

Genotipos del receptor β_3 -adrenérgico en pacientes con retinopatía diabética no proliferativa

y su influencia sobre el perfil de lípidos en el Occidente de México*

Palabras clave: Receptor β_3 -adrenérgico, genotipo, retinopatía diabética

Key words: β_3 -adrenérgico receptor, genotype and diabetic retinopathy.

Recibido: 11/11/00

Aceptado: 14/12/00

José Francisco Muñoz-Valle,** Arturo Santos,**** Mónica Vázquez-Del Mercado,** Carmen Carrillo-Pérez,** Blanca Estela Bastidas-Ramírez,** Bertha Ruiz-Madrigal,** Arturo Panduro**

* Trabajo de Investigación que obtuvo el Premio "Bayer" en el XXX Congreso Mexicano de Patología Clínica, celebrado en noviembre de 2000, en Puerto Vallarta, Jalisco.

** Instituto de Biología Molecular en Medicina, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

*** Instituto de Investigación en Oftalmología y Ciencias Visuales, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

Correspondencia:

QBP José Francisco Muñoz Valle.

Instituto de Biología Molecular en Medicina, Hospital Núm. 278, A.P. 2-500, C.P. 44280 Guadalajara, Jal., Tel. (3) 6147743. E-mail: biologiamolecular@hotmail.com

7

Resumen

Introducción: La Retinopatía Diabética (RD) es una de las complicaciones más frecuentes en la diabetes. El factor de riesgo para desarrollar RD en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 es más alta en México-Americanos que en blancos no hispanícos, en donde este alto factor de riesgo en México-Americanos es inexplicable. El receptor β_3 -Adrenérgico (β_3 -ADR) se expresa en tejido adiposo blanco y café, donde regula los cambios inducidos por la adrenalina y noradrenalina en el metabolismo energético y la termogénesis. Una mutación en el codón 64 del gen β_3 -AR origina el cambio del aminoácido triptófano (Trp) por arginina (Arg). Los genotipos Trp64Arg y Arg64Arg se han asociado con incremento de triglicéridos y

Summary

Introduction: Diabetic retinopathy (DR) is a frequent complication in diabetes mellitus. The risk factor to develop DR in patients with type 2 diabetes mellitus is greater in Mexican-Americans than non Hispanic whites, when the high risk factor in Mexican-American is unexplained. The β_3 -adrenérgico receptor (β_3 -AR) is expressed in visceral fat and in brown and white adipose tissue in humans, where it is likely to regulate noradrenaline-induced changes in energy metabolism and thermogenesis. A missense mutation in codon 64 of the β_3 -AR gene results in the replacement of tryptophan by arginine (Trp64Arg) in the first intracellular loop of the receptor protein. The Trp64Arg and Arg64Arg of the β_3 -AR

disminución de HDL-c en pacientes con RD proliferativa. Los objetivos fueron investigar la frecuencia y el efecto de los polimorfismos del β_3 -AR sobre el perfil de lípidos en pacientes con retinopatía diabética no proliferativa (RDNP) del Occidente de México. **Métodos:** Se incluyeron 31 pacientes con RDNP clasificados de acuerdo a los criterios del ETDRS Research Group y 25 sujetos clínicamente sanos. Se realizó el perfil de lípidos en todos los pacientes y sujetos sanos incluidos en nuestro estudio. Se realizó extracción de DNA a partir de leucocitos de sangre periférica. Se amplificó una región de 248 pb de la región polimórfica (exón 1) del gen β_3 -AR por PCR. El producto de PCR (248 pb) fue digerido con la enzima de restricción *Mva* I. Los patrones de restricción, obtenidos por PCR-RFLP's fueron identificados por electroforesis en gel de agarosa teñidos con bromuro de etidio. El análisis estadístico se llevó a cabo usando las pruebas de ANOVA con Tukey y para las variables cualitativas la prueba de χ^2 y Pearson. **Resultados:** Se encontraron niveles altos de CT, TG, LDL-c y VLDL-c en pacientes con RDNP comparado con los sujetos sanos ($p=0.03$; $p=0.0001$; $p=0.002$; $p=0.0001$ respectivamente). Se identificó una asociación entre los genotipos Trp64Arg y Arg64Arg de los pacientes con RDNP y el genotipo Trp64Trp de los sujetos sanos ($p=0.0197$). No se identificó asociación entre los genotipos del β_3 -AR y el perfil de lípidos. **Conclusión:** Nosotros sugerimos que los genotipos Trp64Arg and Arg64Arg pueden contribuir al desarrollo de la RDNP. Los niveles elevados de CT, TG, LDL-c y VLDL-c en pacientes con RDNP es independiente de los genotipos del β_3 -AR, pero dependientes de la diabetes mellitus tipo 2.

