específicamente la tipo 2, no es una entidad que se presenta sola en la población. Suele estar acompañada de obesidad, hipertensión arterial, y dislipidemia.

También hay una fuerte asociación con la microalbuminuria, alteraciones en la fibrinólisis y la coagulación. Los mecanismos moleculares que conectan estas entidades y que expliquen el por qué de su relación todavía son desconocidos. Se ha propuesto como mediadores al factor de necrosis tumoral alfa, la interleucina 6, el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1, la proteína c reactiva, las catecolaminas y la enzima convertidora de angiotensina entre otros (Eisenman et al, 2009; Quirós et al., 2006; Rodríguez et al., 2008)

Enzima convertidora de angiotensina

El sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) consiste en una cascada de interacciones que culminan con la producción de angiotensina II (AngII), que es el péptido responsable de los efectos de este eje fisiológico. La ECA es una proteína que se tiene evidencia que puede tener efectos pleiotrópicos y tener un rol en diversos padecimientos y no sólo en la hipertensión arterial (Mauer et al, 2001). La enzima convertidora de angiotensina es una enzima reguladora del SRAA. Gracias a la activación de la ECA se da la conversión de la angiotensina I en angiotensina II, que es un vasoconstrictor. A la ECA también se le conoce la función de inactivar la bradiquinina y la kalicreína, moléculas vasodilatadoras. Por estos efectos la ECA es una enzima que aumenta la presión arterial. (Eisenman et al., 2009).

El gen de la ECA está localizado en el cromosoma 17 q23 y contiene un polimorfismo que puede ser una inserción (I) o una delección (D) de 287 pares de bases en el intrón 16. El genotipo DD ha sido asociado a mayores niveles de ECA y una actividad 4 veces mayor que los II (Coto, 2001), además de mayores niveles de presión arterial, obesidad y riesgo cardiovascular aumentado (Eisenman et al., 2009). Otros estudios sugieren que el polimorfismo ID es un factor agresor para desarrollar daño renal en diabetes tipo I (Marre et al., 1997)

Procedimientos y metodología

La presente investigación es de tipo transversal porque se analizaron individuos que, en el momento del análisis, presentaban diabetes y algunos de estos padecían complicaciones derivadas de esta enfermedad.

Además, es de tipo analítico, porque se ha sugerido, pero no se ha confirmado, que haya asociación del polimorfismo I/D de la ECA en pacientes diabéticos (Feng et al, 2002).

Pacientes

Los pacientes del estudio corresponden a aquellos pacientes diabéticos que sean atendidos en las zonas cubiertas por los EBAIS dentro del programa PAIS del convenio CCSS-UCR del área de Montes de Oca, Curridabat y Tres Ríos (Tirrases, José María Zeledón, Cipreses-Guayabos, Granadilla, Curridabat Centro y Hacienda Vieja, de Curridabat; San Ramón, Barrio Los Ángeles de Concepción, Concepción Este, San Diego, San Juan y Villas de Ayarco; y Mercedes, Vargas Araya, Barrio Pinto, Lourdes y San Rafael, de Montes de Oca), durante el período de marzo 2007 hasta julio 2008. Es importante destacar que debido a la imposibilidad de visitar todos los EBAIS de las zonas en estudio el mismo día, se seleccionó al azar un EBAIS cada día que se hizo la visita, además por imposibilidad de horario no se pudo obtener una misma cantidad de pacientes de cada EBAIS.

Se aceptó todo paciente diagnosticado como diabético que deseara participar voluntariamente en el proyecto y que expresara esto mediante la Fórmula de Consentimiento Informado (ver anexos) elaborada para explicarles los propósitos del estudio, lo que se les realizaría y los riesgos y beneficios que involucraba su participación. Cada individuo debió firmar este documento (proyecto número 807-A5-311, aprobado según el documento VI-8163-2008) para poder ser incluido dentro de la investigación según lo estipula la Comisión de Bioética de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.

Estudios realizados

Obtención y estabilidad de las muestras

Al paciente se le extrajo una muestra de sangre por venopunción, la cual se colectó en un tubo con anticoagulante (citrato).

Con el fin de garantizar la estabilidad en la muestra, ésta se conservó en refrigeración desde que fue extraída y se procedió a separar el plasma de las células sanguíneas lo más pronto posible luego de tomada la muestra, esto para prevenir la hemólisis de los eritrocitos.

Análisis genético-molecular

Aislamiento de ADN: se obtuvo siguiendo el método estándar de precipitación con NaCl descrito por Miller et al (Miller et al, 1988).

El estudio de la mutación I/D del gen ECA en los pacientes se desarrolló mediante la PCR del intrón 16 del gen de la de la ECA, según el protocolo descrito por Rigat (Rigat et al., 1992), obteniendo un fragmento de 190 pb en ausencia de la inserción (alelo D) y un fragmento de 490 pb en presencia de la inserción (alelo I); los individuos heterocigotos presentan ambas bandas (I/D). Para evitar falsos positivos del genotipo DD, se realizó una segunda amplificación según lo descrito por Odawara et al (Odawara, 1997), procurando la obtención de una banda de 300pb para el genotipo heterocigoto (I/D) y para el homocigoto del alelo deleción (D/D) una banda de 200pb (ver figura 2). Las bandas obtenidas se analizaron en geles de poliacrilamida, por medio de electroforesis.

