



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



RELACIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO EN EL PROMOTOR  
DEL GEN DE LA ENZIMA HEM OXIGENASA 1 Y LOS  
DEPÓSITOS DE HIERRO CON LA DIABETES MELLITUS  
TIPO 2

**DENISSE JORQUERA CARVACHO**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias Biológicas  
Animales

PROFESOR GUÍA: MIGUEL ARREDONDO OLGUÍN

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 1051006

SANTIAGO, CHILE  
2007

# ÍNDICE

RESUMEN .....	3
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN .....	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
Metabolismo del hierro.....	7
Captación y transporte de Fe no hemínico.....	8
Captación y transporte de Fe hemínico.....	10
Regulación de los niveles de Fe.....	13
Relación entre la actividad de la hem oxigenasa y el metabolismo de Fe.....	13
Productos de la degradación del Hem.....	15
Polimorfismo en el promotor del gen de la enzima hem oxigenasa 1 .....	18
Síndrome metabólico .....	21
Diabetes mellitus.....	21
Relación entre hierro y diabetes.....	22
HIPÓTESIS .....	24
OBJETIVO GENERAL.....	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
MATERIALES Y MÉTODOS .....	25
Tipo de Estudio y tamaño muestral .....	25
Población en estudio .....	25
Obtención y amplificación del ADN .....	26
Extracción de Biliverdina Reductasa desde hígado de rata .....	27

Actividad de la Hem Oxigenasa .....	27
Determinación del nivel de riesgo asociado a los factores presentados en el síndrome metabólico.....	28
Análisis Estadístico.....	29
RESULTADOS .....	30
Descripción de los grupos en estudio .....	30
Frecuencias alélicas en el locus polimórfico de la enzima hem oxigenasa. ....	32
Frecuencias genotípicas en grupo de diabéticos, insulino resistentes y controles	34
Actividad de la HO según las distintas condiciones .....	35
Hierro sérico y de depósito (ferritina sérica) según las distintas condiciones .....	36
Actividad de la HO según los distintos genotipos .....	37
Fe sérico y de depósito (Fn sérica) según los distintos genotipos .....	37
Factores de riesgo .....	40
DISCUSIÓN .....	41
CONCLUSIÓN.....	44
BIBLIOGRAFÍA .....	45
ANEXOS .....	52

## RESUMEN

La Hem Oxigenasa 1 (HO-1) es una enzima de expresión inducible que degrada el grupo hem liberando hierro libre (Fe), biliverdina y monóxido de carbono (CO). El Fe es potencialmente tóxico, pues cataliza la formación de radicales libres. La diabetes mellitus tipo 2 (DM-2) es una condición inflamatoria que entre otros factores se asocia al daño oxidativo causado por anormalidades en el metabolismo del Fe.

El objetivo de este trabajo es determinar la actividad de la HO y el polimorfismo de microsatélite en el promotor del gen de la HO-1 y relacionarlos con el metabolismo del Fe en sujetos diabéticos tipo 2, con insulino resistencia y controles.

Se recolectaron muestras sanguíneas de 216 pacientes: 99 diabéticos tipo 2, 50 insulino resistentes y 67 controles, a los cuales se les realizó ensayos de actividad enzimática y de polimorfismo en el promotor del gen de la HO-1, además de establecer parámetros hematológicos, bioquímicos y antropométricos.

La distribución de los genotipos entre las distintas condiciones (diabético, insulino resistente y control) presentó diferencias estadísticamente significativas ( $\chi^2_{v7}=18.05$ ;  $p<0,05$ ), el genotipo más frecuente en los diabéticos fue el CM. La actividad de la HO en el grupo de diabéticos, fue mayor que la exhibida por los grupos insulino resistente y control ( $p\leq 0,05$ ). Los depósitos de Fe (en la forma de Ferritina), en el grupo de diabéticos fue mayor que el grupo control ( $p\leq 0,05$ ). Se observó una relación estadísticamente significativa entre la actividad de la HO con el nivel de Fe sérico sólo en el grupo de diabéticos ( $p<0,0001$ ). Estos resultados sugieren que una mayor actividad de la enzima HO junto a mayores niveles de Fe, favorecerían un mayor deterioro orgánico en el paciente con DM-2.

**Palabras clave:** Hem oxigenasa 1, Hierro, Polimorfismo, Diabetes mellitus tipo 2.

## ABSTRACT

Heme oxygenase 1 (HO-1) is a rate limiting enzyme in heme degradation, leading to the generation of free iron, biliverdin and carbon monoxide. Iron is potentially toxic to cells. Its toxicity derives from the catalytic production of free radicals. Diabetes mellitus type 2 (DM-2) is an inflammatory condition, associated with iron abnormalities and increased oxidative damage.

The objective of this study is to determine the HO activity and the microsatellite polymorphism in the HO-1 gene promoter, and to relate them to the metabolism of the iron in diabetic patients, insulin resistant and controls.

Venous samples of 216 patients were collected: 99 diabetics type 2, 50 insulin resistant and 67 controls. We determine HO activity and the polymorphism in the promoter of the gene of the HO-1, besides to establish hematological, biochemical and anthropometrical parameters.

The distribution of the genotypes between the different conditions (diabetic, insulin resistant and control) showed statistically significant differences ( $\chi^2_{v7}=18.05$ ;  $p<0.05$ ). The most frequent genotype in diabetics was CM. The activity of HO, in the diabetics group, was greater than exhibited by the insulin resistant and control groups ( $p\leq 0.05$ ). The deposit of Fe, (in the ferritin form) in the diabetics group, was greater than control group ( $p\leq 0.05$ ). A statistically significant relation between the activity of HO with the serical level of Fe exists only for the diabetics group ( $p<0.0001$ ). These results suggest a greater activity of the enzyme HO next to greater levels of Fe, would favor a greater organic deterioration in the patient with DM-2.

**Key words:** Hem oxygenase-1, Iron, Microsatellite polymorphism, Type 2 diabetes.

## INTRODUCCIÓN

El hierro (Fe) es un elemento esencial para la vida, puesto que participa prácticamente en todos los procesos de óxido-reducción. Dado su rol biológico, no es sorpresa que variaciones en las reservas corporales de este mineral influyan en la salud humana y animal (Eisenstein y Blemings, 1998). Las reservas corporales en exceso se han reconocido como un peligro potencial, pues promueven la generación de radicales libres, junto con modular alguna de las etapas del desarrollo de la lesión inflamatoria. Además, no existe un mecanismo regulado de excreción de hierro y por lo que, el organismo tiende a ganar metal con la edad. (Follett *et al.*, 2002).

Una de las formas dietarias del hierro corresponde al grupo hem, el cual es degradado en compartimentos microsomaes de las células intestinales a biliverdina, CO y Fe inorgánico por la enzima hem oxigenasa. Existen al menos tres isoformas de esta enzima: HO-1, HO-2 y HO-3. La forma inducible de la hem oxigenasa, HO-1, parece funcionar como una respuesta adaptativa contra estímulos dañinos, ya que posee potentes efectos antiinflamatorios, antioxidantes y antiproliferativos (Agarwal y Nick, 2000). El promotor del gen de la HO-1 presenta un polimorfismo de tipo microsatélite el cual corresponde a repeticiones (GT)<sub>n</sub> en la región 5' no traducida de su promotor. Según el número de repeticiones, se modularía el nivel de transcripción del gen. Se postula que, si la expresión del gen de la HO-1 se ve alterado de acuerdo al número de repeticiones (GT)<sub>n</sub>, el polimorfismo podría asociarse con el desarrollo de enfermedades inducidas por estrés oxidativo (Yamada *et al.*, 2000; Hirai *et al.*, 2003). Por otro lado, la producción de radicales libres mediados por el Fe tendría un rol importante en el desarrollo de diabetes, pues las

células que producen insulina son extremadamente sensibles al daño por oxidación.  
(Fernández-Real *et al.*, 2002).

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### *Metabolismo del hierro*

El hierro (Fe) es un micronutriente esencial para la mayoría de las formas de vida dada su habilidad para aceptar y donar electrones, interviniendo en numerosos procesos bioquímicos y fisiológicos, tales como: formar parte de las enzimas del ciclo de Krebs, actuar en la respiración celular, participar en la síntesis de ADN como cofactor de enzimas, como transportador de electrones en los citocromos y además está presente en numerosas enzimas que mantienen la integridad celular, como catalasas, peroxidasa y oxigenasas (Frazer y Anderson, 2005; Forrellat *et al.*, 2000). Aún así, el Fe en exceso (el cual se acumula en la proteína de almacenaje Ferritina) es bioquímicamente peligroso: puede dañar tejidos ya que cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno a radicales libres que atacan membranas celulares, proteínas y ADN. En condiciones normales no existe un mecanismo de excreción activo de Fe, sin embargo existe una regulación principalmente en la absorción de este micronutriente en intestino delgado y por tanto, no debería existir una elevada concentración de Fe libre. (Frazer y Anderson, 2005). Bajo condiciones patológicas en cambio, el metabolismo del Fe y de los superóxidos es claramente interactivo, cada uno puede exacerbar la toxicidad del otro. El exceso de Fe puede amplificar los efectos dañinos de la sobreproducción de superóxidos en condiciones inflamatorias agudas y crónicas. Más aún, el estrés oxidativo crónico puede modular la captación y almacenaje del Fe, llevando a un incremento exponencial de eventos mutagénicos y citotóxicos (Emerit *et al.*, 2001).

En la dieta, el Fe se encuentra en forma de a) Fe inorgánico: compuesto ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ) o férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ) y b) Fe orgánico básicamente como hierro hemínico.



### ***Captación y transporte de Fe no hemínico***

El Fe no hemínico está formado por sales inorgánicas de este metal y se encuentra principalmente en los alimentos de origen vegetal y también en la mayoría de los preparados farmacéuticos utilizados en la terapia contra la deficiencia de este mineral (Boccio *et al.*, 2003).

El primer paso en el proceso de absorción del Fe, es su captación desde el lumen del intestino delgado (específicamente en duodeno y yeyuno proximal), a través de la membrana apical del enterocito. Este proceso es mediado por el transportador para metales divalentes (DMT1: Divalent Metal Transporter 1), ubicado en el borde en cepillo de las vellosidades intestinales, el cual transporta Fe en la forma ferrosa ( $\text{Fe}^{+2}$ ). Su expresión aumenta al haber un déficit intracelular y sistémico de Fe. Mucho del Fe que entra al lumen del duodeno en la dieta está en la forma férrica u oxidada ( $\text{Fe}^{+3}$ ) y por lo tanto debe ser reducida antes de su captación por el enterocito. Esto es llevado a cabo enzimáticamente por la reductasa férrica (DCYTB: Duodenal cytochrome B reductase) ubicada en el borde en cepillo del enterocito. La actividad de esta enzima está aumentada frente a la deficiencia de Fe. Una vez dentro del enterocito, el Fe podría unirse a moléculas chaperonas para mantener su solubilidad o a péptidos de bajo peso molecular, formando lo que se ha denominado pool de Fe reactivo. El Fe que no se transfiere a la circulación se incorpora en la molécula Ferritina (Fn), la cual almacena Fe y se pierde cuando la célula avanza hasta el extremo de la vellosidad y es descamada. El eflujo de Fe a través de la membrana basolateral hacia la circulación es regulado por el transportador Ferroportina (IREG 1), el cual está involucrado en la exportación de Fe desde el enterocito y otros tipos celulares, incluyendo macrófagos. Además de esta proteína, el eflujo basolateral de Fe desde los

enterocitos requiere de una ferroxidasa intestinal, denominada Hefeaestina. Esta proteína reoxida el  $\text{Fe}^{+2}$  a  $\text{Fe}^{+3}$ , lo que es necesario para que el Fe sea unido a la Transferrina (Tf), proteína transportadora de Fe en la circulación sanguínea.