gene have been associated with high serum triglyceride and decreased HDL-cholesterol (HDL-c) levels in proliferative diabetic retinopathy patients. The objectives were to investigate the frequency and the effect of the β_3 -AR polymorphism over the lipid profile in patients with non proliferative diabetic retinopathy (non-PDR) of the West of Mexico. **Methods:** We included 31 patients with non-PDR classified according to ETDRS Research Group. A group of 25 healthy subjects was studied. Fasting lipid profile was done in all the participants. Leukocyte genomic DNA isolation was performed from peripheral blood. Screening of β_3 -AR gene polymorphic region (exon 1) was done by PCR-RFLP's technique. The PCR product (248 bp) was digested using *Mva* I restriction enzyme. The PCR-RFLP's patterns were identified by agarose-gel electrophoresis stained with ethidium bromide. Statistical analysis was performed using ANOVA with Tukey procedure and for qualitative variables χ^2 and Pearson tests were used. **Results:** Highest levels of CT, TG, LDL-c and VLDL-c in patients with non-PDR compared to healthy subjects ($p=0.03$; $p=0.0001$; $p=0.002$; $p=0.0001$ respectively) was found. An association between Trp64Arg and Arg64Arg genotypes in non-PDR patients with Trp64Trp genotype of the healthy subjects ($p=0.0197$) was found. No association between β_3 -AR genotype and lipid profile was observed. **Conclusion:** We suggest that Trp64Arg and Arg64Arg genotypes may contribute to develop of non-PDR. The increase of CT, TG, LDL-c and VLDL-c in non-PDR patients is independently of β_3 -AR genotypes but dependently of type 2 diabetes mellitus.

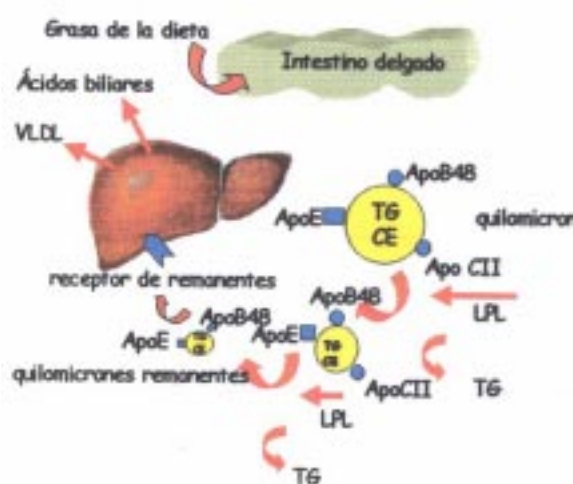
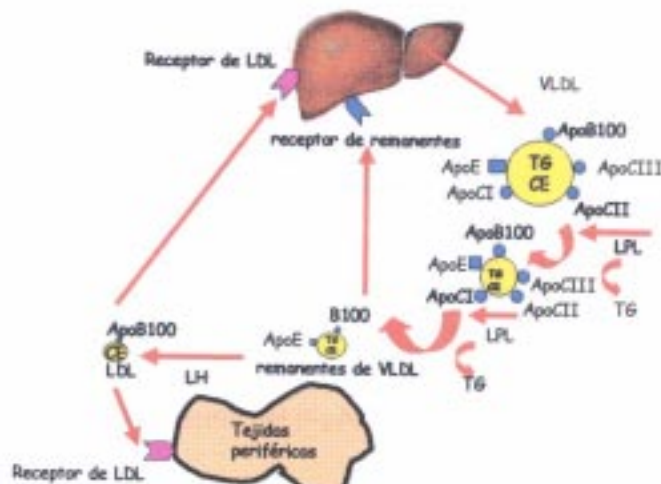


Figura 1. Panel A. Transporte exógeno de lípidos.



Panel B. Transporte endógeno de lípidos.

Introducción

El receptor β_3 - adrenérgico (β_3 - AR) es un sub-tipo de receptores a adrenalina y noradrenalina que son predominantemente expresados en grasa visceral, tejido adiposo blanco y café. Además participa como regulador de la lipólisis y la termogénesis. El β_3 - AR es una glicoproteína presente en la membrana de un gran número de tipos celulares, compuesta por 408 residuos de aminoácidos simples a lo largo de la cadena peptídica. Este receptor está fuertemente asociado con al menos otras dos proteínas (Gs y la enzima adenilato-ciclasa, AC) para formar el complejo β -AR. Esta interacción entre el β -AR y la proteína G de tipo Gs se da en la región intracelular donde forma una hélice alfa-anfifílica. El β -AR también reconoce a la enzima AC acoplándose conjuntamente con la proteína Gs, lo cual estimula la activación de la enzima AC que convierte el ATP (adenosin trifosfato) a AMPc (adenosin monofosfato cíclico), dando lugar al inicio de la lipólisis. Estudios de unión a su ligando y activación mediante la vía de adenilato-ciclasa han ayudado para definir su único perfil beta-adrenérgico que es distinto a los receptores adrenérgicos β_1 y β_2 , puesto que en estudios farmacológicos es característica su respuesta atípica.^{1,2,3,4,5} En diferentes reportes han discutido la presencia del β_3 - AR en distintas localizaciones donde el receptor puede modular otras funciones, siendo el caso del tracto gastrointestinal, donde el β_3 - AR puede modular la motilidad intestinal, así también su expresión en tejido cardíaco⁵ y es considerado el responsable para incrementar la lipólisis y la liberación de ácidos grasos libres dentro de la vena porta.⁶

El colesterol (CT) y los triglicéridos (TG) son transportados dentro de las lipoproteínas plasmáticas. Las principales lipoproteínas son los quilomicrones, las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-c), las lipoproteínas de baja densidad (LDL-c), y las lipoproteínas de alta densidad (HDL-c).⁷ Durante el metabolismo normal las lipoproteínas pierden, adquieren e intercambian sus lípidos y

constituyentes proteínicos y dinámicamente cambian su composición. Las lipoproteínas transportan lípidos al hígado para la síntesis de ácidos biliares y a los tejidos periféricos para la síntesis de membranas celulares y hormonas esteroideas.⁸ Las apolipoproteínas son los componentes estructurales proteínicos de las lipoproteínas.⁹ Algunas apolipoproteínas funcionan como ligando en la endocitosis mediada por receptor. La apolipoproteína B (apo B) y la apolipoproteína E (apo E) se unen al receptor de LDL. Otras apolipoproteínas son activadores de enzimas, tal es el caso de la apolipoproteína A1 (apo A1) que activa la lecitin-colesterol-acetil-transferasa y la apolipoproteína CII (apo CII) que activa la lipoprotein-lipasa (LPL). Estas funciones se esquematizan en el transporte exógeno y endógeno de lípidos, como se muestra en las figuras 1A y 1B.