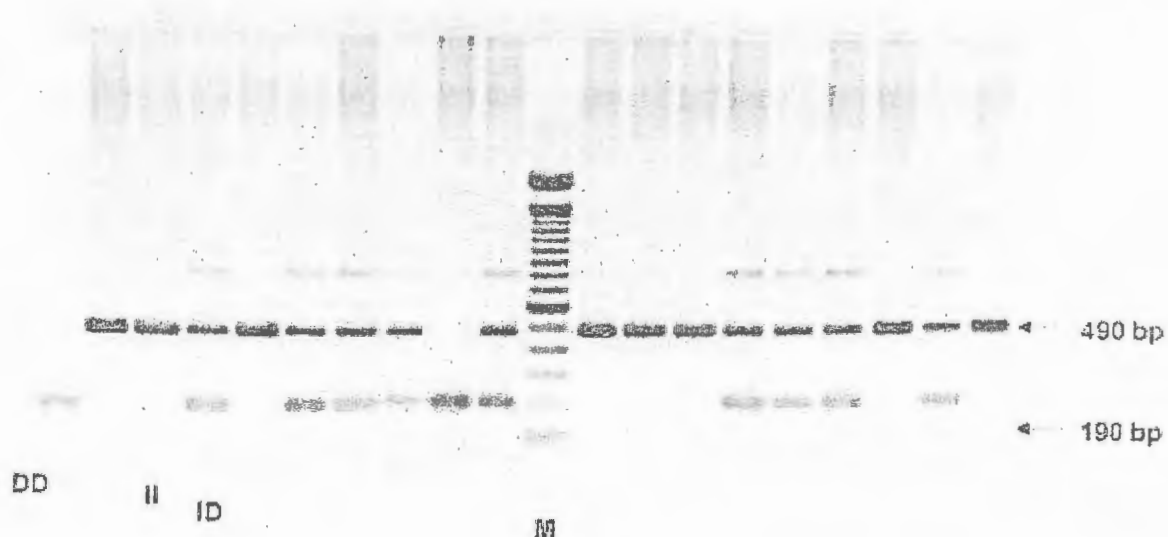


Figura 2. Polimorfismo de intrón 16 de la ECA (Lizaraso et al., 2002)

Las muestras se guardaron en el banco de ADN del CIHATA, el cual está registrado en la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica. Los datos de los controles fueron extraídos del banco de controles de ADN del CIHATA pareándose por sexo con las muestras de los pacientes diabéticos.

Análisis de coagulación

El plasma, al no poder ser utilizado inmediatamente se congeló a -70°C para ser analizado antes de un plazo máximo de dos meses. Posterior a la extracción del plasma, éste se procesó para obtener los valores de Fgo plasmáticos según el método descrito por Clauss en 1957. (Sáenz, 2003)

Análisis de los datos

La unidad de estudio son los casos, los cuales son los individuos que aceptaron ser parte del estudio que accedieron a que se le extrajeran dos tubos de sangre, además de haber completado la información solicitada por la entrevista, además de haber leído y firmado el consentimiento informado. La población de estudio son tanto los individuos incluidos en el grupo de los casos como los incluidos en el grupo controles.

Como se menciona previamente, para obtener la información de las personas se diseñó un instrumento de recolección de datos o encuesta que contiene una serie de preguntas estructuradas de manera tal que permita obtener datos relacionados con las características sociodemográficas, enfermedades o padecimientos de los individuos incluidos en el estudio para llevar a cabo el estudio. Paralelamente se llevaron a cabo las pruebas de laboratorio, con la información obtenida según los resultados de las pruebas efectuadas se terminó de completar la base de datos del estudio. La información obtenida gracias a la entrevista y las pruebas de laboratorio se digitalizó y de esta manera se llevó un registro de información en una hoja de cálculo electrónico (Excel) y luego se procedió a realizar el análisis de los datos con la ayuda de la herramienta computacional Epi-Info6d.

Además se utilizó un modelo logístico binomial, por medio de la herramienta computacional SPSS para Windows versión 13.0 (SPSS Inc, Chicago, USA); con el fin de determinar una relación entre el riesgo de tener diabetes según algunos factores de riesgo. (Agresti, 2002)

Por último se determinaron las frecuencias alélicas del polimorfismo según la ley de Hardy-Weinberg (HW), se determinó si cumplían con el equilibrio propuesto por la ley de HW usando la prueba de χ^2 .

Resultados

En total se trabajó con una población de 225 individuos, de los cuales 109 corresponden a casos y 116 a controles. En ambos grupos existió una marcada mayoría de mujeres; para los controles 86 (74%) de los individuos son mujeres, mientras que 73 (67%) de los individuos de los casos son mujeres.

Se comparó la cantidad de individuos del estudio que sufrieron eventos cerebrovasculares en ambos grupos sin obtenerse una diferencia significativa entre el número de casos y el número de controles que padecieron dicha patología (ver cuadro 1). Resultados similares se obtuvieron para el caso de la cardiopatía isquémica, en este caso 4 individuos del estudio no suministraron esta información al llenar la entrevista (ver cuadro 1), no obstante no hay diferencia significativa entre el número personas que padecían esta enfermedad en ambos grupos. En el caso de la dislipidemia los resultados no varían con los resultados anteriores, no hay diferencia en la cantidad de individuos dentro del estudio que la presenten en ninguno de los dos grupos analizados (ver cuadro 1).

Igualmente se comparó la cantidad de individuos que presentaron HTA en cada grupo de estudio, en este caso sí existe una diferencia significativa. En el grupo de los casos existe una gran cantidad de individuos que padecen de HTA lo cual es esperable, hubo dos individuos que no suministraron esta información en la entrevista (ver cuadro 1).