La cantidad de Fe absorbido por los enterocitos está influenciada por una variedad de factores, entre ellos las variaciones en las reservas de Fe, cambios en el nivel de eritropoyesis, hipoxia e inflamación, entre otros. Estos factores resultan en cambios en la expresión duodenal de la mayoría de las moléculas transportadoras de Fe del enterocito, particularmente DMT1, DCYTB e IREG1, pues existe un cambio tanto en los niveles de expresión de sus proteínas como de sus ARNm. La expresión de estas proteínas es regulada por un sistema que involucra a una proteína citosólica conocida como proteína reguladora de hierro (IRP: Iron regulatory protein), la cual interactúa con los elementos de respuesta al hierro (IRE's: Iron responsive elements). Este sistema IRP/IRE responde bien a situaciones de déficit pero no regula estrictamente la captación intestinal de Fe en la sobrecarga (Forrelat *et al.*, 2000; Frazer y Anderson, 2005; Kakhlon y Cabantchik, 2002; Miret *et al.*, 2003).

El Fe no hemínico es transportado por la Tf, quien lo deja disponible a todos los tejidos que lo requieren. Además, esta proteína toma el  $\text{Fe}^{+3}$  liberado por los macrófagos producto de la destrucción de los glóbulos rojos o el procedente de la mucosa intestinal.

El exceso de Fe se deposita intracelularmente como ferritina, principalmente en el sistema retículo endotelial (SER) de bazo, hígado y médula ósea. La función fundamental de la ferritina es garantizar el depósito intracelular de Fe para su posterior utilización en la síntesis de las proteínas y enzimas.

Cuando las necesidades de Fe de la célula aumentan, se produce un incremento en la síntesis de receptores de Tf (RTf) y, en el caso contrario, cuando hay un exceso de Fe,

ocurre un aumento de la síntesis de ferritina. El RTf tiene como función unir e internalizar a la Tf (mono o diférrica), en todas las células que utilizan Fe. Tanto la expresión del receptor de transferrina como de la ferritina son reguladas en función de la disponibilidad y demanda de Fe para asegurar la homeostasis celular (Forrellat *et al.*, 2000).

### ***Captación y transporte de Fe hemínico***

El Fe hemínico, proveniente de los alimentos de origen animal (carnes rojas) es la forma más biodisponible de Fe dietario y es el que forma parte de la hemoglobina, mioglobina, citocromos y muchas otras hemoproteínas. El grupo hem presente en estas proteínas está formado por un anillo orgánico complejo, llamado protoporfirina, al que se une un átomo de  $Fe^{+2}$  (Figura 1).

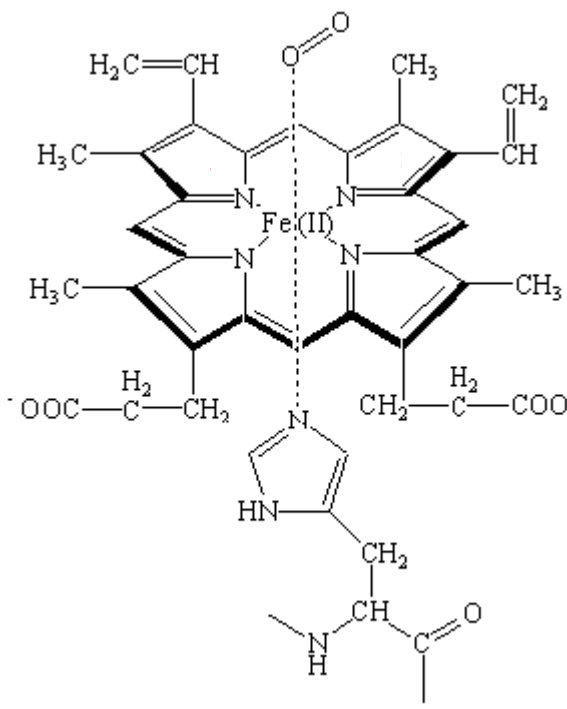


Figura 1. Estructura del grupo hem

El grupo hem es liberado por digestión proteolítica desde la hemoglobina y mioglobina en el lumen del intestino delgado proximal, siendo soluble en medios alcalinos, razón por la cual no son necesarios los favorecedores de la absorción intraluminales (Cook, 1990). Su mecanismo de captación no compete con la del Fe no hemínico, indicando que la adquisición ocurre por un mecanismo distinto. Actualmente existen algunas controversias respecto al mecanismo de captación de este tipo de Fe, ya sea por la existencia de un transportador o receptor específico ubicado en las vellosidades intestinales para el Fe hemínico o por difusión pasiva (Boccio *et al.*, 2003; Mackenzie y Garrick, 2005; Uc *et al.*, 2004). Shayeghi *et al.* (2005), describieron un transportador de membrana al que denominaron HCP1 (Heme carrier protein 1), que media la captación del hem por las células de una manera dependiente de temperatura y saturable. El ARNm de HCP1 se expresa altamente en duodeno y es regulado por hipoxia. En deficiencias de Fe, esta proteína se localiza en el borde apical de los enterocitos duodenales y frente a excesos se ubica en el citoplasma, pero aun así no se descartan las otras formas de transporte.

El grupo hem atraviesa la membrana apical del enterocito como una metaloporfirina intacta, una vez que las proteasas endoluminales o de la membrana del enterocito hidrolizan la globina. Los productos de esta degradación son importantes para el mantenimiento del grupo hem en estado soluble, con lo cual garantizan su disponibilidad para la absorción. En el citosol, el grupo hem (un potente oxidante) es degradado por la enzima hem oxigenasa (HO) a monóxido de carbono, hierro y biliverdina (Forrellat *et al.*, 2000) (Figura 2).

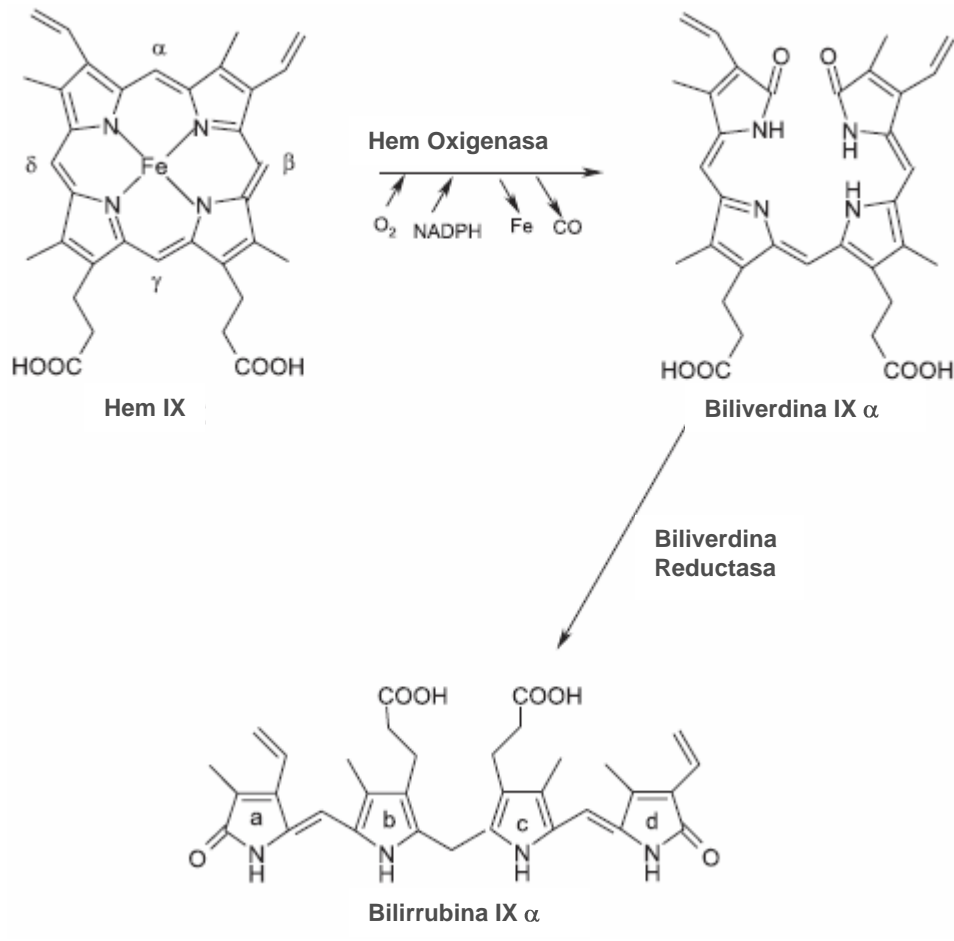


Figura 2. Degradación del grupo Hem. El puente meso carbón de la molécula hem es degradado por la enzima hem oxigenasa (HO), formando biliverdina y liberando CO y hierro (Fe). La biliverdina es reducida a bilirrubina por la biliverdina reductasa.

Los productos de esta reacción enzimática tienen importantes efectos biológicos incluyendo funciones antioxidantes, antiinflamatorias y citoprotectoras. El Fe liberado por esta reacción se une a ligandos de bajo peso molecular o a una proteína similar a la transferrina, formando junto al Fe no hemínico parte del pool común de la célula y competirá con este último por el transporte hacia la sangre a través de los transportadores ubicados en la membrana basolateral del enterocito, o bien será secuestrado por la ferritina que lo entregará según requerimientos del organismo o se perderá cuando la célula muera y se descame (Boccio *et al.*, 2003).

En países donde los productos de origen animal, en especial las carnes rojas, son parte significativa de la dieta, una proporción importante del Fe absorbido proviene del Fe hemínico dietario y normalmente presentan depósitos de Fe repletos (Follet *et al.*, 2001; Pizarro *et al.*, 2003).

### ***Regulación de los niveles de Fe***

Tanto la captación del Fe hemínico como la del Fe inorgánico se correlacionan directamente con la velocidad de eritropoyesis e inversamente con los depósitos de Fe, sin embargo la captación de Fe hemínico se afecta menos que la del Fe no hemínico con los depósitos de Fe (Carpenter *et al.*, 1992).

La presencia del hem en el citosol, produce una disminución en el tiempo de procesamiento del Fe intracelular y actuaría como un inductor de la expresión de ferritina y de la HO en forma simultánea, lo que resulta en una disminución de la exposición por parte de la célula a altos niveles de Fe (Mascotti *et al.*, 1995).

