

ACADEMIA JOURNALS



OPUS PRO SCIENTIA ET STUDIUM

Humanidades, Ciencia, Tecnología e Innovación en Puebla

ISSN 2644-0903 online

Vol. 5. No. 1, 2023

www.academiajournals.com

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN AUSPICIADO POR EL
CONVENIO CONCYTEP-ACADEMIA JOURNALS



Gobierno de Puebla

Hacer historia. Hacer futuro.



**Secretaría
de Educación**
Gobierno de Puebla

CONCYTEP
Consejo de Ciencia
y Tecnología del Estado
de Puebla

Aline Areli Huerta Rodríguez

Polimorfismo -607 C/A del Gen de Interleucina 18 en Sujetos con Resistencia a la Insulina

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Directora: D.C. Blanca Guadalupe Baez Duarte

Asesor interna: D.C. Irma del Carmen Zamora Ginez

Asesor externo: D.C. Francisco Mendoza Carrera



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE MEDICINA**

**SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN**

**POLIMORFISMO -607 C/A DEL GEN DE INTERLEUCINA
18 EN SUJETOS CON RESISTENCIA A LA INSULINA**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN**

Presenta

ALINE ARELI HUERTA RODRIGUEZ

DIRECTORES

D.C. BLANCA GUADALUPE BAEZ DUARTE (Directora)

D.C. IRMA DEL CARMEN ZAMORA GINEZ (Asesora interna)

D.C. FRANCISCO MENDOZA CARRERA (Asesor externo)

Resumen

Polimorfismo -607 C/A del gen de interleucina 18 en sujetos con resistencia a la insulina

Autora: Aline Areli Huerta Rodríguez

Introducción. La resistencia a la insulina (RI) es un estado patológico en el que los órganos insulino-dependientes no responden adecuadamente a la insulina, lo que puede causar hiperglucemia y a largo plazo desarrollo de Diabetes Mellitus tipo 2 (DT2). Dentro de la fisiopatología de la RI, la obesidad juega un papel muy importante, ya que, la expansión de tejido adiposo, genera alteración en la secreción de mediadores inflamatorio, conocidos como citocinas, entre las que se encuentran la interleucina 18 (IL-18), las cuales generan un proceso inflamatorio local y sistémico. Este proceso genera fosforilación e inactivación de proteína cinasa B (Akt) y la activación de los reguladores negativos de la señalización de la insulina. En la actualidad se sabe que la RI es multifactorial y que factores genéticos también pueden influir en su desarrollo, tal es el caso de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) que consisten en la variación en un solo par de bases y representan los cambios genéticos más distribuidos en el genoma humano. En ocasiones los polimorfismos se asocian a estados metabólicos alterados. El polimorfismo -607 C/A del gen de IL-18 se ha visto asociado a enfermedades que cursan con procesos inflamatorios como el síndrome metabólico, sin embargo, no se ha estudiado su relación con la RI. Objetivo. Determinar la asociación entre el SNP -607 C/A del gen de IL-18 con la presencia de RI en una muestra de la población del Estado de Puebla.

Metodología. Se realizó un estudio comparativo, observacional y transversal, aprobado por el Comité de Investigación de la Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, y llevado cabo en las instalaciones del Hospital Universitario de Puebla (HUP), por medio de la Clínica "Dale un minuto a tu vida" y en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) a través del Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO) de Guadalajara, Jalisco, entre agosto de 2018 y julio de 2020. En donde se estudiaron 40 sujetos con RI y 48 sin RI, que se clasificaron de acuerdo con el Modelo de Homeostasis de Resistencia a la

insulina 2 (HOMA2-IR, por sus siglas en inglés). Además, se les determinaron medidas antropométricas y se les tomó una muestra de sangre para determinar los valores de insulina y glucosa de ayuno, y para la genotipificación del polimorfismo -607 C/A del gen de IL-18. Se obtuvieron medidas de tendencia central y se compararon las variables insulina y glucosa de ayuno por grupo de estudio, además se utilizaron para el cálculo de HOMA2-IR. Mientras que los genotipos del polimorfismo estudiado se agruparon por grupos de herencia, dominante (CA+AA vs CC) y recesivo (CC+CA vs AA), tomando como alelo más común el C y el de riesgo el A.