No existe diferencia significativa entre los casos y los controles en cuanto al padecimiento de nefropatía, hubo un individuo que no suministró esta información en la entrevista (ver cuadro 1).

Cuadro 1: Número de individuos de la población estudiada que presentaron eventos cerebrovasculares (AVC), cardiopatía isquémica, HTA, nefropatía y/o dislipidemia

Complicación		Casos	Controles	Total
AVC	Presente	6	0	6
	Ausente	103	116	219
	Total	109	116	225
	(p>0,05)			
Cardiopatía	Presente	19	3	22
	Ausente	89	110	199
	Total	108	113	221
	(p>0,05)			
Dislipidemia	Presente	22	17	39
	Ausente	87	99	186
	Total	109	116	225
	(p>0,05)			
HTA	Presente	75	8	83
	Ausente	34	106	140
	Total	109	114	223
	(p<0,05)			
Nefropatía	Presente	16	0	16
	Ausente	92	116	208
	Total	108	116	224
	(p>0,05)			

En la figura 3 se observa cómo se comportaron los grupos de estudio en cuanto al polimorfismo I/D del gen ECA, existe un mayor número de controles con el polimorfismo I/D sin que esto llegue a ser significativo. En el grupo de los casos ningún polimorfismo mostró un comportamiento dominante, siendo prácticamente el mismo número de individuos para cada polimorfismo.

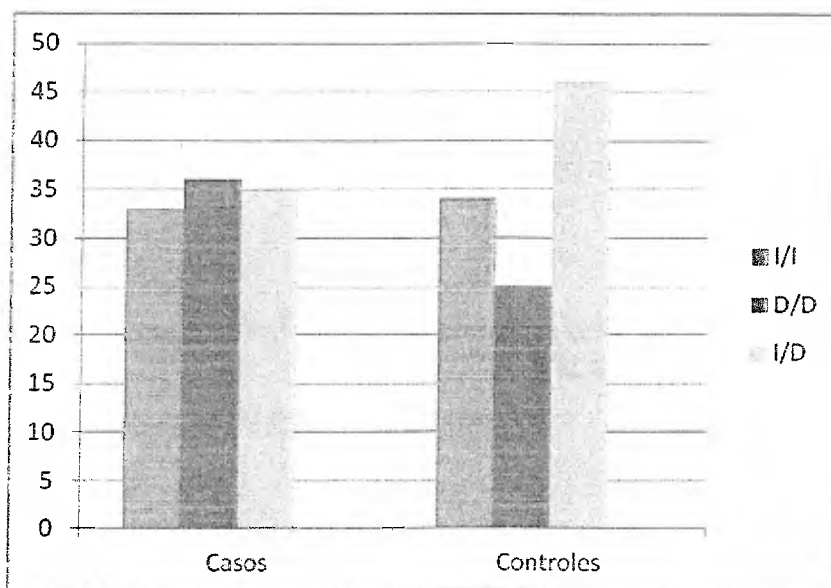


Figura 3: Polimorfismo de la ECA en casos vs controles

Se buscó la relación entre el padecer o no eventos cerebrovasculares y polimorfismo de la ECA de cada individuo estudiado, no existe diferencia significativa entre ninguno de los 3 polimorfismos para esta patología (ver cuadro 2). Un comportamiento similar se observó a la hora de buscar una relación entre el polimorfismo de la ECA y el padecimiento de: cardiopatía isquémica (ver cuadro 3), dislipidemia (ver cuadro 4), HTA (ver cuadro 5) y nefropatía (ver cuadro 6).

Cuadro 2: Número de individuos que presentan eventos cerebrovasculares según el polimorfismo de la ECA

ACE	AVC		Total
	Si	No	
I	2	64	66
D	1	60	61
I/D	3	78	81
Total	6	202	208

(p=0,7647)

Cuadro 3: Número de individuos que presentan cardiopatía isquémica según el polimorfismo de la ECA

ACE	Cardiopatía		Total
	Si	No	
I	9	55	64
D	6	54	60
I/D	5	76	81
Total	20	185	205

(p=0,2818)

Cuadro 4: Número de individuos que presentan dislipidemia según el polimorfismo de la ECA

ACE	Dislipidemia		Total
	si	no	
I	16	50	66
D	8	53	61
I/D	11	70	81
Total	35	173	208

(p=0,1493)

Cuadro 5: Número de individuos que presentan HTA según el polimorfismo de la ECA

ACE	Hta		Total
	Si	No	
I	27	37	64
D	22	39	61
I/D	26	55	81
Total	75	131	206

(p=0,4547)

Cuadro 6: Número de individuos que presentan patología renal según el polimorfismo de la ECA

ACE	Nefropatía		Total
	Si	No	
I	2	64	66
D	8	52	60
I/D	6	75	81
Total	16	191	207

(p=0,0955)

También se buscó si existe o no asociación alguna entre el polimorfismo de la ECA y el padecer o no DM, obteniéndose una p de 0,3346, lo cual nos indica que no hay una diferencia significativa para ninguno de los polimorfismos estudiados (ver cuadro 7).