### ***Relación entre la actividad de la hem oxigenasa y el metabolismo de Fe***

Existen 3 isoformas de la enzima hem oxigenasa (HO), las que excepto por el dominio de unión al hem -el que es altamente conservado-, comparten una pequeña similitud en la estructura primaria (Chen *et al.*, 2000). Dos de las isoenzimas son de expresión constitutiva, HO-2 y HO-3, cuya distribución se describe en cerebro, testículos, endotelio, hígado y plexo mesentérico del tracto gastrointestinal y una de expresión inducible, HO-1, que está distribuida prácticamente en todos los tejidos, incluyendo hígado, bazo, páncreas, intestino, riñón, corazón, retina, próstata, pulmón, piel, cerebro, médula espinal,

musculatura lisa de paredes vasculares y células endoteliales. Se ha sugerido que HO-2 puede actuar como un regulador de la función celular, mientras que HO-1 juega un rol modulando la respuesta tisular en estados fisiopatológicos, pues incrementa su expresión frente a varios agentes oxidantes incluyendo metales pesados, mediadores inflamatorios, radiación ultravioleta, endotoxinas, hem/hemoglobina, LDL oxidada, citoquinas, óxido nítrico, factores del crecimiento tales como factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento tumoral (TGF), además de las condiciones de hipoxia e hipoxia (Agarwal y Nick, 2000; Chen *et al.*, 2002; Exner *et al.*, 2004; Keyse y Tyrrell, 1989). La inducción de HO-1 ha estado implicada en numerosas etapas de patologías clínicamente relevantes incluyendo rechazo a transplantes, hipertensión, aterosclerosis, enfisema pulmonar, shock endotóxico, entre otras (Bach, 2002; Exner *et al.*, 2004).

El estrés celular provoca la inducción rápida de la HO-1 que cataliza (en una reacción que utiliza 3 moles de O<sub>2</sub> y 3 moles de NADPH), la degradación del grupo hem, produciendo biliverdina, monóxido de carbono (CO) y Fe (Bach, 2002; Chen *et al.*, 2000; Ryter y Tyrrell, 2000). Este último, puede producir radicales hidroxilo a través de la reacción de Fenton, y por ende, la liberación de Fe asociada con la inducción de HO-1 podría ser tóxica, sin embargo, este mecanismo de actividad de HO-1 ha resultado ser citoprotector a través de la estimulación de la salida de Fe desde la célula. Por lo tanto, la movilización celular de Fe mediada por HO-1 es un importante mecanismo que controla la sobrevida que sigue al estrés celular (Emerit *et al.*, 2001; Ferris *et al.*, 1999; McCord, 2004).

La actividad de la HO disminuye los niveles de hem, el cual es bien sabido, es el más potente catalizador de la peroxidación lipídica y formación de radicales libres. Chen *et al.* (2000), utilizando cultivos neuronales de rata, demostraron que la sobreexpresión de la

HO-1 protegía contra el daño oxidativo mediado por glutamato, pero no descubrieron la base celular para esta protección, aunque sugerían una actividad chaperona de esta proteína, alta capacidad para secuestrar Fe y liberarlo en el curso de la degradación del hem y la actividad de los productos CO y biliverdina. Por otro lado, Suttner y Dennery (1999), postulaban que la actividad exagerada de la HO-1 puede no ser benéfica, pues en adición a la formación de pigmentos biliares y CO, el Fe liberado produce radicales hidroxilo lo que aumenta el estrés oxidativo, causando pérdida de la citoprotección y acumulación de Fe. Ellos experimentaron con concentraciones bajas, medias y altas de HO, demostrando que el balance de hem y del Fe reactivo determinan el efecto antioxidante de HO-1. A baja expresión de HO-1, existen bajos niveles de hem celular y Fe, un menor daño oxidativo y una mayor regulación de las enzimas. Una alta acumulación de Fe reactivo y alta expresión de HO-1, resulta en aumento del estrés oxidativo, citotoxicidad y proliferación celular anormal.

### ***Productos de la degradación del Hem***

El hem libre ejerce efectos citotóxicos pues incrementa la peroxidación lipídica y la formación de radicales libres. El riñón es particularmente sensible a las moléculas libres del hem, y la lesión inducida por hem parece ser un componente importante de rabdomiolisis, nefrotoxicidad y de isquemia-reperfusión inducida en los modelos animales. El hem es degradado por la HO para producir cantidades equimolares de monóxido de carbono (CO), de hierro, y de biliverdina (BV). Esta última es reducida a bilirrubina (BR) por la biliverdina reductasa (BVR).



La biliverdina, la bilirrubina y el CO eran consideradas residuos metabólicos tóxicos, sin embargo se ha demostrado que tienen características vasodilatadoras, antiinflamatorias, antiapoptóticas, antioxidantes, e inmuno-moduladoras asociados a la inducción de HO-1 en dosis-dependiente, lo que es particularmente deseable para la protección de los tejidos.

### **Monóxido de Carbono**

Es un gas descolorido, inodoro que es liberado por fuentes naturales, o con la combustión incompleta del material orgánico incluyendo la madera, el carbón, y el gas natural. Los efectos tóxicos del CO radican en su afinidad por la hemoglobina, que es casi 245 veces mayor que la del oxígeno, por lo tanto este es desplazado de la hemoglobina, dando por resultado hipoxia del tejido. Así, a pesar de la toxicidad irrefutable que ocurre en la exposición prolongada a altas concentraciones de CO, es evidente que existe un rango fisiológico de dosis en donde el CO ejerce efectos vasodilatadores, antiapoptóticos, y antiinflamatorios.

Las investigaciones iniciales de los efectos fisiológicos beneficiosos del CO revelaron que esta molécula ejerce efectos vasodilatadores junto con la relajación del músculo liso en forma similar al óxido nítrico en forma GMP mediada. Los efectos GMP-mediados adicionales del CO incluyen la neurotransmisión, inhibición de la agregación plaquetaria y de la proliferación vascular del músculo liso, la protección de células pancreáticas contra la apoptosis, broncodilatación y citoprotección. El CO ha demostrado modular la inflamación en una variedad de modelos experimentales, reduciendo la producción de citoquinas inflamatorias, mientras que aumenta la producción de citoquinas antiinflamatorias. Los efectos vasodilatadores, antiinflamatorios e inmunomoduladores beneficiosos del CO sugieren que esta molécula pueda tener usos terapéuticos potenciales.

## **Bilirrubina**

La BR sin conjugar se ha considerado como un residuo tóxico del metabolismo del hem. De hecho, la hiperbilirrubinemia es responsable de las diferentes enfermedades que cursan con ictericia, y la BR es capaz además de contribuir a otras formas de la citotoxicidad. La cuestión del porqué la BV, un compuesto no tóxico y soluble en agua, se reduce a la molécula potencialmente tóxica e insoluble BR es un dilema. Sin embargo, en las últimas tres décadas, se han identificado características beneficiosas de la BR. Es uno de los antioxidantes endógenos más importantes del suero.

Junto con características antioxidantes potentes, la BR también ejerce efectos antiinflamatorios. Los efectos de la BR parecen ser particularmente valiosos en la prevención de la enfermedad cardiovascular. Niveles levemente aumentados de BR en el suero han demostrado disminuir el riesgo de desarrollo de enfermedad arterial coronaria y de aterosclerosis en humanos.

## **Biliverdina**

La BV es un compuesto soluble y no tóxico; sin embargo, es reducido rápidamente a BR por la enzima biliverdina reductasa.

## **Hierro**

El Fe libre es una molécula extremadamente prooxidativa, sobre todo con su papel en la reacción de Fenton. La Ferritina es una proteína intracelular que puede secuestrar con eficacia el Fe intracelular y, por lo tanto, limitar su capacidad prooxidativa. La inducción de HO-1 se ha relacionado a un aumento en la expresión de la ferritina. Algunos sugieren que la inducción de la ferritina es igual o más ventajosa que la inducción de HO-1 y que la característica antioxidante de la ferritina es superior a la de la BR. Recientemente, se determinó que la sobreexpresión de la ferritina de cadena pesada se asocia a la inhibición

de la apoptosis de la célula endotelial y del hepatocito. Este encuentro puede ofrecer otro método potencialmente terapéutico de disminuir daño oxidativo en el trasplante de órganos (Kirkby y Adin, 2006).

### ***Polimorfismo en el promotor del gen de la enzima hem oxigenasa 1***

La HO es una enzima con potente efecto antiinflamatorio, antioxidante y antiproliferativo. Su forma inducible, HO-1 posee una expresión regulada por múltiples estímulos, que difiere entre los distintos individuos, esto modulado por los potenciales polimorfismos funcionales en la región promotora del gen de la HO-1.

Se han reconocido tres polimorfismos en la región 5' no traducida del promotor del gen de la HO-1: Un polimorfismo dinucleotídico del tipo microsatélite el cual corresponde a una repetición de (GT)<sub>n</sub> y 2 polimorfismos aislados: G(-1135)A y T(-413)A.

El polimorfismo (GT)<sub>n</sub> origina distintos alelos por variaciones en el número de repeticiones. El tamaño varía entre 12 y 40 repeticiones, siendo más probable entre 23 y 30. El tipo alélico está agrupado en 3 clases según el tamaño de repeticiones de GT: Alelos Cortos (S): <27 GT, Alelos Medianos (M): 27 a 32 GT y Alelos Largos (L): >33 GT. El número de repeticiones (GT)<sub>n</sub> en el promotor del gen de la HO-1 tendría un efecto regulatorio en la inducción del ARNm de HO-1, en la actividad de HO-1 y en la magnitud del efecto antiapoptótico dado por HO-1, es así, que repeticiones menores a 25 demostraron una creciente actividad básica del promotor y mayor regulación transcripcional en respuesta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que las repeticiones mayores a 25 (Exner *et al.*, 2004; Hirai *et al.*, 2003).

Se han identificado varias patologías ligadas al polimorfismo de la HO-1, entre ellas:

- a) Enfermedad pulmonar: El estrés oxidativo se cree desempeña un papel importante en la patogenia de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD: Chronic obstructive pulmonary disease). Se sugiere que los factores endógenos modulan la susceptibilidad del individuo para el desarrollo de la enfermedad. La HO-1 ha demostrado proteger el pulmón contra el estrés oxidativo y así puede ser un componente esencial en mantener el equilibrio entre los oxidantes y los antioxidantes (Otterbein *et al.*, 1999). Se ha investigado la asociación entre el polimorfismo (GT)<sub>n</sub> y COPD. Yamada *et al.* (2000), demostraron en 101 fumadores con COPD comparado a 100 fumadores sin COPD, que aquellos con polimorfismo igual o mayor a 30 GT presentarían una mayor probabilidad de manifestar la patología pulmonar o, viceversa, que aquellos con repeticiones cortas (25 GT) estarían protegidos contra COPD. Estos resultados sugieren que las repeticiones largas de GT reducen la inducción HO-1 en respuesta al cigarrillo, dando por resultado, un riesgo creciente para el desarrollo de COPD.
- b) Enfermedad cardiovascular: El polimorfismo (GT)<sub>n</sub> se ha investigado en estudios de la enfermedad arterial coronaria (CAD: Coronary artery disease). Chen *et al.* (2002), encontraron que la presencia de repeticiones iguales o mayores a 32 GT, estaban asociadas a mayor riesgo de presentar CAD en pacientes diabéticos tipo II. En forma similar, Kaneda *et al.* (2002), encontraron en pacientes con hiperlipidemia, diabetes y fumadores que los portadores de repeticiones cortas de GT (27 GT), tienen un riesgo reducido para presentar CAD.
- c) Enfermedad neurológica: Kimpara *et al.*, (1997), fueron los primeros en describir una asociación entre el polimorfismo en el promotor de HO-1 y enfermedad. El estrés oxidativo se ha sugerido que está implicado en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer (Perry *et al.*, 2003) y de

Parkinson. Refiriéndose a la capacidad antioxidante de la HO-1, los autores demostraron que la repetición de GT en el promotor del gen de la HO-1 es altamente polimórfico, aunque no se asoció ningún alelo en particular a la enfermedad neurológica.