El papel del β_3 - AR en los adipocitos está en la actualidad bien establecido en ratones. En estas células el β_3 - AR es acoplado a las proteínas Gs y a la enzima adenilato-ciclasa y de esta manera generan AMPc que fosforila a la lipasa sensible a hormona responsable de la lipólisis de los TG.

El polimorfismo del receptor β_3 -AR es el resultado de una mutación puntual en el codón 64 del gen β_3 -AR dando lugar al reemplazo del aminoácido triptófano (Trp) por el aminoácido arginina (Arg) en la primera vuelta intracelular del receptor, lo que podría afectar su actividad funcional, puesto que este cambio de un aminoácido por otro altera la estructura normal y funcional de la proteína (figura 2).

El genotipo que resulta en el reemplazo del Trp por la Arg se denomina Trp64Arg, el cual recientemente ha sido notificado en varios grupos étnicos, incluyendo los indios Pima de Arizona, individuos en los cuales es conocida su alta prevalencia a la obesidad y a la diabetes mellitus tipo 2.¹⁰

La retinopatía diabética es una de las complicaciones más serias y frecuentes de la diabetes. Esta enfermedad es clasificada en dos grupos: a) Retinopatía diabética no proliferativa (RDNP), cuyas ca-

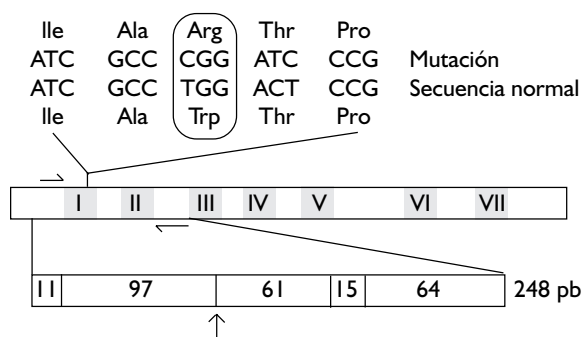


Figura 2. Representación esquemática del polimorfismo del β_3 -AR en humanos.

racterísticas son signos de retinopatía diabética simple, tales como: microaneurismas, hemorragia intrarretinal, exudados y especialmente edema macular; b) Retinopatía diabética proliferativa (RDP), donde se presenta la neovascularización del disco óptico o retina, hemorragia del vítreo, proliferación fibrovascular, etc. El edema macular es la principal causa de ceguera legal a nivel mundial en el grupo etario de 24-64 años, el cual representa la población económicamente activa. La acumulación de colesterol en el espacio intersticial (exudados duros) de la retina condiciona a la pérdida significativa de la agudeza visual. En estudios epidemiológicos realizados en EUA, el factor de riesgo para desarrollar retinopatía en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 fue más alta en mexicoamericanos que en blancos no hispanos. Además la prevalencia de cualquier lesión de retinopatía diabética en mexicoamericanos y en blancos no hispanos fue de 84% y 46%, respectivamente, en donde este alto factor de riesgo en mexicoamericanos para desarrollar retinopatía es inexplicable,¹¹ aunque se especula sobre la influencia de factores genéticos y ambientales. En la población japonesa la relación entre heterocigotos Trp64Arg y homocigotos Arg64Arg del polimorfismo genético del β_3 -AR fue asociado con altos niveles de TG y disminución de HDL-c en pacientes con retinopatía diabética proliferativa.¹² Asimismo, en pacientes chinos con diabetes mellitus tipo 2 se demostraron efectos del genotipo Trp64Arg sobre la variación de grasa total corporal, perfil de lípidos y

secreción de insulina.¹³ Se ha asociado la participación del polimorfismo Trp64Arg en otras enfermedades como en la obesidad mórbida ligado a favorecer la ganancia de peso.¹⁴ Un defecto en el gen β_3 -AR puede ser de importancia clínica en la fisiología de la obesidad porque éste puede alterar la traducción de señales y mecanismos regulatorios que dan como resultado una inhibición de lipólisis y una acumulación exagerada de grasa corporal. Recientemente se ha sugerido que el alelo Trp64Arg puede ser un marcador de susceptibilidad en la incapacidad para perder peso en mujeres obesas.¹⁵ Esta mutación tiene diversos efectos en un gran número de sistemas fisiológicos, incluyendo índice de masa corporal, presión sanguínea e historia reproductiva, quizás sugiriendo razones evolutivas para mantenerse en la población.¹⁶ Estos resultados nos proporcionan un panorama consistente del importante papel del β_3 -AR en la regulación del metabolismo de lípidos y como un blanco para tratar algunas formas de obesidad.⁵

Pocos estudios se han publicado demostrando la relación que existe entre el β_3 -AR, la RDNP y el perfil de lípidos, pero existe evidencia de su participación en RDP, donde informan que el genotipo Trp64Arg del gen del β_3 -AR fue más frecuente en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 con RDP pero no en RDNP. Además esta mutación sólo fue asociada con niveles incrementados de TG y niveles bajos de HDL-c en pacientes japoneses.