Cuadro 7: Número de individuos que presentan DM según el polimorfismo de la ECA

ACE	DM		Total
	Si	No	
I	34	31	65
D	35	26	61
I/D	36	44	80
Total	105	101	206

(p=0,3346)

Al realizar un χ^2 comparando la variable Fgo con el polimorfismo DD, se obtuvo una $p=0,026118936$ lo cual nos indica que el polimorfismo DD está asociado con valores alterados de Fgo. Lo cual hace esperable el hecho de que el polimorfismo DD

se asocie aparentemente con algunas de las complicaciones de la diabetes (ver cuadro 8), al ser una variable confusa.

Cuadro 8: Modelo de regresión logística para evaluar la contribución del polimorfismo de la ECA en la aparición de la DM

	B	Sig.	Exp(B)
I/I		0,060837852	
D/D	0,748717032	0,026118936	2,11428571
I/D	0,565794694	0,096795452	1,76084656
Constant	-0,395895657	0,07018065	0,67307692

($r^2=0,03583077$)

Las frecuencias alélicas del polimorfismo en los controles cumplen con el equilibrio HW. El polimorfismo I/D no cumple con el equilibrio HW ($\chi^2=10,3673$; gl 2; $p=0.005$).

Por último se encontró que entre los 116 individuos que componen el grupo controles, el 68% son individuos con niveles de Fgo plasmático normales mientras que 29% del mismo grupo son individuos con niveles alterados de Fgo plasmático. En el caso del grupo casos se halló que de 109 individuos el 72% presentó niveles alterados de Fgo plasmático, mientras que un 22% tenía niveles normales de Fgo plasmático.

Discusión

Las personas que padecen DM además de poseer un metabolismo de la glucosa alterado, frecuentemente sufren de otros padecimientos que parecen no tener relación con el desorden antes mencionado. Estos padecimientos al ser tan frecuentes en la población diabética son denominados complicaciones de la diabetes y para interés del presente estudio tendríamos: HTA, cardiopatía isquémica, nefropatía, AVC y la dislipidemia. (Bishop et al, 2007)

Podríamos indicar que el estilo de vida posee factores que afecta indirectamente la aparición de la DM, o complicaciones de la misma porque el tener un genotipo que predispone a un individuo a padecer dicha enfermedad y se le suma a esto estilos de vida que predisponen a padecer la misma, se estaría ampliando las posibilidades de sufrir dicha afección.

En esta investigación se encontró diferencia significativa en relación a la edad, debido a que la edad promedio los casos es 52. en comparación con la de los controles que es 42, idealmente, en un estudio de casos y controles las variables edad y sexo, entre ambos grupos no debería diferir significativamente esto dado que se busca comparar grupos en condiciones semejantes; pero en el caso de un estudio genético la edad no es un determinante de peso ya que cada individuo posee un determinado genotipo desde que nace y el mismo no varía con la edad.

El porqué de la fuerte asociación entre el padecer DM y cualquiera de las complicaciones antes mencionadas no está del todo claro y aún no hay una explicación convincente y que integre los mecanismos fisiopatológicos por los cuales se producen estas alteraciones tan frecuentemente en esta población (Kasper et al, 2006). Últimamente se ha propuesto que todo obedezca a un mismo síndrome (Quirós et al, 2006), de ésta manera se debe ver a la DM como un signo más y no como una enfermedad aislada; hoy día se están empezando a buscar respuestas en la composición genética de los individuos, para así establecer relaciones entre padecimientos de la población y genotipos de la misma (Tusié, 2000). Es así que Sayed y colaboradores (2006) proponen que los polimorfismos del gen ECA se asocian directamente con la presencia o ausencia de algunas de estas complicaciones.

Determinar si las frecuencias alélicas cumplen con la ley del equilibrio de Hardy-Weinberg es una pieza clave cuando se realizan estudios de asociación, entre polimorfismos genéticos y la enfermedad, más aún en estudios de casos y controles (Llorca et al, 2005). Para este tipo de estudio se utiliza la población propuesta por HW como un referente de comparación, entre las frecuencias alélicas obtenidas en el estudio y las esperadas. Las frecuencias alélicas del polimorfismo I/D de la ECA del grupo de los casos no cumplen con el equilibrio propuesto por HW esto es esperado porque se está sometiendo a la población a una fuente de cambio, como lo es la mutación.

Hay reportes donde se indica que los eventos cerebrovasculares son mucho más frecuentes en personas diabéticas que en individuos sanos. (Beckham et al., 2002) En esta investigación los únicos que presentaron ECV fueron los diabéticos. En cuanto al polimorfismo de la ECA y su asociación con ECV, esta investigación no muestra asociación del uno con el otro y los datos señalan que los daños endoteliales y el estado protrombótico que existen en la diabetes se debe a otros factores que no son este gen. Similares resultados se pueden encontrar en la literatura, dándole mucho mayor peso a este hallazgo (Catto et al, 1996)

La literatura indica que en la secuencia del alelo I en el polimorfismo I/D, tiene una secuencia similar a un "silenciador", esto podría explicar la asociación del alelo D con niveles elevados de ECA en plasma, produciendo HTA (Carluccio et al 2001; Ganong 2004; Niu et al 2002); en la población estudiada se mostró este comportamiento levemente. La presencia o ausencia de HTA no mostró diferencia estadística al compararlo contra los 3 polimorfismos estudiados, sin embargo, mediante el modelo de regresión logística aplicado, el polimorfismo D/D es significativo en cuanto a la disposición a desarrollar diabetes, pero apenas logra explicar esta variable en un 3,58% de la variabilidad, por lo que el peso importante de la etiología de la DM recae en otros factores. Una idea que surge es que tal vez el polimorfismo D/D es una variable confusa a la hora de estudiar el polimorfismo I/D de la ECA, esto significa que posiblemente existe otra variable, que no se tomó en cuenta, además del polimorfismo I/D que realmente influye sobre el padecimiento o no de la DM y sus complicaciones entonces el efecto de padecer o no DM y sus complicaciones se asocia