- d) Otras enfermedades: Se ha investigado la relación entre el polimorfismo de la HO-1 y aborto recurrente (Denschlag *et al.*, 2004), entre otras. Además existe evidencia considerable de que la HO-1 puede conferir un efecto protector en el trasplante de órganos (Pileggi *et al.*, 2001). Los datos de estos estudios sugieren que la producción intrínseca de HO-1 depende del genotipo del promotor de la HO-1, en respuesta adaptativa a la inflamación y a lesión, ofreciendo así citoprotección eficaz en el trasplante del órgano (Exner *et al.*, 2004).

Hirai *et al.*, (2003), examinaron la expresión del ARNm de HO-1 y la actividad de HO-1 por estímulo del peróxido de hidrógeno en líneas celulares linfoblastoides. Compararon portadores homocigotos de alelos cortos contra portadores homocigotos de alelos largos, según la apoptosis mediada por estrés oxidativo en estas células. Las líneas celulares de los portadores de alelos cortos tuvieron más expresión del ARNm de la HO-1 y más actividad de la HO-1, siendo más resistentes a la apoptosis inducida por oxidantes comparado a las líneas celulares de los portadores de alelos largos. Consistentemente, en el primer caso humano de deficiencia de HO-1, las líneas celulares linfoblastoides no demostraron ninguna producción de HO-1 y existía vulnerabilidad severa a la apoptosis inducida por estrés oxidativo. Estos datos sugieren que el análisis del polimorfismo del promotor del gen de la HO-1 podría proporcionar información útil para la identificación de pacientes con susceptibilidad a las enfermedades mediadas por estrés oxidativo (Yachie *et al.*, 1999).

## ***Síndrome metabólico***

El síndrome de insulino resistencia también llamado síndrome metabólico o síndrome X, es una patología ligada a la obesidad y al sedentarismo que afecta a 1 de cada 4 individuos en el mundo e incrementa enormemente la posibilidad de desarrollar diabetes tipo 2.

Se dice que una persona padece este síndrome cuando presenta simultáneamente tres o más de los siguientes factores (PAM-Chile, 2005):

- Obesidad abdominal: Perímetro de cintura >102 cm en el hombre y >88 cm en la mujer.
- Hipertrigliceridemia: Triglicéridos  $\geq 150$  mg/dL.
- Bajo colesterol HDL: <40 mg/dL en el hombre y <50 mg/dL en la mujer.
- Hipertensión: Presión arterial  $\geq 130/85$  mmHg o en tratamiento hipotensor.
- Glicemia en ayunas:  $\geq 110$  mg/dL.

## ***Diabetes mellitus***

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica caracterizada por hiperglicemia como resultado de defectos en la secreción de la insulina, acción de la insulina, o ambos. La hiperglicemia crónica se asocia a largo plazo, con daño, disfunción y falla de varios órganos, especialmente ojos, riñones, nervios, corazón, y vasos sanguíneos. Varios procesos patogénicos están implicados en el desarrollo de la diabetes. El rango va desde destrucción autoinmune de las células  $\beta$  del páncreas con consiguiente deficiencia de la insulina a las anormalidades que dan lugar a resistencia a la acción de la insulina. La base de las anormalidades en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas en la diabetes es por la acción deficiente de la insulina en los tejidos blanco. La deficiencia de la acción

de la insulina resulta de una secreción inadecuada o disminución de la respuesta del tejido a la hormona. La deficiencia en la secreción de insulina y los defectos en la acción de esta, frecuentemente coexisten en el mismo paciente y a menudo es difícil saber cual anomalía, si es única, es la causa primaria de hiperglicemia.

La vasta mayoría de los casos de DM están en 2 categorías etiopatogénicas: DM tipo 1 que corresponde a una absoluta deficiencia de la secreción de insulina como causa de un proceso patológico autoinmune ocurrido en los islotes pancreáticos y por marcadores genéticos y DM tipo 2, cuya causa es una combinación de resistencia a la acción de la insulina y una inadecuada respuesta secretoria compensatoria de esta hormona.

La DM tipo 2 (DM-2) es una enfermedad, que ha adquirido en los últimos años proporciones de auténtica epidemia, se asocia frecuentemente con obesidad, alteraciones del metabolismo lipídico y proteico. Está muy relacionada con la resistencia insulínica que es el proceso fisiopatológico común al conjunto de factores de riesgo cardiovascular (American Diabetes Association, 2006).

### ***Relación entre hierro y diabetes***

El Fe es un metal de transición altamente oxidable y se sugiere que junto a la lipoperoxidación juega un rol en la etiología de la diabetes, pues influencia el metabolismo de la glucosa. En la población en general, los depósitos de Fe aumentados se han asociado con intolerancia a la glucosa y diabetes mellitus tipo 2. Si bien los depósitos repletos de Fe se reflejan en valores altos de ferritina sérica, la ferritina también aumenta frente a situaciones de inflamación aguda o crónica, por su condición de proteína de fase aguda (Ford y Cogswell, 1999), aunque se ha visto que existe asociación entre marcadores de

inflamación y riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 (Hu *et al.*, 2004). Lee *et al.* (2003) por su parte, demostraron que el consumo de Fe hemínico en alta cantidad o la suplementación con Fe está asociada con incremento en el riesgo de presentar diabetes mellitus tipo 2. Por otro lado, Jiang *et al.* (2004), demostraron una positiva asociación entre el consumo de Fe hemínico sólo a partir de carnes rojas y el riesgo de desarrollo de esta enfermedad.

El efecto catalítico del Fe, convierte radicales libres pobremente reactivos como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en uno altamente reactivo como es el radical hidróxilo (OH) (Reif, 1992). La formación de radicales OH causa un gran daño en las células productoras de insulina del páncreas, disminuye la capacidad del hígado de extraer insulina y disminuye la internalización de ésta a la célula provocando hiperinsulinemia periférica. El Fe depositado en el músculo disminuye la captación de glucosa debido al daño muscular. La insulina por su parte influye en el metabolismo del Fe, ya que aumenta su captación, además de aumentar la síntesis de ferritina. (Fernández-Real *et al.*, 2002; Salonen *et al.*, 1998). El exceso de Fe, contribuiría así, inicialmente, a la resistencia a la insulina y posteriormente a la disminución de la secreción de esta (Jiang *et al.*, 2004).

La diabetes mellitus no insulino dependiente o tipo 2 es una enfermedad multifactorial, y puede acompañarse por una acumulación de Fe en los tejidos (manifestado como altas concentraciones de ferritina). En la hemocromatosis hereditaria, enfermedad que se caracteriza por una sobre absorción de Fe, el 53-80% de los pacientes con hemocromatosis desarrolla diabetes cuya presentación se relaciona a la magnitud del exceso en la absorción de Fe.



## **HIPÓTESIS**

Los depósitos aumentados de hierro y el número de repeticiones (GT)<sub>n</sub> en el promotor del gen de la enzima HO-1, son factores determinantes que favorecen las complicaciones de la Diabetes Mellitus tipo 2.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la relación entre el polimorfismo en el promotor del gen de la enzima HO-1 y los depósitos de Fe con la presentación de diabetes mellitus tipo 2. Además, determinar si los componentes del síndrome metabólico pueden ser considerados factores de riesgo para la presentación de diabetes mellitus tipo 2. Establecer la razón de riesgo (Odds Ratio) entre estos factores.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estimar la frecuencia del polimorfismo en el promotor del gen de la enzima HO-1 (repeticiones GT), en población diabética, insulino resistente y control.
- Evaluar la actividad de la enzima HO en población diabética, insulino resistente y control, asociados con los niveles de hierro y ferritina sérica.
- Determinar el efecto del polimorfismo en el promotor del gen de la HO-1 sobre la actividad enzimática de la HO y los depósitos de Fe.
- Determinar la correlación existente entre los grupos estudiados con la actividad enzimática de la HO y los depósitos de Fe.
- Establecer el nivel de riesgo que se asocia a los parámetros que considera el síndrome metabólico para la presentación de diabetes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Tipo de Estudio y tamaño muestral*

Corresponde a un estudio de tipo transversal, descriptivo. Para el cálculo del tamaño muestral, se estableció un mínimo de 30 sujetos de cada grupo.

### *Población en estudio*

En el período comprendido entre agosto de 2005 y agosto de 2006, se obtuvieron muestras sanguíneas, por punción venosa, de 216 individuos mayores de 45 años, luego de un ayuno nocturno (12 horas) y dieta baja en grasas por 48 horas. De estos, 99 fueron pacientes diabéticos tipo 2 diagnosticados y controlados en el consultorio del Hospital San Juan de Dios, 50 sujetos insulino resistentes cuyo diagnóstico se realizó en el consultorio del Hospital San Juan de Dios y 67 sujetos controles no diabéticos que asistieron al laboratorio de micronutrientes del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile.

Se recolectaron las siguientes muestras sanguíneas:

- 7 mL en tubos con EDTA: 3 mL para la purificación de ADN genómico de linfocitos y monocitos y 4 mL para determinar la actividad de la HO.
- 3 mL en tubo con EDTA para análisis hematológico (hematocrito, VCM, recuento de eritrocitos y leucocitos) en Coulter Counter modelo Celytyn 1700
- 10 mL en tubo sin anticoagulante para determinaciones bioquímicas (glicemia, insulinemia, enzimas, bilirrubina, colesterol, triglicéridos, entre otros), con el objetivo de caracterizar a los sujetos y descartar a todos aquellos que tuviesen alguna patología concomitante que interfiriese con el estudio. Para el estudio de los depósitos de Fe, se

determinó: Fe total (Espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito, Simaa 6100, Perkin Elmer) y Ferritina sérica por ELISA, que es una medida directa de los depósitos de Fe.

### ***Obtención y amplificación del ADN***

Se extrajo ADN genómico a partir de 3 mL de sangre periférica, según el protocolo de Chomczynsky con modificaciones, descrito en el anexo 1. El ADN así obtenido fue cuantificado a 260/280 nm por espectrofotometría (Gene Quant, Pharmacia Biotech) para establecer su concentración y pureza. Una vez cuantificado el ADN se procedió a la amplificación específica del promotor del gen de la HO-1. Para ello se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con partidores específicos para la región 5' no traducida del gen de la HO-1 a) 5' CCC AAA GCT TGC AGC TTC TCA GAT NED -3' (fluorescente) y b) 3' GGG AAA CGA ATT CTG GCC ATA GGA C en termociclador Applied Biosystems modelo 2720 en 30 ciclos de 20 segundos (s) a 94° C, 20 s a 60° C y 20 s a 72° C (Chen *et al.*, 2002; Hirai *et al.*, 2002; Yamada *et al.*, 1999). 3 µL del producto del PCR se mezclaron con 2 µL de Loading dye 6X y se cargaron en un gel de agarosa al 2,5% que se corrió a 100V por 1 hora aproximadamente para visualizar la banda de amplificación (Figura 3). Luego, los productos PCR fueron sometidos a Electroforesis en Capilar (Laboratorio GenyTec Ltda.), para la medición del promotor del gen de la HO-1 y así determinar el número de repeticiones GT.