Basados en estos conocimientos nosotros decidimos conducir un estudio para investigar la frecuencia del polimorfismo Trp64Arg en el gen β_3 -AR en pacientes con RDNP y diabetes mellitus tipo 2 del Occidente de México, ya que existe variabilidad genética entre poblaciones, además que se observan diferencias en hábitos alimentarios y actividad física en nuestra población, tomando en cuenta que se ha descrito que altos niveles de colesterol favorecen la aparición de exudados duros, resultando la disminución de la agudeza visual. Este estudio clínico-molecular se realizó usando la

reacción en cadena de la polimerasa, así como subsecuentemente la digestión con enzimas de restricción (PCR-RFLP's) y determinar el efecto del polimorfismo Trp64Arg sobre el perfil de lípidos en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y RDNP. En la actualidad, no existe un estudio relacionado con el posible efecto genético de los polimorfismos del gen que codifica para el β_3 -AR sobre el perfil lipídico y el riesgo a desarrollar RDNP en mestizos mexicanos del Occidente de México.

Material y método

Se realizó un estudio prospectivo, transversal, comparativo y observacional, siendo el periodo de estudio a partir de junio de 1999 a julio del 2000.

El presente estudio se llevó a cabo en el Instituto de Biología Molecular en Medicina, UdeG, O.P.D. Antiguo Hospital Civil de Guadalajara y el Instituto de Oftalmología y Ciencias Visuales, UdeG.

Sujetos: Se incluyeron 31 pacientes con diabetes mellitus tipo 2 con RDNP (19 mujeres y 12 hombres; media de edad 58 ± 9 años) y 25 testigos sanos (20 mujeres y 5 hombres; media de edad 51 ± 10 años) pareados por edad y sexo. Fue obtenido un informe de consentimiento por escrito de todos los sujetos que participaron en el estudio.

Evaluación oftálmica: En todos los pacientes se realizó una evaluación oftálmica completa que incluyó: determinación de mejor agudeza visual corregida para distancia, presión intraocular, biomicroscopia, fundoscopia y fotografías estereoscópicas de fondo de ojo. Para la clasificación se siguieron los criterios del ETDRS Research Group.

Estudios de laboratorio clínico: Se realizó citometría hemática, química sanguínea, cuantificación de proteínas, Na, K, Cl, pruebas de función hepática, determinación de lípidos totales (LT), CT, HDL-c, LDL-c, VLDL-c, apo A1, apo B (bioMérieux Vitec, IncTM) y depuración de creatinina en orina de 24 horas.

Extracción de ADN (ácido desoxirribonucleico) a partir de sangre periférica. A partir

de sangre periférica anticoagulada con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), se realizó la extracción de ADN genómico a partir de leucocitos totales mediante la técnica de Miller.¹⁷ Brevemente: a 3 mL de sangre anticoagulada depositada en un tubo de Falcon, se agregaron 3 mL de TTS (Triton X-100-Tris base 1M pH 7.6-Sacarosa 1M, agua destilada desionizada estéril). Se centrifugó a 3 000 rpm durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y al botón celular se le agregó nuevamente 1 mL de TTS. Se separó el botón de células del tubo con apoyo de un vórtex para después transferir el botón a un tubo eppendorf de 1.5 mL. Nuevamente se centrifugó a 12 000 rpm por 2 minutos. Se decantó rápido el sobrenadante repitiendo este mismo proceso hasta obtener un botón celular limpio libre de eritrocitos. Posteriormente se agregó NaCl 5 mM 570 μ L, se homogeneizó en el vórtex por 2 minutos, agregando después 30 μ L de SDS (duodecil sulfato de sodio) al 10% y se homogeneizó por 10 minutos. Después se agregaron 200 μ L de NaCl saturado, homogeneizándolo por 15 minutos. Se centrifugó a 11 500 rpm por 25 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante a un tubo de ensaye de 13x100 estéril y se agregaron 2 mL de etanol absoluto. De inmediato se observó la formación de una hebra blanquecina (ADN genómico). Se dejó precipitar toda la noche a -20°C. Al siguiente día, se transfirió la hebra de ADN a un tubo eppendorf con 500 μ L de etanol al 70% y se centrifugó a 9 000 rpm por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y al precipitado de ADN contenido en el tubo eppendorf, se colocó en el CentripavTM por 15 minutos a temperatura ambiente, con el objeto de evaporar todo el etanol restante. Después se agregaron 300 μ L de solución inyectable estéril al tubo. Se colocaron los tubos en un bloque térmico a 60°C durante 3 horas y finalmente se determinó la concentración de ADN genómico obtenido a 260 nm (absorbancia para ácidos nucleicos) y a 280 nm (absorbancia para proteínas) en el espectrómetro Beckman DU SeriesTM. La

relación entre ambos resultados (ADN/Proteínas) debe ser de 1.5-2.