a este factor no contemplado en el estudio y que por lo tanto no se conoce. Este hallazgo también puede deberse al tamaño de la muestra que para fines de un estudio genético como el presente estudio, resulta muy pequeño tomando en cuenta la cantidad de variables e información que se analiza. También, se podría deber a que la población estudiada no presenta una verdadera relación entre HTA y el polimorfismo de la ECA, lo cual se evidencia en los resultados obtenidos, donde se observa que no hay mucha diferencia tanto en los polimorfismos expresados en la población como la relación de estos polimorfismos con la presencia de HTA (p y OR); Mondry y colaboradores (2005) obtuvieron resultados similares al presente estudio con un tamaño de muestra mayor, lo cual sustenta la idea de que no hay relación entre HTA y la ECA en la población estudiada.

Niu y colaboradores (2002) concluyeron que el polimorfismo D/D podría aumentar el riesgo a desarrollar IAM ya que se produce cuando ocurre una trombosis coronaria ó cuando se rompe una placa arteriosclerótica y se relaciona con aumento de la concentración de ECA plasmática y esta se ha asociado a la presencia del genotipo D/D. Los grupos estudiados no mostraron significancia hacia los polimorfismos analizados lo cual refuerza la idea de que la población estudiada se comporta de manera diferente al menos en cuanto al polimorfismo I/D de la ECA en comparación con otros estudios debido a que son poblaciones con orígenes étnicos diferentes y cuyos estilos de vida difieren cuantiosamente o que el tamaño de muestra debe ser mayor.

La nefropatía diabética no mostro inclinación alguna hacia ninguno de los polimorfismos en cuestión, el número de individuos con el polimorfismo D/D fue ligeramente mayor (ver cuadro 6), sin darle ninguna significancia estadística a este dato. La literatura no define claramente si existe o no una asociación entre algún polimorfismo y la nefropatía diabética, algunos autores afirman que el polimorfismo I/D se asocia directamente a la aparición de dicha complicación (Marre et al, 1997), mientras que otro grupo de investigadores no lograron encontrar asociación directa con el polimorfismo I/D ni con ninguno de los otros polimorfismos del gen ECA (Andersen et al, 2003).

Los resultados obtenidos pueden relacionarse con el hecho de que en el país ni en la zona centroamericana existe un estudio que analice las características genéticas de la población ni mucho menos su relación con ningún padecimiento. Se encuentran reportes de poblaciones asiática, europea y estadounidense; se refieren a poblaciones que poseen orígenes muy diferentes al de nuestro país

Como datos adicionales encontrados y que resultan de interés científico, aunque ya su asociación ha sido probada en numerosas ocasiones, es que la propensión de tener diabetes es 7 veces mayor en las personas con antecedentes de tabaquismo en comparación con la propensión de las personas que no tienen diabetes. El riesgo de tener diabetes es 30 veces mayor en las personas con antecedentes personales de hipertensión, en comparación con quienes no padecen diabetes. Este último dato es evidencia importante de que la diabetes y la hipertensión arterial son dos padecimientos con mucha asociación y que uno podría ser considerado factor de riesgo del otro (Quirós, 2006)

Finalmente, es importante anotar que en futuros estudios se recomienda realizar una investigación en la cual el número de muestra sea mayor y acorde con el tamaño de la población que se desea estudiar. También se debería de ampliar el estudio y abarcar otras áreas del país en las cuales la población se comporte de un modo diferente, genéticamente hablando; este punto es importante tomando en consideración la variabilidad de la población costarricense por ejemplo negros, zona de Guanacaste y zona del área metropolitana.

Conclusiones

Se concluye que para un 95% de confianza, en la población estudiada no se encontró asociación alguna entre los polimorfismos de la ECA y el padecimiento de DM. Así mismo, también con un 95% de confianza se puede afirmar que en la población estudiada no existe asociación alguna entre ninguno de los polimorfismos de la ECA y la aparición de complicaciones diabéticas.

Para una inferencia del polimorfismo del gen de la ECA sobre la población costarricense es necesario hacer un estudio más amplio en el cual se haga un adecuado muestreo, esto es tomando en cuenta parámetros epidemiológicos; una vez tenido un adecuado número de muestra y adecuada selección del lugar donde provienen cada individuo se debería proceder a establecer la variabilidad del polimorfismo en la población costarricense y después de esto se podría hacer una inferencia a la población costarricense sobre la relación del gen de la ECA en ciertas patologías.

Ya es conocido que los niveles de Fgo en la población diabética generalmente están alterados, este punto fue importante a la hora de analizar los datos y obtener una aparente asociación del polimorfismo DD sobre algunas de las complicaciones estudiadas. Al analizar este detalle a fondo se llegó a la conclusión que los individuos con el polimorfismo DD presentan una asociación con valores de Fgo alterados por esta razón el peso en la asociación para con las complicaciones señaladas lo tiene el Fgo, al restar el efecto de la variable Fgo el efecto real del polimorfismo no ofrecía un valor significativo.