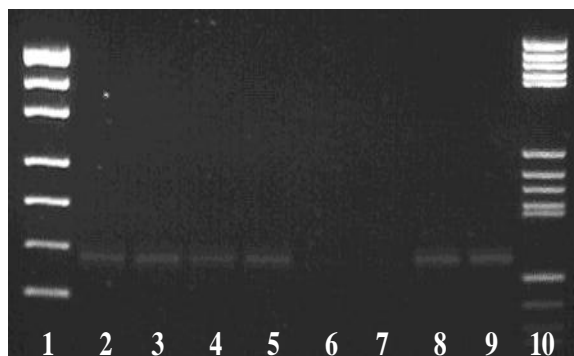


Figura 3. Electroforesis de los productos PCR en gel de agarosa 2,5% en buffer TAE 1X. Carriles 1 y 10: marcador de peso molecular pUC y pBR322, respectivamente; 2-5 y 8-9 bandas de amplificación del promotor del gen de la HO-1 (aprox. 145 pares de bases). Tinción bromuro de etidio (0,5 µg/ml).

### ***Extracción de Biliverdina Reductasa desde hígado de rata***

Se utilizó el hígado de 9 ratas (*Rattus norvegicus*), los que fueron perfundidos *in situ* con suero fisiológico (NaCl 0,9%) hasta completa decoloración, luego fueron disectados y homogenizados en buffer de lisis (Citrato de sodio 0,1 M; pH 5,0; 10% de glicerol). Después se centrifugó a 10000 x g por 20 minutos y a 105000 x g por una hora en los cuales se rescató el sobrenadante, este se diluyó en buffer de homogenización (KH<sub>2</sub>PO<sub>5</sub> 20 mM; KCl 135 mM; EDTA 0,1mM; pH 7,4) y se almacenó en tubos eppendorf de 1,5 mL a -20° C hasta su utilización.

### ***Actividad de la Hem Oxigenasa***

Para medir la actividad de la HO, se utilizaron 4mL de sangre de los sujetos, de los que se obtuvo mediante Histopaque-1077® (Sigma-Aldrich) células mononucleares (PMN). Para ello, se centrifugaron 4 mL de Histopaque más 4 mL de sangre por 30 minutos a 1500 x g. Los PMN obtenidos fueron lavados con 10 mL de buffer fosfato salino (PBS) 1X (8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> cantidad suficiente para 1 L de

H<sub>2</sub>O destilada), centrifugados por 10 minutos a 1500 x g y el pellet fue resuspendido en 500 µL de PBS 1X y centrifugado por 10 minutos a 1500 x g. Luego el pellet fue resuspendido bajo campana (SterilGARD VBM-600) en una placa estéril que contenía 1 mL de medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) y 100µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 900 µM e incubado por 18 hrs, a 37° C con 5% CO<sub>2</sub>, 90% humedad (Incubador Shel lab). Posteriormente, el pellet de PMN se centrifugó por 10 minutos a 1500 x g y fue homogenizado en 100µL de buffer de lisis no denaturante (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, KCl 135 mM; EDTA 0,10 mM; pH 7,4), centrifugado por 20 minutos a 10000 x g e incubado por una hora a 37° C en oscuridad con la siguiente mezcla de reacción: 100 µL de muestra, 100 µL de Hemina 15 µM (Sigma-Aldrich), 100µL de biliverdina reductasa 100 µg/mL obtenida de los hígados de rata, 600 µL de buffer de resuspensión (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM; pH 7,4). La reacción se inició cuando se agregó 100 µL de NADPH 1mM (Sigma-Aldrich). Posteriormente, se extrajo la bilirrubina formada con 1 mL de cloroformo mediante agitación por una hora y centrifugación por 5 minutos a 200 x g. La concentración de bilirrubina se midió en espectrofotómetro (Shimadzu, modelo UV-1601) a 530 nm. La actividad se expresó como nmoles de bilirrubina formada/mg de proteína total/hora, lo que se determinó en función de su coeficiente de extinción molar ( $\epsilon = 43,5 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ) (McNally *et al.*, 2004; Kutty y Maines, 1981; Hirai *et al.*, 2003).

### ***Determinación del nivel de riesgo asociado a los factores presentados en el síndrome metabólico***

Se realizó un estudio de casos y controles, considerando como casos a los individuos clasificados como diabéticos e insulino resistentes. Los controles son todos aquellos individuos que no pertenecen a dichas clasificaciones. Posteriormente se calculó Odds

Ratio para los factores del síndrome metabólico que son: obesidad abdominal, hipertrigliceridemia, bajo colesterol HDL, hipertensión y glicemia en ayunas.

### ***Análisis Estadístico***

- Se utilizó la prueba de  $\chi^2$  para la hipótesis de independencia para comparar las distribuciones alélicas y genotípicas en los distintos grupos (diabéticos, insulino resistentes y controles (Di Rienzo *et al.*, 2005).
- Para el análisis de la actividad de la HO entre las distintas condiciones (diabético, insulino-resistente y controles) y el depósito de Fe entre las mismas condiciones, se utilizó análisis de varianza. Posteriormente, cuando se encontraron diferencias en el análisis mencionado, se aplicó la prueba de Tukey para comparaciones múltiples (Software InfoStat v2005d.1).
- Para la comparación de la actividad de HO y los depósitos de Fe en los distintos genotipos se utilizó análisis de varianza (Software InfoStat v2005d.1).
- Para analizar la relación entre la actividad de la HO, el Fe y los depósitos de Fe, en las distintas condiciones, se realizó análisis de varianza de efectos fijos o un factor de clasificación (Software InfoStat v2005d.1).

## RESULTADOS

### *Descripción de los grupos en estudio*

Los grupos estudiados, diabéticos, insulino resistentes y controles, todos mayores de 45 años, fueron clasificados como tal, según distintos parámetros antropométricos y bioquímicos. Al analizarlos, se muestra que la mayor diferencia entre los grupos fue en la glicemia, siendo mucho mayor en el grupo de diabéticos. Estos datos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Parámetros relevantes en la elección de la población

<b>Parámetro</b>	<b>Diabéticos (n=99)</b>	<b>Insulino Resistentes (n=50)</b>	<b>Controles (n=67)</b>
<i>Edad (años)</i>	62 ± 9,8	57 ± 14,3	54 ± 7,0
<i>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</i>	28 ± 4,1	30 ± 4,7	27 ± 3,8
<i>Presión Sistólica (mmHg)</i>	139 ± 16,2	133 ± 18,8	93 ± 13,6
<i>Presión Diastólica (mmHg)</i>	85 ± 8,9	84 ± 10,6	81 ± 7,2
<i>Fe sérico (µg/dL)</i>	111 ± 47,3	123 ± 61,1	118 ± 58,9
<i>Glicemia</i>	217 ± 91,7	97 ± 18,7	94 ± 11,0
<i>Colesterol total</i>	213 ± 58,3	227 ± 53,1	220 ± 45,4
<i>Colesterol HDL</i>	40 ± 11,7	37 ± 10,7	47 ± 10,2
<i>Triglicéridos</i>	180 ± 99,6	207 ± 176,3	130 ± 80,1

*Valores expresados como promedio ± DS*

Los parámetros de actividad de la HO y depósitos de Fe, no siguen una distribución normal, si no que su curva de distribución está desplazada a la izquierda, por lo tanto sus resultados fueron transformados a logaritmo natural y sus promedios expresados como promedio geométrico más rango, tal como se describe en la tabla 2.

Tabla 2. Actividad de la HO y Ferritina sérica en Diabéticos, Insulino resistentes y sujetos controles.

		<i>Parámetro</i>	
		<i>Actividad HO (*)</i>	<i>Fn sérica (µg/L) (*)</i>
<b><i>Diabéticos</i></b> <b><i>(n=99)</i></b>	Promedio	0,7	4,0
	Desviación Estándar	0,6	0,5
	Rango ( promedio $\pm$ DS )	0,1 - 1,2	3,5 - 4,5
<b><i>Insulino Resistentes</i></b> <b><i>(n=50)</i></b>	Promedio	0,4	3,8
	Desviación Estándar	0,3	0,6
	Rango ( promedio $\pm$ DS )	0,1 - 0,6	3,2 – 4,4
<b><i>Controles</i></b> <b><i>(n=67)</i></b>	Promedio	0,3	3,6
	Desviación Estándar	0,3	0,8
	Rango ( promedio $\pm$ DS )	0,03 - 0,6	2,8 – 4,4

- Actividad de la HO expresada como nmoles de bilirrubina formada/mg de proteína total/hora

- Fe de depósito (Ferritina) expresado como µg/dL.

(\*): valores expresados como promedio geométrico más rango



### ***Frecuencias alélicas en el locus polimórfico de la enzima hem oxigenasa.***

El número de repeticiones (GT)<sub>n</sub> en el gen de la HO-1 se presenta en un rango entre 10-41 en los individuos estudiados, tal como se describe en la figura 4.

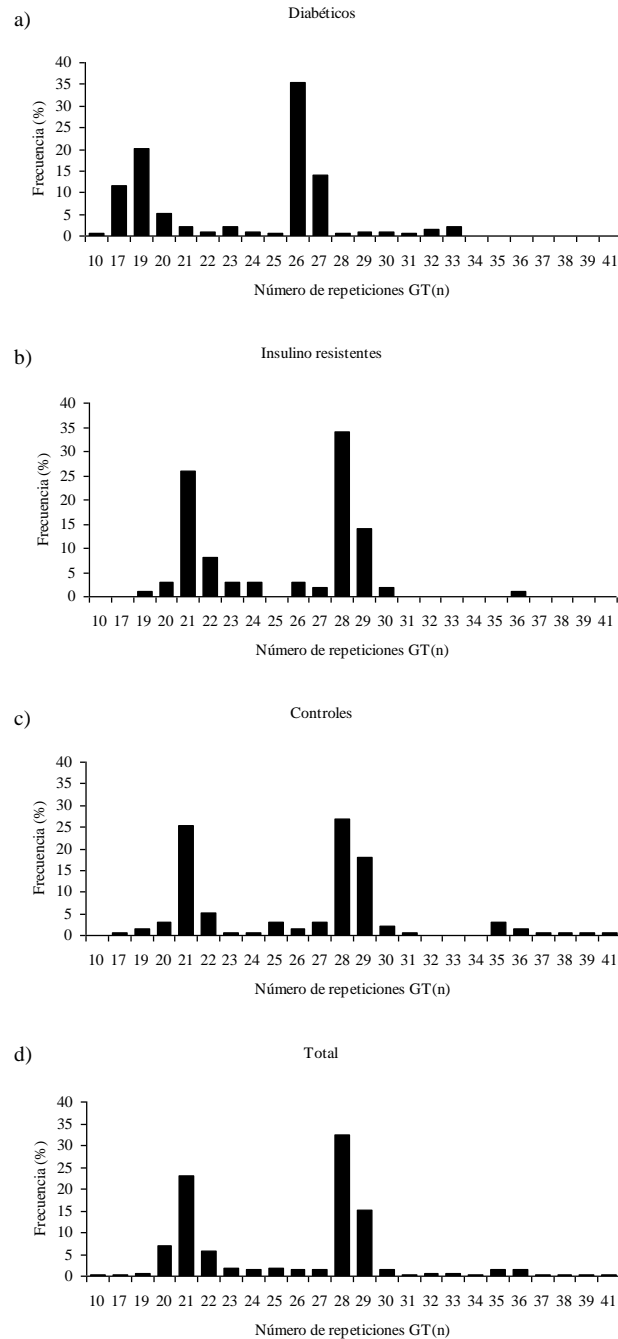


Figura 4. Frecuencia de distribución del número de repeticiones GT en a) sujetos diabéticos (n = 99), b) insulino resistentes (n =50), c) controles (n = 67) y d) total de individuos (n = 216).