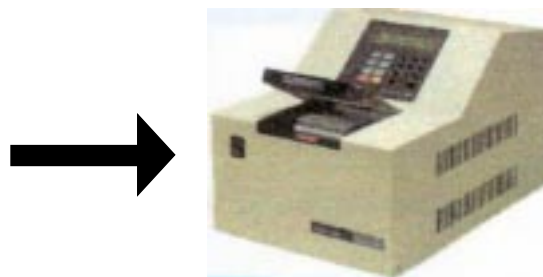
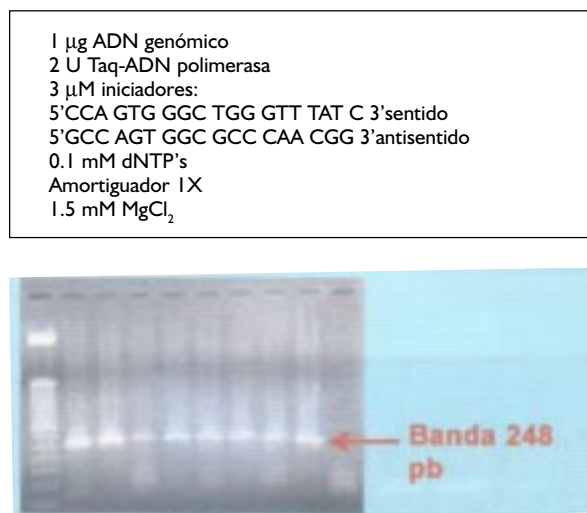
Amplificación de la región polimórfica del exón I del gen del receptor β_3 - adrenérgico. A partir de 1 μ g de ADN genómico, se amplificó una región de 248 pb de la región polimórfica del β_3 - AR por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un termociclador (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2,400) usando los siguientes iniciadores: Sentido: 5'CCAGTGGGCTGGCTTTATC3' y anti-sentido 5'GCCAGTGGCGCCCAACGG3'.¹⁴ La mezcla de PCR se llevó a cabo utilizando 50 μ L como volumen final. Cada iniciador a una concentración de 3 μ M, 0.1 mM de dNTP's (desoxinucleótidos trifosfato) (GIBCO™), amortiguador 10X (GIBCO™), taq polimerasa 2 U/ μ L y 1.5 mM $MgCl_2$ (GIBCO™). La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización inicial 3 minutos y 35 ciclos de amplificación a 94°C por 30 segundos para desnaturalizar, 60°C para alineamiento, 72°C para extensión y una extensión final de 72°C por 1 minuto. Se llevó a cabo el corrimiento de los productos de PCR en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de

etidio y la visualización del producto amplificado a través del transiluminador de luz UV (figura 3). El fragmento obtenido fue digerido con las enzimas de restricción *Hha I*, *Mae III* y *Msp I* para corroborar el tamaño del fragmento amplificado.

Determinación de los polimorfismos del gen del receptor β_3 - adrenérgico por RFLP's. La determinación de segmentos polimórficos mediante enzimas de restricción es la técnica conocida como RFLP's (Restriction Fragment Length Polymorphism). Después de obtener el producto de 248 pb del gen β_3 - AR se procedió a la digestión con 3 U de la enzima de restricción *Mva I* (Amersham LIFE SCIENCE) durante 1 hora con 30 minutos en baño María a 37°C. Después del tiempo de incubación, los fragmentos de restricción fueron corridos en una gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio y finalmente la determinación del genotipo se visualizó en un transiluminador de luz UV.

Análisis estadístico. Los parámetros bioquímicos del perfil de lípidos en el grupo de RDNP y controles sanos se compararon con la prueba de ANOVA y Tukey. Las variables cualitativas como son la presencia de RDNP con los genotipos del

12



Desnaturalización inicial: 94°C 3 min.
 35 ciclos
 Desnaturalización 94°C, 30 seg.
 Alineamiento 60°C, 30 seg.
 Extensión 72°C, 30 seg.
 Extensión final 72°C 1 min.

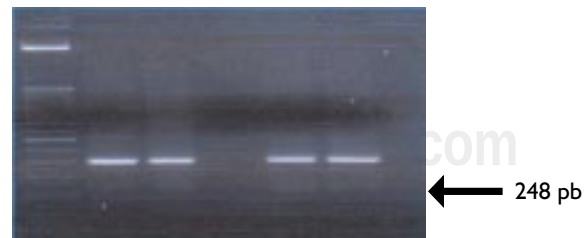
Figura 3. Condiciones de amplificación del gen del receptor β_3 - adrenérgico y visualización de los productos de PCR en gel de agarosa al 2%.

β_3 -AR se analizaron mediante la prueba de χ^2 y la prueba de Pearson. Se consideró significancia estadística cuando la $p < 0.05$.