Bibliografía

- Alberti K, Zimmet P, WHO consultation (2004). Definition diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetic medicine*, 15 (7): 539-553
- Agresti A (2002). *Categorical data analysis*. 2da ed. Editorial Wiley Series Probability and Statistics. Estados Unidos de América
- American diabetes association (2004). Prevention or Delay of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, jan27(1)
- Andersen S, Tarnow L, Cambien F, Rossing P, Juhl T, Deinum J, Parving H (2003). Long-term renoprotective effects of losartan in diabetic nephropathy: interaction with ACE insertion/deletion genotype? *Diabetes care*, 26 (5): 1501-1506
- Ayala N, Fernández A. León M. Villegas O (2006). Control de la diabetes en las personas atendidas en la Caja Costarricense de Seguro Social. CCSS, dic
- Beckham J, Creager M, Libby P (2002). Diabetes and Atherosclerosis Epidemiology, Pathophysiology, and Management. *JAMA*, 287(19):2570-2581
- Berne R, Matthew L (2001). *Fisiología*. 3ª ed. Ed Harcourt. España
- Bishop, M. 2007. *Química Clínica: Principios, procedimientos y correlaciones*. McGraw-Hill Interamericana, Quinta edición, México
- Boulton A, Kirsner R, Vileikyte L (2004). Neuropathic Diabetic Foot Ulcers. *N Engl J Med*, 351:48-55
- Brenes-Camacho G, Rosero-Bixby L (2007). Diabetes mellitus en adultos mayores costarricenses. *Población y Salud en Mesoamérica (en línea)*, 5 (1):2
- Carluccio M, Soccio M, De Caterina R (2001). Aspects of gene polymorphisms in cardiovascular disease: The renin-angiotensin system. *Eur J Clin Invest*, 31:476-488

- Catto A, Carter A, Barret J, Stickland m, Bamford J, Davies A, Grant P (1996). Angiotensin-converting enzyme Insertion/Deletion Polymorphism and cerebrovascular disease stroke. JAMA, 27:435-440
- Consejo nacional de rectores (2007). Estado de la nación en desarrollo humano sostenible. Nº XIV
- Coto E (2001). Polimorfismos del gen de la ECA y enfermedad cardiovascular. NEFROLOGÍA, 21(1):67-9
- Diabetes Care (2006). Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care, 29:S43-S48
- Eisenmann J C, Sarzynski1 M A, Glenn K, et al (2009). ACE I/D genotype, adiposity, and blood pressure in children. Cardiovascular Diabetology, 8:14
- Feng Y, Niu T, Xu Xin, Chen C et al (2002). Insertion/deletion polymorphism of the ACE gene is associated with Type 2 Diabetes. Diabetes, 51:1986-1988
- Ferris III F, Davis M, Aiello L (1999). Treatment of diabetic retinopathy. N Engl J Med, 341(9):667-678
- Ganong W (2004). Fisiología Médica. 19ed Editorial H Manual Moderno, México.
- Goday A (2002). Epidemiología de la diabetes y sus complicaciones no coronarias. Rev Esp Cardiol, 55(6): 657-670
- Gross J, Azevedo M, Silveiro S(2005). Diabetic Nephropathy: Diagnosis, Prevention, and Treatment. Diabetes Care, 28:164-176
- Guerrero J (2005). Diabetes mellitus 1. infoFamilia
- Hart W, Collazo M (1998). Costos del diagnóstico de la Diabetes Mellitus en diferentes países del mundo. Rev Cubana Endocrinología, 9: 212-220
- Jones A, Homer JB, Murphy DL (2006). Understanding Diabetes Population Dynamics through Simulation Modeling and Experimentation. Am J Public Health, 96(3):488–494.

- Kasper D, Braunwald E, Fauci A (2006). Harrison: Principios de Medicina Interna. 16ed Mc Graw-Hill, México
- Lizaraso F, Rivara G, Torres E, Fujita R (2002). Presencia del genotipo D/D del gen de enzima convertidora de angiotensina y del genotipo 235T del gen de angiotensinógeno como factores de riesgo para sufrir un evento coronario agudo. Rev peruana de cardiología, 28(1)
- Llorca J, Prieto D, Combarros O, Dierssen T, Bersiano J (2005). Riesgos competitivos de muerte y equilibrio de Hardy-weinberg en estudio de casos y controles sobre asociación entre genes y enfermedades. Gac Saint, 19(4):321-324
- Mahon C, Lehman D, Manuselis G (2007). Textbook of diagnostic microbiology 3ª Ed. Edit Elsevier. EUA
- Marre M, Jeunemaitre X, Gallois Y (1997). Contribution of Genetic Polymorphism in the Renin–Angiotensin System to the Development of Renal Complications in Insulin-dependent Diabetes. J. Clin. Invest, 99(7):1585–1595
- Mauer K, Exaire JE, Escalante B (2001). Importancia de la ECA en la circulación coronaria. Arch de cardio. de Mex, 71(4):278-285
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1998). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acid Research, 16:1215
- Ministerio de salud (2003). Desigualdades de salud en Costa Rica. Serie análisis de situación de salud 2003, no8
- Mondry A, Loh M, Liu P, Zhu A, Nagel M(2005). Polymorphisms of the Insertion/deletion ACE and M235T AGT genes and hypertension: surprising new findings and meta-analysis of data. BMC nephrology 6:1
- Niu T, Chen X, Xu X (2002). ACE gene insertion/deletion polymorphism and cardiovascular disease. Drug, 62:977-993
- Odawara M, Matsunuma A, YamashitaK (19997). Mistyping frequency of the angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and an improved method for its avoidance. Hum Genet, 100:163-166