La frecuencia de distribución de las repeticiones (GT)<sub>n</sub> en el total fue trimodal, con un máximo localizado en 21 repeticiones (GT)<sub>n</sub>, otro localizado en 28 y un tercero más bajo entre 35 y 36 repeticiones. Por esto, se dividieron los alelos en tres subclases, según el número de repeticiones (GT)<sub>n</sub> -acorde a la convención internacional-, tal como describe en su análisis, Yamada *et al.* (2000), quienes designan como “clase C” a los sujetos con < 27 repeticiones GT, “clase M” a los sujetos que tienen entre 27 y 32 repeticiones GT y “clase L” a los que tienen ≥ 33 repeticiones GT. Cuando se considera a todos los sujetos, es decir, diabéticos, insulino resistentes y controles, la distribución de los 432 alelos son 189 (44%) para la clase C, 222 (51%) para la clase M y 21 (5%) para la clase L. (Tabla 3, Figura 5).

**Tabla 3. Frecuencias alélicas en el locus polimórfico.**

Clase Alélica	N° (%) de sujetos		
	Diabéticos (n = 99)	Insulino resistentes (n = 50)	Controles (n =67)
<b>C</b>	86 (43)	47 (47)	56 (42)
<b>M</b>	102 (52)	52 (52)	68 (51)
<b>L</b>	10 (5)	1 (1)	10 (7)

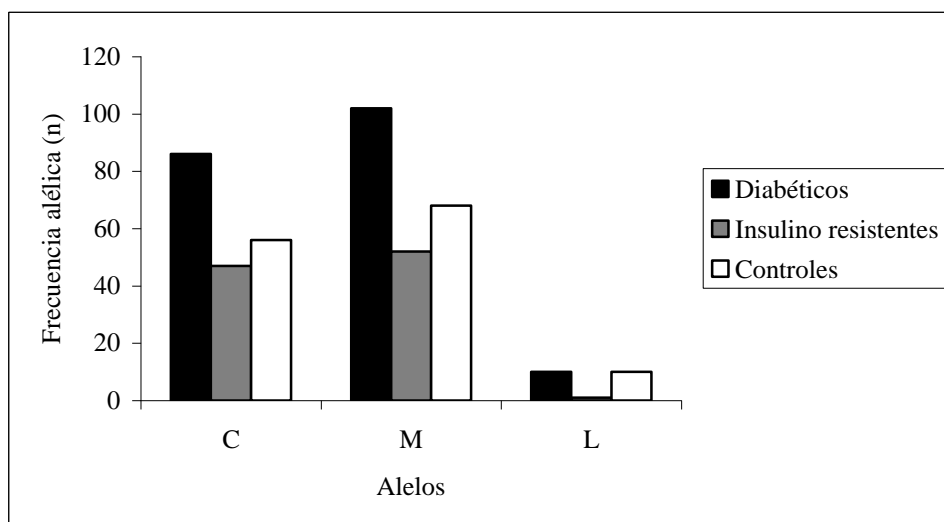


Figura 5. Distribución alélica en las distintas poblaciones

Se analizó la distribución de los alelos en los individuos pertenecientes a las distintas condiciones (diabético, insulino resistente y control), no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre estos ( $\chi^2_{v_4}=5,32$ ,  $p>0,05$ ).

***Frecuencias genotípicas en grupo de diabéticos, insulino resistentes y controles***

La combinación de los alelos origina 6 genotipos (C/C, C/M, C/L, M/M, M/L, L/L) para el promotor del gen de la HO-1, cuya distribución se presenta en la figura 6 y en la tabla 4.

Para la distribución de los genotipos entre las distintas condiciones se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $\chi^2_{v_7}=18,05$ ,  $p<0,05$ ), las que podrían atribuirse a una menor proporción del genotipo CC en el grupo de los diabéticos y a una mayor proporción del genotipo CC y menor del genotipo CM en el grupo control.

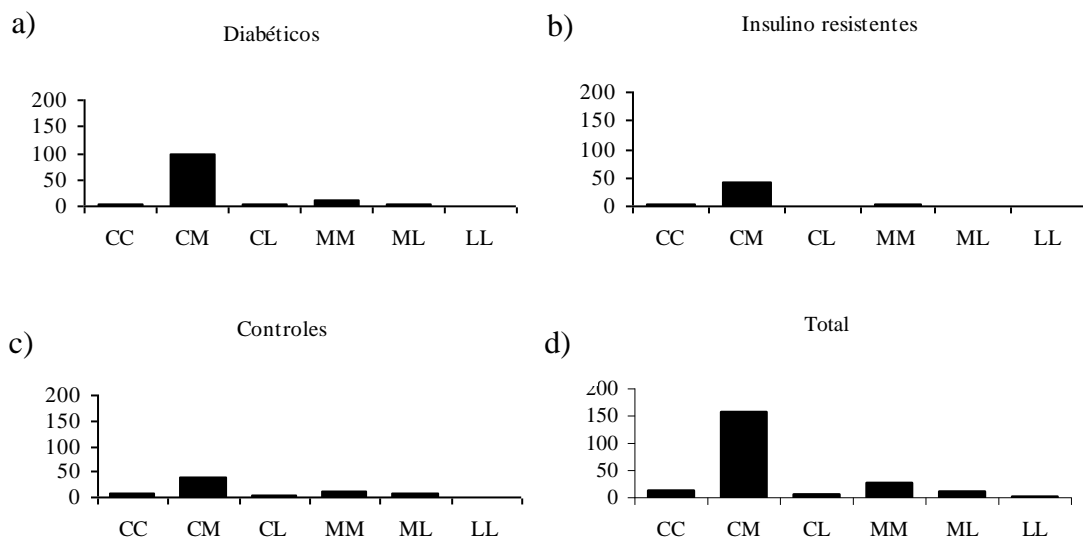


Figura 6. Distribución de los genotipos en grupos a) diabéticos, b) insulino resistentes, c) controles y d) total.

Tabla 4. Distribución de los Genotipos

<b>Condición</b>	<b>N° (%) de sujetos según genotipo</b>					
	<b>CC</b>	<b>CM</b>	<b>CL</b>	<b>MM</b>	<b>ML</b>	<b>LL</b>
<b>Diabéticos</b>	2 (2)	78 (79)	4 (4)	10 (10)	4 (4)	1 (1)
<b>Insulino resistentes</b>	3 (6)	41 (82)	-	5 (10)	1 (2)	-
<b>Controles</b>	8 (12)	38 (57)	2 (3)	12 (18)	6 (9)	1 (1)

### *Actividad de la HO según las distintas condiciones*

La actividad de la HO muestra diferencias estadísticamente significativas entre las distintas condiciones, diabéticos, insulino resistentes y controles ( $F=12,1$ ;  $p<0,0001$ ). La prueba de comparaciones múltiples de Tukey indica que estas diferencias se explican porque la actividad de la HO que presenta el grupo de diabéticos es mayor que la exhibida por los grupos insulino resistente y control ( $p\leq 0,05$ ). Estos datos se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Actividad de la HO (nm de bilirrubina formada por mg de proteína total/hr) según la condición

<b>Condición</b>	<b>Medias</b>	<b>N</b>
Control	0,44 <sup>a</sup>	67
Insulino resistentes	0,47 <sup>a</sup>	50
Diabéticos	1,36 <sup>b</sup>	99

*Letras distintas indican diferencias significativas ( $p\leq 0,05$ )*

### ***Hierro sérico y de depósito (ferritina sérica) según las distintas condiciones***

Al analizar el hierro sérico entre las distintas condiciones, se encontró que no existían diferencias estadísticamente significativas entre diabéticos, insulino resistentes y controles.

Al analizar el depósito de Fe en la forma de ferritina (Fn) sérica, este presenta diferencias estadísticamente significativas entre las distintas condiciones, diabéticos, insulino resistentes y controles, ( $F=6,0$ ;  $p=0,0029$ ). La prueba de comparaciones múltiples de Tukey indica que estas diferencias se deben a que el depósito de Fe encontrado en el grupo de diabéticos es mayor que el presentado por los individuos del grupo control ( $p \leq 0,05$ ). Estos datos se resumen en la tabla 6.

Tabla 6. Hierro de depósito (Ferritina) ( $\mu\text{g/dL}$ ) según la condición

<b><i>Condición</i></b>	<b><i>Medias</i></b>	<b><i>n</i></b>
Control	46,75 <sup>a</sup>	67
Insulino resistentes	50,97 <sup>a,b</sup>	50
Diabéticos	60,03 <sup>b</sup>	99

*Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )*

### ***Actividad de la HO según los distintos genotipos***

La actividad de la HO no presenta diferencias estadísticamente significativas entre los distintos genotipos, CC, CM, CL, MM, ML y LL (F=1,54; p= 0,1794).

### ***Fe sérico y de depósito (Fn sérica) según los distintos genotipos***

Al analizar el hierro sérico entre los distintos genotipos (CC, CM, CL, MM, ML y LL), se encontró que no existían diferencias estadísticamente significativas.

Al analizar el depósito de Fe (Fn sérica), se encontró que este presenta diferencias estadísticamente significativas entre los distintos genotipos CC, CM, CL, MM, ML y LL (F=2,31; p=0,0449).

La prueba de comparaciones múltiples de Tukey indica que las diferencias se deben a que el depósito de Fe encontrado en los genotipos CC, MM y ML son menores que los presentados por individuos con el genotipo LL ( $p \leq 0,05$ ). Estos datos se resumen en la tabla 7.

Tabla 7. Hierro de depósito (Ferritina) ( $\mu\text{g/dL}$ ) según genotipo

<b><i>Genotipo</i></b>	<b><i>Medias</i></b>	<b><i>n</i></b>
CC	39,71 <sup>a</sup>	13
CM	55,85 <sup>a,b</sup>	157
CL	65,37 <sup>a,b</sup>	6
MM	41,38 <sup>a</sup>	11
ML	49,50 <sup>a</sup>	27
LL	78,15 <sup>b</sup>	2

*Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )*

***Relación entre la actividad de la HO, Fe y depósitos de Fe según la condición***

Al analizar la relación que existe entre la actividad de la HO con el nivel de Fe sérico, hay una relación con significancia estadística sólo para el grupo de diabéticos ( $p < 0,0001$ ). Estos datos se muestran en la figura 7.

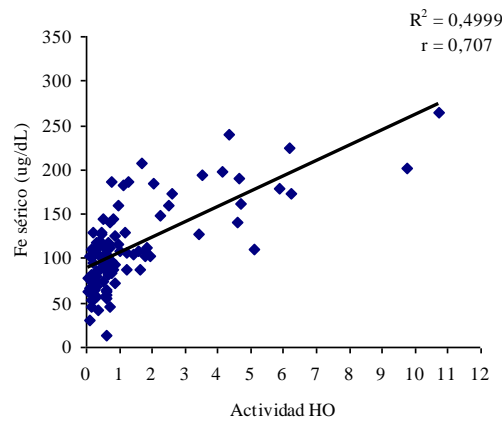


Figura 7. Relación entre la actividad de la HO y los niveles de Fe sérico en diabéticos

Al estudiar la relación entre la actividad de la HO y los niveles de Fn sérica, se encontró que existe una asociación estadísticamente significativa en el grupo insulino resistente ( $p = 0,0062$ ) tal como se muestra en la figura 8.