Resultados: De un total de 88 sujetos participantes, 48 se agruparon sin RI y 40 con RI. No hubo diferencia en la edad entre grupos ($p=0.084$), mientras que las variables sexo y CC en hombres tuvieron diferencia significativa entre los grupos ($p<0.001$). Se encontró un mayor número de hombres que de mujeres en el grupo con RI ($p<0.001$). Se observó que el aumento en 1 unidad de la obesidad central (1 cm de cintura) aumenta significativamente la posibilidad de presentar RI (OR= 0.288, $p<0.014$) y ajustada esta asociación para el modelo recesivo (CA + CC) del SNP -607 del gen de IL-18, la posibilidad de presentar RI aumenta a 3.489 ($p<0.015$).

Conclusión: El polimorfismo -607 C/A del gen de IL-18 influye significativamente en la relación que existe entre la obesidad central y la RI.

DC Blanca Guadalupe Baez Duarte

DC Irma del Carmen Zamora Ginez

DC Francisco Mendoza Carrera

DC Maura Cárdenas García

MC Margarita Muñoz Guarneros

DC Roberto Berra Romani

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero durante el curso de la Maestría y para la realización de este protocolo de investigación.

A mis directoras de tesis, la D.C. Blanca G. Baez Duarte y la D.C. Irma Zamora Ginez, haber trabajado en su línea de investigación me gusto y aportó mucho a mi formación profesional, estoy satisfecha y agradecida por los conocimientos adquiridos durante este tiempo.

A los integrantes del comité tutorial; D.C. Maura García Cárdenas, por su comprensión, ayuda y colaboración para el almacenamiento y procesamientos de muestras, M.C. Margarita Muñoz Guarneros y D.C. Roberto Berra Romani, por los comentarios para mejorar este protocolo de investigación y contribuir a mi crecimiento académico.

Una mención especial para mis amigos Aleph y Gonzalo, compañeros de generación e integrantes del laboratorio de Fisiología celular, que siempre estuvieron con la mejor disposición para resolver dudas y ayudarme en la logística de almacenamiento de muestras. Así mismo, para las alumnas de doctorado del laboratorio de Medicina Molecular del Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO) de Guadalajara, Jalisco; Elizabeth, Erika, Mariana y Marian por su apoyo durante mi estancia, sus consejos y los aprendizajes. Y a mi codirector externo, D.C. Francisco Mendoza Carrera por su paciencia al enseñarme los procesos técnicos en el laboratorio y al realizar las revisiones y comentarios para la mejora de la tesis y por su contribución a mi crecimiento académico.

Finalmente quiero agradecer a mi pequeña familia, en especial a mi hermana, por estar al pendiente de mí y apoyar mis decisiones, además de ser un impulso para lograr mis objetivos y metas profesionales. Y a Marco, por estar en los buenos y malos momentos apoyándome incondicionalmente, en todas y cada una de las situaciones que se presentaron durante esta etapa y por siempre brindarme su comprensión.

DEDICATORIA

A mi padre, porque quizá nadie lo pudo percibir en su momento, pero sembró la semilla de la curiosidad y el conocimiento con sus dinámicas cuando mis hermanos y yo éramos pequeños. Y porque en uno de los momentos más difíciles de mi formación profesional me aconsejó no rendirme, por más difícil que se tornara el camino, y es verdad, a veces las cosas se ponen difíciles, pero nunca imposibles. ¡Gracias por todo papá!

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	- 1 -
1.1 ANTECEDENTES GENERALES	- 1 -
1.1.1 Insulina	- 1 -
1.1.2 Vía de señalización de la insulina.....	- 1 -
1.2 Resistencia a la insulina	- 4 -
1.3 Evaluación de la resistencia a la insulina.....	- 5 -
1.4 Epidemiología	- 6 -
1.5 Fisiopatología de la Resistencia a la Insulina	- 7 -
1.6 Inflamación y resistencia a la insulina.....	- 8 -
1.7 Interleucina 18 (IL-18).....	- 10 -
1.7.1 Citocinas	- 10 -
1.8 Resistencia a la insulina e IL-18	- 11 -
1.9 Polimorfismo de IL-18	- 12 -
1.9.1 Polimorfismo	- 12 -
1.9.2 Equilibrio Hardy-Weinberg	- 13 -
1.9.3 IL-18 y sus polimorfismos	- 15 -
1.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	- 16 -
1.2.1 Polimorfismo -607 C/A de IL-18 y resistencia a la insulina	- 16 -
Capítulo 2. MARCO METODOLÓGICO	- 18 -
3. Planteamiento del problema	- 18 -
4. Hipótesis	- 19 -
5. Justificación	- 19 -
6. Objetivos	- 19 -
6.1 Objetivo general.....	- 19 -
6.2 Objetivos específicos	- 20 -
7. Metodología	- 20 -
7.1 Descripción del estudio.....	- 20 -
7.2.1 Criterios de inclusión.....	- 21 -
7.2.2 Criterios de exclusión.....	- 21 -
7.2.3 Criterios de eliminación.....	- 21 -
7.3 Variables de estudio	- 22 -