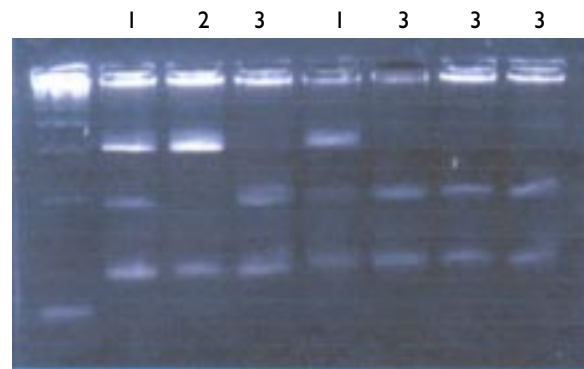
Resultados

Frecuencia genotípica del gen β_3 - AR. La digestión del fragmento de 248 pb resultado de la amplificación por PCR fue digerido con la enzima *Mva* I, que produce los siguientes fragmentos: 97, 64 y 61 pb representando al genotipo normal Trp64Trp; los fragmentos de 95, 64 y 61 pb dan lugar al genotipo Trp64Arg heterocigoto (cambio de un solo alelo) y los fragmentos 158, 64 y 61 dan lugar al genotipo Arg64Arg homocigoto (cambio de Trp por Arg en ambos alelos) (figura 4). Al parecer el genotipo más frecuente en sujetos del occidente de México es el Trp64Trp, considerado como el genotipo normal, mientras que los genotipo Trp64Arg y Arg64Arg se encuentra en nuestro grupo de pacientes con RDNP. Por lo tanto, al comparar el genotipo Trp64Trp de nuestro grupo testigo con los genotipos Trp64Arg y Arg64Arg del grupo de pacientes con RDNP se encontró una significancia de $p = 0.0197$ (figura 5). Al comparar las frecuencias de los genotipos para el gen β_3 - AR en los dos grupos estudiados, observamos una notable diferencia en la frecuencia del genotipo Trp64Trp entre los testigos y los pacientes con RDNP, así como en el genotipo Trp64Arg entre ambos grupos (cuadro 1).

Perfil de lípidos en pacientes con RDNP y testigos sanos. Al analizar el perfil de lípidos en nuestros 2 grupos de estudio se encontró que los niveles de colesterol total aumentaron al compararse con el grupo testigo 219.12 ± 57.28 vs 178.096 ± 28.12 ($p = 0.003$). En cuanto a los niveles de TG, éstos se encontraron marcadamente incrementados en el grupo de pacientes con RDNP al compararlo con el grupo testigo: 202.51 ± 84.99 vs 88.62 ± 33.75 ($p = 0.0001$), lo cual es altamente significativo en nuestro estudio. En cuanto a los



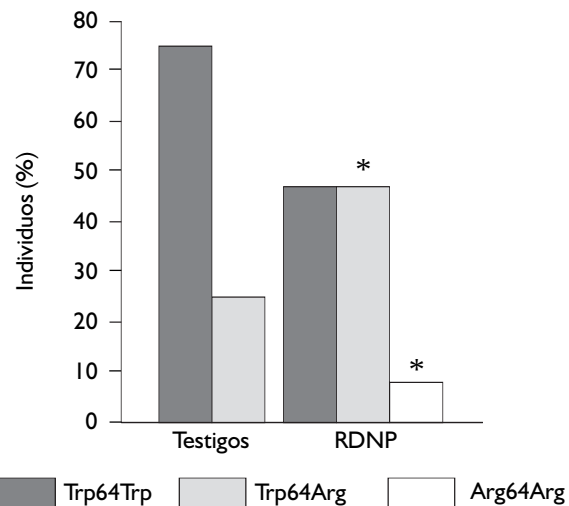
Panel A. Fragmento amplificado del gen del receptor β_3 - adrenérgico.



1.- Trp64Trp; 2.- Trp64Arg; 3.- Arg64Arg

Panel B. Genotipos obtenidos de la digestión del fragmento de 248 pb del gen del receptor β_3 - adrenérgico.

Figura 4.



$p = 0.0197$ comparando la frecuencia del genotipo 1 contra la frecuencia del genotipo 2 y 3 juntos en individuos testigos y enfermos con retinopatía.

Figura 5. Frecuencia genotípica del receptor β_3 - adrenérgico asociado a la RDNP.

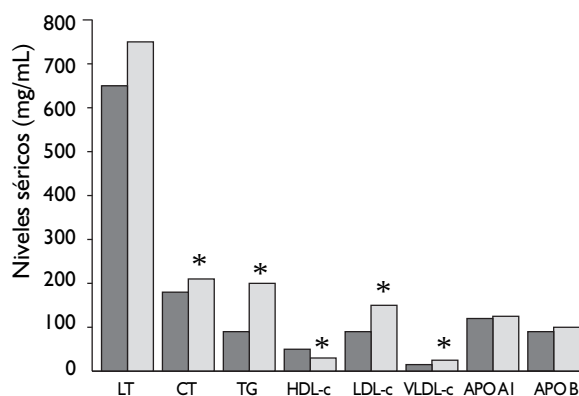
Cuadro I. Frecuencia de los genotipos del gen β_3 AR en el grupo testigo y el grupo de pacientes con retinopatía diabética no proliferativa.

Grupo	Trp64Trp	Trp64Arg	Arg64Arg
Testigos	76% (n = 19)	24% (n = 6)	0% (n = 0)
Retinopatía	45.2% (n = 14)	45.2% (n = 14)	3% (n = 7)

niveles de HDL-c, se encontró una disminución en el grupo de pacientes con RDNP al compararlo con el grupo testigo: 37.72 ± 13.92 vs 55.14 ± 20.24 ($p = 0.001$). Los niveles de LDL-c también se encontraron elevados en el grupo de pacientes con RDNP 142.05 ± 49.73 vs 97.89 ± 41.63 ($p = 0.002$); a su vez los niveles de VLDL-c se encontraron aumentados, lo cual es altamente significativo: 43.58 ± 17.86 vs 17.80 ± 7.36 ($p = 0.0001$). Los niveles séricos de LT, apo A1 y apo B se encontraron de manera semejante en ambos grupos, donde no se encontraron diferencias significativas (figura 6).

Relación de los polimorfismos del β_3 - AR y el perfil de lípidos en pacientes con RDNP. En el análisis de los niveles séricos de lípidos y los genotipos Trp64Trp, Trp64Arg y Arg64Arg, no se encontró influencia directa sobre todos los parámetros estudiados en el grupo de pacientes con RDNP (figura 7).