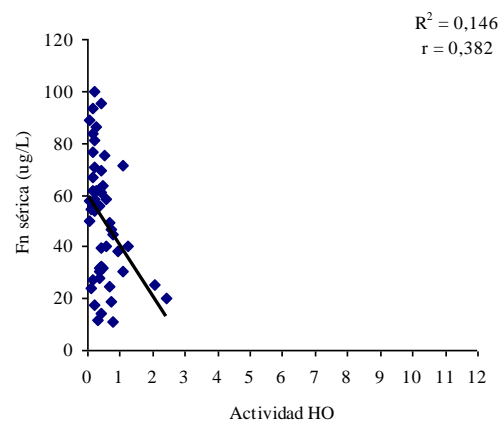


Figura 8. Relación entre la actividad de la HO y los niveles de Fn sérica en insulino resistentes.

Al analizar la relación entre los niveles de Fe sérico y los depósitos de Fe (Fn sérica), se encuentra que para los 3 grupos estudiados (diabéticos, insulino resistentes y controles), existen asociaciones estadísticamente significativas ( $p=0,0001$ ,  $p=0,0268$  y  $p<0,0001$ , respectivamente). Estas asociaciones se grafican en la figura 9.

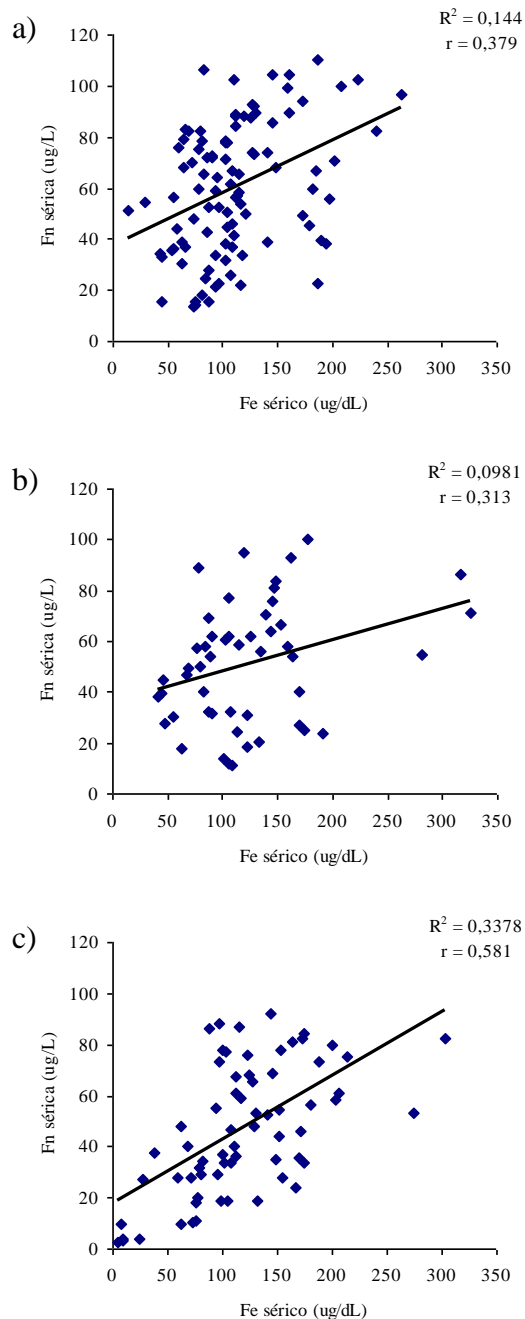


Figura 9. Relación entre el nivel de Fe sérico y los depósitos de Fe (Fn sérica) en el grupo de a) diabéticos, b) insulino resistentes y c) controles.



### ***Factores de riesgo***

Al estudiar los datos que se asocian con el Síndrome Metabólico, obtenidos a través del perfil bioquímico, presión arterial y circunferencia de cintura, se analizó el nivel de riesgo que presentaría cada uno de estos para la manifestación de diabetes, mediante un estudio de casos y controles. Como caso, se consideró a los individuos pertenecientes a los grupos diabético e insulino resistente y control al grupo control.

Se apreció que un nivel de glicemia en ayunas  $\geq 110$  mg/dL, es el principal factor de riesgo, para la presentación de diabetes mellitus tipo 2, seguido de la hipertrigliceridemia. Los valores del odds ratio encontrados para cada uno de los factores del síndrome metabólico son presentados en la tabla 8.

Tabla 8. Factores de riesgo

<b><i>Factor</i></b>	<b><i>Casos</i></b>	<b><i>Controles</i></b>	<b><i>Odds ratio</i></b>
<i>Obesidad abdominal</i>	145	67	2,09
<i>Hipertrigliceridemia</i>	149	67	6,52
<i>Bajo colesterol HDL</i>	148	67	3,82
<i>Hipertensión</i>	149	67	3,64
<i>Glicemia en ayunas</i>	149	61	7,85

## DISCUSIÓN

La diabetes mellitus tipo 2 es uno de los grandes desafíos de salud actualmente y se sitúa como una auténtica epidemia del siglo XXI. A lo largo del mundo, más de 140 millones de personas padecen actualmente esta enfermedad, de los que un gran porcentaje corresponde a la población adulta, mayor de 50 años, aunque va en aumento el número de casos de esta enfermedad en la población infantil y juvenil. Se estima que los casos de diabetes aumentarán al doble en 25 años más (Organización Mundial de la Salud, 1998), esto dado por la mayor expectativa de vida de la población, por los cambios en la dieta y el estilo de vida más sedentario (Zimmet *et al.*, 1997).

Para efectos de este estudio y teniendo los antecedentes de la mayor presentación de diabetes en el estrato etario mayor de 50 años, se estableció un mínimo de edad de 45 años para la elección de los 3 grupos a estudiar. Los resultados arrojaron que la población diabética presentó un promedio de edad mayor que los otros grupos, siendo más del 50% mayor de 60 años. Con respecto a los controles, si bien estos no clasificaban como insulino resistentes por no presentar tres o más de los parámetros ligados a este síndrome, muchos presentaban uno o dos, lo que podría desencadenar que a futuro presentarán insulino resistencia o diabetes, sobretodo teniendo en cuenta que la población de controles no superaba en promedio los 54 años.

La obesidad es el mayor factor de riesgo ligado a diabetes mellitus tipo 2. Dado los resultados obtenidos en los factores de riesgo, se evidencia que la mala alimentación y el sedentarismo son factores tanto o más riesgosos para padecer insulino resistencia o diabetes mellitus tipo 2 que el factor genético, y este es un punto importante de notar pues algunos sujetos que llegaron a la toma de muestras como sujetos controles, al momento de los resultados fueron diagnosticados como insulino resistentes o diabéticos,

lo que indica que estas patologías que son de más fácil tratamiento en sus inicios, están subdiagnosticadas.

Una dieta rica en hierro hemínico (carnes rojas), aumentaría aún más el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 (Lee *et al.*, 2003). Almacenamientos de Fe altos aún en el rango que no se asocia a hemocromatosis, contribuirían al desarrollo de esta enfermedad (Salonen *et al.*, 1998), pues cuando el Fe es liberado de la ferritina, favorece el estrés oxidativo que deteriora el funcionamiento celular.

En los pacientes diabéticos, las células con altos niveles de expresión de la HO-1, como son los monocitos (Avogaro *et al.*, 2003), tienen mayores niveles de Fe reactivo y síntesis de ferritina (Suttner y Dennery, 1999), tal como se demostró en este estudio, pues al aumentar la actividad de la HO en el grupo de los diabéticos, aumentó a su vez el Fe sérico. En los insulino resistentes, al aumentar la actividad de la HO, disminuye la ferritina sérica. Estos resultados sugieren una posible falla en la regulación de los depósitos de Fe, los que fueron más altos en el grupo de diabéticos. La Fn elevada, aumentaría el estrés oxidativo una vez liberado el Fe de esta molécula. Este Fe induciría un aumento en la expresión de HO-1 (Paredi *et al.*, 1999), generándose un ciclo interminable de daño celular, ya que al aumentar la expresión y actividad de la HO aumentaría el nivel de Fe y ferritina sérica formada en los pacientes diabéticos. En el grupo control se genera la situación inversa, es decir, existe actividad regulada de la HO, la que no altera los niveles de Fe intracelular en el enterocito y por lo tanto, los niveles de Fe sérico y Fn no se verían afectados. En los tres grupos se mantiene que al aumentar el Fe sérico aumenta la síntesis de Fn sérica.

Se plantea que la modulación de la expresión de la enzima HO-1 está dada por el número de repeticiones (GT)<sub>n</sub> en el promotor. Si bien en este estudio hay una mayor presencia de los alelos M y C en la población completa, vale decir, diabéticos, insulino

resistentes y controles, no existe un alelo en particular en el promotor del gen de la HO-1 ligado a diabetes, a diferencia del estudio de Yamada *et al.*, 2000, en donde predomina el alelo L en los sujetos con enfermedad pulmonar. Se observa en cambio, que el genotipo CM predomina en la población diabética al igual como existe una mayor presentación de los genotipos LL y LM en los enfermos pulmonares del estudio de Yamada *et al.*, 2000.

Al tomar la población en general, se observó que los genotipos CM y CL son aquellos que presentan una mayor actividad de la enzima HO y mayores depósitos de Fe, lo que sugiere que estos genotipos son relevantes en la asociación con la diabetes.

## CONCLUSIÓN

El presente estudio demostró que el polimorfismo en la región 5' no traducida en el promotor del gen de la HO-1 está asociado genotípicamente a diabetes mellitus tipo 2. Esta asociación más que ser una causa relevante para la presentación de la diabetes mellitus tipo 2 en humanos, pues deben conjugarse una multiplicidad de factores de riesgo para que se presente, es un gran causal de deterioro en el paciente que ya presenta la enfermedad, pues la inducción de la expresión del gen de la HO, la actividad de la enzima y el efecto citoprotector, estarían modulados por el número de repeticiones GT, lo que generaría una mayor actividad de la enzima HO junto a mayores niveles de depósito de Fe, lo que favorecería un mayor deterioro orgánico en el paciente con diabetes mellitus tipo 2, pues se genera mayor estrés oxidativo y por lo tanto serían factores predisponentes a la presentación de ésta enfermedad

## BIBLIOGRAFÍA

- AGARWAL, A., NICK, H.** (2000). Renal response to tissue injury. Lessons from heme oxygenase-1 gene ablation and expression. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11: 965-973.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION.** (2006). Diagnosis and Classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 29 (1): S43-S48.
- AVOGARO, A., PAGNIN, E., CALÒ, L.** (2003). Monocyte NADPH oxidase subunit p<sup>22phox</sup> and inducible hemeoxygenase-1 gene expressions are increased in type II diabetic patients: relationship with oxidative stress. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88:1753-1759.
- BACH, F.** (2002). Heme oxygenase-1 as a protective gene. *Wien. Klin. Wochenschr.* 114 (4): 1-3.
- BOCCIO, J., SALGUEIRO, J., LYSIONEK, A., ZUBILLAGA, M., GOLDMAN, C., WEILL, R., CARO, R.** (2003). Metabolismo del hierro: conceptos actuales sobre un micronutriente esencial. *A.L.A.N.* 53 (2): 119-132.
- CARPENTER, C., MAHONEY, A.** (1992). Contributions of heme and nonheme iron to human nutrition. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 31 (4): 333-367.
- CHEN, K., GUNTER, K., MAINES, M.** (2000). Neurons overexpressing heme oxygenase-1 resist oxidative stress-mediated cell death. *J. Neurochem.* 75: 304-313.
- CHEN, Y., LIN, S., LIN, M., TSAI, H., KUO, S., CHEN, J., CHARNG, M., WU, T., CHEN, L., DING, P., PAN, W., JOU, Y., CHAU, L.** (2002). Microsatellite polymorphism in promoter of heme oxygenase-1 gene is associated with susceptibility to coronary artery disease in type 2 diabetic patients. *Hum. Genet.* 111: 1-8.
- COOK, J.** (1990). Adaptation in iron metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 51: 301-308.