- Olefsky J (2001). Prospects for Research in Diabetes Mellitus. *JAMA*, 285(5):628-632
- Organización panamericana de la salud (2003). Desigualdades de salud en Costa Rica. Serie Análisis de Situación de salud, no8
- Organización Pan-Americana de Salud (OPS) (2009). Red Panamericana: Conjunto de Acciones para la Reducción Multifactorial de las Enfermedades No transmisibles (CARMEN). [serie en internet]. <http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/NC/carmen-info.htm> (Citado el 20 de junio del 2009)
- Pérez L, Triana ME, Pantaleón O, Fernández JI (2004). Fibrinógeno, dislipidemias, fibrinólisis y actividad lipolítica en pacientes diabéticos tipo 2. Relación con la obesidad. *Rev Cub de angiolog y cirug vasc*, 5(1)
- Quirós Alpízar JL, Miranda Solís L, Solís Barquero JP (2006). Síndrome metabólico: ¿Un elefante en una caja? *Revista costarricense de cardiología*, Sept
- Rigat B, Hubert C; alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier (1990). Insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest*, 1343-1346
- Rodríguez Weber F, Sáenz Tapia G (2008). Obesidad, hipertensión arterial y DM: ¿Puntos de partida o finales de un mismo problema? *Med Int Mex*, 24(5):342-5
- Roselló-Araya M, Araúz-Hernández A, Padilla-Vargas G, Morice-Trejos A (2004). Prevalencia de diabetes Mellitus auto-reportada en Costa Rica, 1998. *Acta médica costarricense*, oct(46)
- Sáenz G (2005). *Hematología analítica*, Tomo II. 5 Ed, EDNASSS, Costa Rica
- Sayed F, Oostra B, Isaacs A, van Duijn C, Witteman J (2006). ACE polymorphism. *Circ res*, 98:1123-1133
- Tusié M (2000). La genética de la diabetes mellitus tipo 2: genes implicados en la diabetes de aparición temprana. *Rev inv clin*, (52):296-305

- Valenzuela T, Barrera G, Avila E, Rivera G (2008). Reparación neuronal en el complejo vagal dorsal y la neuropatía diabética. Infarmate, 4:21-22

- <http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/751/1/Factores-de-Riesgo-Cardiovascular-Diabetes-Mellitus-Insulindependiente-y-no-insulindependiente.html> (citado el día 9 de junio 2010)

Anexos

Anexo 1: Hojas de recolección de datos y consentimiento informado



Hoja de recolección de datos

Polimorfismo de la ECA en pacientes con DM en Costa Rica

N: VI-807A5-311 H.S.J.D. CIHATA

Código: Hospital # Expediente

Nombre: : Cédula

Fecha de Nacimiento: Médico:

Sexo: Raza: Teléfono:

Residencia:

Antecedentes Familiares: Trombosis: Colagenopatía o SAF: Sí No.

Cardiopatías: Sí No. Nefropatías: Sí No. Diabetes M: Sí No.

Hipertensión: Sí No. Oncológicos: Sí No. Hepatopatía: Sí No. Otros:

Antecedente de Diabetes Mellitus en la familia:

Parentesco	Nombre	Apellidos	Edad aparición	Complicación	Cédula

Tipos de síntomas: AVC en pacientes jóvenes, trombosis venosa, embolia pulmonar, infarto al miocardio, otros.

Antecedentes Personales DM: I. II. Edad de diagnóstico:

Tabaquismo: Sí No. Alcoholismo: Sí No. Anticonceptivos: Sí No. Abortos: Sí No.

Emboloflebitis: Sí No. ECV previo: Sí No. Cardiopatía: Sí No.

Hipertensión: Sí No. Evol: Enf Renal: Sí No. Evol: Tipo:

Anginas	<input type="checkbox"/> No.	Tipos: <input type="text"/>	
Cardiopatías	<input type="checkbox"/> Isquémica	<input type="checkbox"/> Reumática	<input type="checkbox"/> Hipertensiva <input type="checkbox"/> Valvular <input type="checkbox"/> Otra: <input type="text"/>
Neuropatía	<input type="checkbox"/> Tipo: <input type="text"/>	Evol: <input type="text"/>	
Arterioesclerosis	<input type="checkbox"/> Tipo: <input type="text"/>	Evol: <input type="text"/>	
Hipertensión	<input type="checkbox"/> Tipo: <input type="text"/>	Evol: <input type="text"/>	
Neuropatía	<input type="checkbox"/> Tipo: <input type="text"/>	Evol: <input type="text"/>	
Retinopatía	<input type="checkbox"/> Tipo: <input type="text"/>	Evol: <input type="text"/>	

Medicamentos que toma:

Antiagregantes: Sí No: _____ Anticoagulantes: Sí No: _____
 Antihipertensivos: Sí No: _____ Hipolipemiantes: Sí No: _____
 Estatinas: Sí No: _____ Tratamiento para DM: Sí No: _____
 Tratamiento para cardiopatía isquémica: Sí No: _____
 Otros: _____

Examen Físico:

Presión Arterial

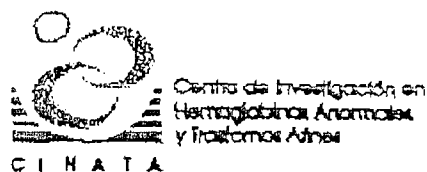
Peso Kg	Talla cm	FC	Sistólica	Diastólica	IMC

Laboratorio:

Cholesterol Total _____	HDL _____	N. Ureico _____
LDL _____	LDL _____	Creatinina: _____
VLDL _____	VLDL _____	Orina 24 Horas: Proteinuria _____
Triglicéridos _____	Triglicéridos _____	Act. Cr: _____
VES _____	VES _____	
PCR: _____	PCR: _____	
F. REUMÁTICO _____	F. REUMÁTICO _____	
DRP _____	DRP _____	
DP _____	DP _____	
DN _____	DN _____	
HOMOCISTEINA _____	HOMOCISTEINA _____	
BRINOGENO _____	BRINOGENO _____	
PROTEINA C _____	PROTEINA C _____	
PROTEINA S _____	PROTEINA S _____	ANTITROMBINA III _____
ANTILUPICO PRESUNT. _____	ANTILUPICO PRESUNT. _____	
ANTICARDIOLIPINA IgG _____	ANTICARDIOLIPINA IgG _____	ANTI LUPICO CONF. _____
ANTICARDIOLIPINA IgM _____	ANTICARDIOLIPINA IgM _____	PAI I _____
DIMERO D _____	DIMERO D _____	VISCOSIDAD SANGUINEA _____

Biología Molecular:

HOMOCISTEINA MTHFR (C677T) _____
 FACTOR V LEIDEN (G1691A) _____
 ACE _____



UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
VICERRECTORIA DE INVESTIGACIÓN
CIHATA

San José, Costa Rica. Tels. (506) 223.1385 Fax (506) 223.1385

CONSENTIMIENTO INFORMADO

**EL POLIMORFISMO DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA
(ACE) EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS EN COSTA RICA**

No de Proyecto:.....

Investigador Principal: Dra Lizbeth Salazar Sánchez

Nombre del Paciente:.....

A- PROPOSITO DEL ESTUDIO: estimado(a) paciente, padre de familia o representante legal. Es de su conocimiento la enfermedad que usted, su hijo o representado padece. Una de las complicaciones de la Diabetes Mellitus es el desarrollo de nefropatía, donde es importante definir si la presentación de esta se relaciona con una mutación en el gen de la enzima convertidora de angiotensina, pues esto puede relacionarse con su aparición y ayudar en parte con el tratamiento a seguir en presencia de esta complicación. Por tal motivo se requiere realizar un análisis de biología molecular para conocer si esta presente esta alteración genética, los cuales se realizarán en el Centro de Investigación de Hemoglobinas Anormales y Trastornos Afines (CIHATA).

B- ¿QUE SE HARA? Estos análisis de ninguna manera van a representar un gasto económico para usted (es) y sólo se requerirá de la toma de una muestra de sangre, las cuales serán obtenidas en el momento de ser referido a nuestro laboratorio o brindarla directamente del centro hospitalario donde es atendido.

Si acepto participar en este estudio se me a realizará lo siguiente:

- Se me tomará una muestra de sangre total (10ml) de la cual se obtendrá plasma y glóbulos blancos, para los estudios genéticos, con una jeringa y agujas nuevas, estériles y desechables, por lo que no existe riesgo de infección o contaminación.
- Se recolectarán algunos datos e información personal e historia clínica con el fin de completar los hallazgos de laboratorio.

C- RIESGOS

1. La participación en este estudio puede significar cierto riesgo o molestia para mí por lo siguiente: la toma de la muestra puede producir algunas molestias de dolor o formación de moretes, o producir desmayos en caso de un bajonazo de presión.
2. Si suñiera algún daño como consecuencia de los procedimientos de toma de muestra a que será sometido para la realización de este estudio, los investigadores participantes me brindarán el tratamiento necesario para mi total recuperación. Los costos de este tratamiento serán cubiertos por la Universidad de Costa Rica y la Caja Costarricense del Seguro Social.

D- BENEFICIOS: Como resultado de mi participación en este estudio, el beneficio que obtendré sera el conocer la mutación responsable de mi enfermedad, y si en el caso de ser portadora se me puede brindar consejo genético. Además es posible que los investigadores aprendan más sobre los mecanismos del desarrollo de inhibidores en la hemofilia y este conocimiento beneficie a otras personas en el futuro.

He hablado con Dra. Lizbeth Salazar Sánchez o mi médico tratante, o con la Dra Linette Loria sobre este estudio y me ha contestado todas mis preguntas. Si quisiera más información más adelante, puedo obtenerla llamando a la Dra. Salazar al teléfono 223-1385 o 222-1581. Además, puedo consultar al Ministerio de Salud a 223-2612 sobre los Derechos de los Sujetos Participantes en Proyectos de Investigación. Cualquier consulta

Mi participación en este estudio es voluntaria. Tengo derecho de negarme a participar o discontinuar mi participación en cualquier momento, sin que esta decisión afecte la calidad de la atención médica o de otra índole que requiero.

Mi participación en este estudio es confidencial, los resultados podrán aparecer en una publicación científica o ser divulgados en una reunión científica pero de una manera anónima.

No perdoré ningún derecho legal por firmar este documento

CONSENTIMIENTO

Yo he leído, o se me ha leído, toda la información descrita en esta fórmula, antes de firmarla. Se me ha brindado la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas en forma adecuada. Por lo tanto, accedo a participar como sujeto de investigación en este estudio.

Nombre, No. Cédula, Firma del participante

Fecha

Nombre, No. Cédula, Firma del testigo

Fecha

Nombre, No. Cédula, Firma del investigador que solicita el consentimiento

Fecha