Relación de los polimorfismos del β_3 - AR y el perfil de lípidos en sujetos sanos. Al comparar los genotipos del gen β_3 AR con los niveles de lípidos en sujetos sanos, se encontró un incremento de LDL-c en los sujetos portadores del genotipo Trp64Trp en comparación con el genotipo Trp64Arg: 107.55 ± 41.43 vs 78.35 ± 28.10 ($p = 0.046$), tomando en cuenta que en el grupo de sujetos sanos sólo fueron encontrados estos dos genotipos y el genotipo



CT: $p = 0.003$ TG: $p = 0.0001$ HDL-c: $p = 0.001$
LDL-c: $p = 0.002$ VLDL-c: $p = 0.0001$

* No hay diferencias estadísticamente significativas.

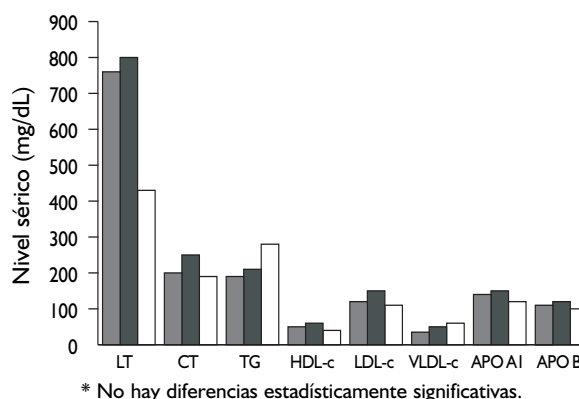
■ Testigos □ RDNP

Figura 6. Asociación del perfil lipídico en pacientes con retinopatía diabética no proliferativa (RDNP).

Arg64Arg permaneció ausente en nuestro grupo testigo (figura 8).

Discusión

De acuerdo con nuestros resultados, encontramos una alta frecuencia del genotipo Trp64Trp (76%) en sujetos normales del Occidente de México en comparación con nuestro grupo de pa-



* No hay diferencias estadísticamente significativas.

■ Trp64Trp □ Trp64Arg □ Arg64Arg

Figura 7. Perfil lipídico en pacientes con retinopatía diabética no proliferativa: comparación con genotipos del receptor β_3 - adrenérgico.

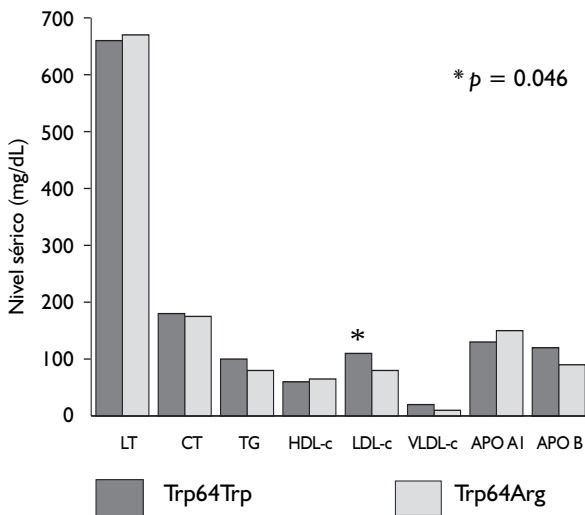


Figura 8. Perfil lipídico en sujetos sanos: comparación con genotipos del receptor β_3 - adrenérgico.

cientes con RDNP (45.2%), sugiriéndonos que efectivamente este genotipo es el que se presenta con mayor frecuencia en población no diabética, en comparación con la frecuencia de los genotipos Trp64Arg y Arg64Arg (48.2%) encontrados en nuestro grupo en estudio, lo que indica que el ser portador de los genotipos Trp64Arg y Arg64Arg son un factor potencial de riesgo para el desarrollo de RDNP, ya que posiblemente les proporciona a los individuos una alta susceptibilidad para el desarrollo de esta alteración ocular, ya que los niveles elevados de colesterol conducen a la aparición de exudados duros y por consecuencia una disminución de la agudeza visual, siendo ésta una de las principales consecuencias secundarias de la diabetes mellitus.

Un hallazgo que llamó nuestra atención al analizar los niveles séricos del perfil lipídico es que los niveles de CT, TG, LDL-c y VLDL-c se encontraron incrementados de manera importante, hecho que hasta la actualidad no se ha notificado en la literatura mundial en pacientes con RDNP, ya que Sakane y cols., en 1997, sólo informaron niveles elevados de TG en pacientes con retinopatía diabética proliferativa (RDP) asociados al genotipo Trp64Arg, mas no en pacientes con

RDNP, hecho inverso en nuestro estudio puesto que encontramos niveles elevados de estos parámetros bioquímicos independientemente del genotipo, por lo que sugerimos que el curso clínico por sí solo de la diabetes mellitus conduce a este estado de dislipidemia, aunque es importante mencionar que en particular en nuestra población estudiada se observa dislipidemia en varios de los parámetros bioquímicos a diferencia de otros reportes a nivel nacional de pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Con lo anterior se hipotetiza que son otros factores que están interviniendo en el incremento de los niveles séricos en este grupo de estudio. En cuanto a los niveles de HDL-c, éstos se encontraron disminuidos en los pacientes con RDNP, hecho similar encontrado en pacientes con RDP y que además concuerda con lo reportado en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

En el grupo de sujetos sanos, se encontró una asociación importante entre los sujetos portadores del genotipo Trp64Trp, donde se identificaron niveles elevados de LDL-c, hecho que sugiere que el genotipo "normal" puede favorecer el aumento de los niveles de LDL-c produciendo a su vez susceptibilidad aterogénica en nuestra población.