- DENSCHLAG, D., MARCULESCU, R., UNFRIED, G., HEFLER, L., EXNER, M., HASHEMI, A., RIENER, E., KECK, C., TEMPFER, C., WAGNER, O.** (2004). The size of a microsatellite polymorphism of the haem oxygenase-1 gene is associated with idiopathic recurrent miscarriage. *Mol. Hum. Reprod.* 10: 211-214.
- DI RIENZO, J., CASANOVES, F., GONZÁLEZ, L., TABLADA, E., DÍAZ, M., ROBLEDO, C. Y BALZARINI, M.** (2005). *Estadística para las ciencias agropecuarias*. 6<sup>a</sup> edición. Editorial Brujas, Córdoba, Argentina.
- EISENSTEIN, R., BLEMINGS, K.** (1998). Iron regulatory proteins, iron responsive elements and iron homeostasis. *J. Nutr.* 128 (12): 2295-2298.
- EMERIT, J., BEAUMONT, C., TRIVIN F.** (2001). Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed. Pharmacother.* 55 (6): 333-339.
- EXNER, M., MINAR, E., WAGNER, O., SCHILLINGER, M.** (2004). The role of heme oxygenase 1 promoter polymorphism in human disease. *Free Rad. Biomed.* 37 (8): 1097-1104.
- FERNÁNDEZ-REAL, J., LÓPEZ-BERMEJO, A., RICART, W.** (2002). Cross talk between iron metabolism and diabetes. *Diabetes.* 51: 2348-2354.
- FERRIS, C., JAFFREY, S., SAWA, A., TAKAHASHI, M., BRADY, S., BARROW, R., TYSOE, S., WOLOSKER, H., BARANANO, D., DORE, S., POSS, K., SNYDER, S.** (1999). Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron. *Nat. Cell. Biol.* 1 (3): 152-157.
- FOLLETT, J., SUZUKI, Y., LONNERDAL, B.** (2002) High specific activity heme-Fe and its application for studying heme-Fe metabolism in Caco-2 cell monolayers. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283: G1125-G1131.
- FORD, E., COGSWELL, M.** (1999). Diabetes and serum ferritin concentration among U.S. adults. *Diabetes Care.* 22: 1978-1983.

- FORRELLAT, M., GAUTIER DU DÉFAIX, H., FERNÁNDEZ, M.** (2000).  
Metabolismo del hierro. *Hemoter.* 16 (3): 149-160.
- FRAZER, D., ANDERSON, G.** (2005). Iron Imports. I. Intestinal iron absorption and its regulation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 289: G631-G635.
- HIRAI, H., KUBO, H., YAMAYA, M., NAKAYAMA, K., NUMASAKI, M., KOBAYASHI, S., SUSUKI, S., SHIBAHARA, S., SASAKI, H.** (2003).  
Microsatellite polymorphism in heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to oxidant-induced apoptosis in lymphoblastoid cell lines. *Blood.* 102: 1619-1621.
- HU, F., MEIGS, J., LI, T., RIFAI, N., MANSON, J.** (2004). Inflammatory markers and risk of developing type 2 diabetes in women. *Diabetes.* 53: 693-700.
- JIANG, R., MANSON, J., MEIGS, J., MA, J., RIFAI, N., HU, F.** (2004). Body iron stores in relation to risk of type 2 diabetes in apparently healthy women. *J.A.M.A.* 291 (6): 711-717.
- JIANG, R., MA, J., ASCHERIO, A., STAMPFER, M., WILLETT, W., HU, F.** (2004). Dietary iron intake and blood donations in relation to risk of type 2 diabetes in men: a prospective cohort study. *Am. J. Clin. Nutr.* 79: 70-75.
- KANEDA, H., OHNO, M., TAGUCHI, J., HASHIMOTO, H., OGASAWARA, T., AIZAWA, T., ISHIZAKA, N., NAGAI, R.** (2002). Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism is associated with coronary artery disease in Japanese patients with coronary risk factors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22: 1680-1685.
- KAKHLON, O., CABANTCHIK, Z.** (2002). The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radic Biol Med.* 33 (8): 1037-1046.



- KEYSE, S., TYRRELL, R.** (1989). Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86 (1): 99-103.
- KIMPARA, T., TAKEDA, A., WATANABE, K., ITOYAMA, Y., IKAWA, S., WATANABE, M., ARAI, H., SASAKI, H., HIGUCHI, S., TAKASE, S., SAITO, H., TAKAHASHI, K., SHIBAHARA, S.** (1997). Microsatellite polymorphism in the human heme oxygenase-1 gene promoter and its application in association studies with Alzheimer and Parkinson disease. *Hum. Genet.* 100: 145-147.
- KIRKBY, K., ADIN C.** (2006). Products of heme oxygenase and their potential therapeutic applications. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 290: F563-F571.
- KUTTY, R., MAINES, M.** (1981). Purification and characterization of biliverdin reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 256 (8): 3956-3962.
- LEE, D., FOLSOM, A., JACOBS, D.** (2003). Dietary iron intake and type 2 diabetes incidence in postmenopausal women: the Iowa women's health study. *Diabetologia.* 47: 185-194.
- MACKENZIE, B., GARRICK, M.** (2005). Iron Imports. II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 289: G981-G986.
- MASCOTTI, D., RUP, D., THACH, R.** (1995). Regulation of iron metabolism: Translational effects mediated by iron, heme and cytokines. *Annu. Rev. Nutr.* 15: 239-261.
- McCORD, J.** (2004). Iron, free radicals, and oxidative injury. *J. Nutr.* 134: 3171S-3172S.

- McNALLY, S., ROSS, J., GARDEN, O., WIGMORE, S.** (2004). Optimization of the paired enzyme assay for heme oxygenase activity. *Anal. Biochem.* 332: 398-400.
- MIRET, S., SIMPSON, R., McKIE, A.** (2003). Physiology and molecular biology of dietary iron absorption. *Annu. Rev. Nutr.* 23: 283-301.
- OTTERBEIN, L., KOLLS, J., MANTELL, L., COOK, J., ALAM, J., CHOI, A.** (1999). Exogenous administration of heme oxygenase-1 by gene transfer provides protection against hyperoxia - induced lung injury. *J. Clin. Invest.* 103: 1047-1054.
- PAM-CHILE.** (2005). Síndrome metabólico: La enfermedad del siglo XXI. Boletín PAM-Chile N° 2.
- PAREDI, P., BIERNACKI, W., INVERNIZZI, G., KHARITONOV, S., BARNES, P.** (1999). Exhaled carbon monoxide levels elevated in diabetes and correlated with glucose concentration in blood. A new test for monitoring the disease?. *Chest.* 116 (4): 1007-1011.
- PERRY, G., ÁVILA, J., CASADESUS, G., NUNOMURA, A., TABATON, M., CASH, A., ALIEV, G., WATAYA, T., SHIMOHAMA, S., DREW, K., ATWOOD, C., SMITH, M.** (2003). La función del estrés oxidativo en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. *Rev. Chil. Neuro-psiquiatr.* 41 (2): 47-62.
- PILEGGI, A., MOLANO, R., BERNEY, T., CATTAN, P., VIZZARDELLI, C., OLIVER, R., FRAKER, C., RICORDI, C., PASTORI, R., BACH, F. E INVERARDI, L.** (2001). Heme oxygenase-1 induction in islet cells results in protection from apoptosis and improved in vivo function after transplantation. *Diabetes.* 50: 1983-1991.

- PIZARRO, F., OLIVARES, M., HERTRAMPF, E., MAZARIEGOS, D., ARREDONDO, M.** (2003). Heme-iron absorption is saturable by heme-iron dose in women. *J. Nutr.* 133: 2214-2217.
- REIF, D.** (1992). Ferritin as a source of iron for oxidative damage. *Free. Rad. Biol. Med.* 12: 417-427.
- RYTER, S., TYRRELL, R.** (2000). The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free. Radic. Biol. Med.* 28 (2): 289-309.
- SALONEN, J., TUOMAINEN, T., NYSSÖNEN, K., LAKKA, H., PUNNONEN, K.** (1998). Relation between iron stores and non-insulin dependent diabetes in men: case - control study. *B.M.J.* 317: 727-730.
- SHAYEGHI, M., LATUNDE-DADA, G., OAKHILL, J., LAFTAH, A., TAKEUCHI, K., HALLIDAY, N., KHAN, Y., WARLEY, A., McCANN, F., HIDER, R., FRAZER, D., ANDERSON, G., VULPE, C., SIMPSON, R., McKIE, A.** (2005). Identification of an intestinal heme transporter. *Cell.* 122: 789-801.
- SUTTNER, D., DENNERY, P.** (1999). Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. *F.A.S.E.B. J.* 13: 1800-1809.
- UC, A., STOKES, J., BRITIGAN, E.** (2004). Heme transport exhibits polarity in Caco-2 cells: evidence for an active and membrane protein-mediated process. *A.J.P.* 287: 1150-1157.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION.** (1998). *The World Health Report: Life in the 21st century, a vision for all.*
- YACHIE, A., NIIDA, Y., WADA, T., IGARASHI, N., KANEDA, H., TOMA, T., OHTA, K., KASAHARA, Y., KOIZUMI, S.** (1999). Oxidative stress causes

enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J. Clin. Invest.* 103: 129-135.

**YAMADA, N., YAMAYA, M., OKINAGA, S., NAKAYAMA, K., SEKIZAWA, K., SHIBAHARA, S., SASAKI, H.** (2000). Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am. J. Hum. Genet.* 66: 187-195.

**ZIMMET, P., McCARTY, D., DE COURTEN, M.** (1997). The global epidemiology of non-insulin-dependent diabetes mellitus and the metabolic syndrome. *J. Diabetes Complications.* 11: 60-68.

## ANEXOS

### ANEXO 1: EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA POR LA TÉCNICA DE CHOMCZINSKY.

1. En un tubo Falcon de 15mL se agregan 3 mL de sangre periférica y 9 mL de buffer de lisis (Winkler ®), agitándose delicadamente.
2. Se centrifuga a 4000 r.p.m. por 10 minutos.
3. Se desecha el sobrenadante, visualizándose la formación de un pellet. Se vuelve a agregar 8 mL de buffer de lisis y se agita.
4. Se centrifuga a 4000 r.p.m. por 10 minutos, eliminando el sobrenadante, se vuelve a agregar 5 mL de buffer de lisis y se centrifuga.
5. Se desecha el sobrenadante y se agrega 1 mL de solución de Chomczynsky por 30 minutos.
6. Se separan en tubos eppendorf, se agrega 1 mL de etanol absoluto frío, visualizándose la formación de un precipitado blanco nebuloso.
7. Se centrifuga a 14000 r.p.m. por 3 minutos.
8. Se lava con etanol 70 % 1 o 2 veces, se centrifuga a 14000 r.p.m. y se deja secar por 10 a 15 minutos.
9. Se resuspende en NaOH 8 mM y se deja incubar a -20° C hasta su uso.