Conclusiones

El presente estudio nos permite concluir claramente que el genotipo Trp64Trp es el genotipo más frecuente en la población del Occidente de México, además de que la presencia de los genotipos Trp64Arg y Arg64Arg son frecuentes en el grupo de pacientes con RDNP, lo cual sugiere que son un factor de riesgo potencial para el desarrollo de esta enfermedad, que es una causa secundaria a la diabetes mellitus. Los niveles de CT, TG, LDL-c y VLDL-c se encuentran incrementados independientemente de los genotipos del β_3 -AR en pacientes con RDNP y la dislipidemia está relacionada con el estado diabético del paciente más no con el desarrollo de la RDNP. En los sujetos sanos llamó

nuestra atención el incremento de LDL-c asociado al genotipo Trp64Trp, este hallazgo sugieren una relación importante en el metabolismo de lípidos en nuestra población.

Referencias

1. De Blasi A. Beta-adrenergic receptors: structure, function and regulation. *Drugs Exp Clin Res* 1990; 16(3): 107-112.
2. Garcia-Rubi E, Calles EJ. Insulin resistance and type 2 diabetes mellitus: Its relationship with the beta 3-adrenergic receptor. *Arch Med Res* 1999; 30(6): 459-464.
3. Krief S, Lönnqvist F, Raimbault S et al. Tissue distribution of β_3 -adrenergic receptor mRNA in man. *J Clin Invest* 1993; 91: 344-349.
4. Strader CD, Sigal IS, Dixon RAF. Structural basis of β_3 -adrenergic receptor function. *FASEB J* 1989; 3: 1825-1832.
5. Strosberg AD. Structure and function of the β_3 -adrenergic receptor. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37: 421-450.
6. Lönnqvist F, Thörne A, Nilsell K, Hoffstedt J, Arner P. A pathogenetic role of visceral fat β_3 -adrenergic receptors in obesity. *J Clin Invest* 1995; 95: 1109-1116.
7. Walden CC, Hegele RA. Apolipoprotein E in hyperlipidemia. *Ann Intern Med* 1994; 120: 1026-1036.
8. Havel RJ, Kane JP. Introduction: structure and metabolism of plasma lipoproteins. In: Scriver CR ed. *The metabolic basis of inherited diseases*. 6th ed. New York- McGraw-Hill Information Services Co 1989; 1129: 38.
9. Li WH, Tanimura M, Luu CC, Datta S, Chan L. The apolipoprotein multigene family, biosynthesis, structure, structure-function relationships, and evolution. *J Lipid Res* 1988; 29: 245-271.
10. Walston J, Silver KD, Bogardus C, Knowler WC, Celi FS, Austin B, Manning B, Strosberg AD, Stern MP, Raben N et al. Time of onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the β_3 -adrenergic receptor gene. *N Engl J Med* 1995; 333: 343-347.
11. Harris Maureen I, Klein R, Cowie CC, Rowland M, Byrd-Holt DD. Is the risk of diabetic retinopathy greater in non-hispanic blacks and Mexican Americans than in non-hispanic whites with type 2 diabetes?: A US population study. *Diabetes Care* 1998; 21(8): 1230-1235.
12. Naoki S, Toshihide Y, Keiji Y, Yoshio N, Tunekazu U, Akinori K, Yasuto T, Motoharu K. β_3 -adrenoreceptor gene polymorphism, a newly identified risk factor for proliferative retinopathy in NIDDM patients. *Diabetes* 1997; 46(10): 1633-1636.
13. Xiang K, Jia W, Lu H, Zheng T, Lu J, Tang J, Ding W, Sun D, Li J. Effects of Trp64Arg mutation in the β_3 -adrenergic receptor gene on body fat, plasma glucose level, lipid profile, insulin secretion and action in Chinese. *Chung Hua I Chuan Hsueh Tsa Chih* 1998; 15(6): 337-340.
14. Clément K, Vaisse C, Manning B, Basdevant A, Guy-Grand B, Ruiz J, Silver KD, Shuldiner AR, Froguel P, Strosberg AD. Genetic variation in the β_3 -adrenergic receptor and an increased capacity to gain weight in patients with morbid obesity. *N Engl J Med* 1995; 333: 352-354.
15. Sakane N, Yoshida T, Umekawa T, Kondo M, Sakai Y, Takahashi T. β_3 -adrenergic receptor polymorphism: a genetic marker for visceral fat obesity and the insulin resistance syndrome. *Diabetologia* 1997; 40: 200-204.
16. Kurabayashi T, Carey DGP, Morrison NA. The β_3 -adrenergic receptor gene Trp64Arg mutation is overrepresented in obese women. *Diabetes* 1996; 45: 1358-1363.
17. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 1988; 16: 1215-1219.
18. Yoshida T, Sakane N, Umekawa T, Sakai M, Takahashi T, Kondo M. Mutation of β_3 -adrenergic receptor gene and response to treatment of obesity. *The Lancet* 1995; 346: 1433-1434.

WORLDleish 2

Bajo los auspicios de World Federation of Parasitologists

SECOND CONGRESS ON LEISHMANIOSIS

Creta, Grecia

20 a 24 de mayo de 2001

Informes:

Triaena Tours & Congress, S.A.
15 Mesogion Ave,
11526 Atenas, Grecia
Tel. +30-1-7499300
Fax +301-7705752
E-mail: congress@triaenatours.gr