7.4 Diagrama de Flujo.....	- 22 -
Etapa 1: Información y firma del consentimiento informado	- 23 -
<i>Etapa 2: Caracterización clínica, antropométrica y bioquímica.....</i>	<i>- 23 -</i>
Etapa 3: Genotipificación para el polimorfismo -607C/A del gen de IL-18 -	24
-	
<i>Etapa 4: Análisis de resultados.....</i>	<i>- 26 -</i>
8. Resultados	- 27 -
9. Discusión.....	- 33 -
10. Conclusiones	- 36 -
Capítulo 3.	- 37 -
11. Limitaciones y debilidades	- 37 -
12. Fortalezas y oportunidades	- 37 -
13. Perspectivas.....	- 38 -
14. Referencias Bibliográficas.....	- 39 -

ANEXOS

Anexo 1. Constancia de registro ante comité de ética e investigación	55
Anexo 2. Consentimiento informado.....	56
Anexo 3. Aspectos éticos.....	58
Anexo 4. Variables de estudio	59
Anexo 5. Historia clínica.....	61
Anexo 5.1. cuestionario clasificación consumidores de cigarrillo	62
Anexo 5.2. AUDIT	57
Anexo 6. Medición de circunferencia cintura.....	64
Anexo 7. Determinación de glucosa de ayuno.....	65
Anexo 8. Determinación de insulina de ayuno.....	66
Anexo 9. Determinación de Hemoglobina glucosilada.....	67
Anexo 10. Determinación de Índice HOMA2-IR.....	68
Anexo 11. Extracción y purificación de ADN.....	69
Anexo 11.1 Cuantificación y determinación de la pureza del ADN.....	69
Anexo 11.2 Amplificación de regiones génicas específicas mediante PCR.....	72

Anexo 11.3 Preparación de gel de poliacrilamida y electroforesis de los productos de PCR.....	73
Anexo 11.4 Tinción de gel de poliacrilamida con nitrato de plata.....	75
Anexo 11.5 Secuencia de la región promotora del gen de IL-18.....	76

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.	Clasificación de las citocinas	23
Cuadro 2.	Criterios de exclusión y eliminación de los sujetos reclutados.....	40
Cuadro 3.	Características generales de la población de estudio.....	41
Cuadro 4.	Características demográficas, bioquímicas y antropométricas por grupo de estudio.....	42
Cuadro 5.	Frecuencias genotípicas del SNP -607 C/A del gen de IL-18 en población general y muestra de estudio.....	42
Cuadro 6.	Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP -607 C/A del gen de IL-18 en los grupos de estudio.....	43
Cuadro 7.	Frecuencias genotípicas en modelos dominante y recesivo.....	44
Cuadro 8.	Análisis de asociación del SNP -607 C/A del gen de IL-18 con resistencia a la insulina.....	44
Cuadro 9.	Asociación entre alteraciones metabólicas y resistencia a la insulina ajustado para los modelos dominante y recesivo.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura del receptor de insulina.....	15
Figura 2.	Vía de señalización de la insulina.....	16
Figura 3.	Representación gráfica de la conformación del inflamosoma.....	22
Figura 4.	Activación del inflamosoma y generación de resistencia a la insulina en la obesidad.....	22
Figura 5.	Efecto funcional de los rSNP.....	26
Figura 6.	Fragmentos esperados en la secuencia de ADN de la región promotora del gen de IL-18.....	38
Figura 7.	Gel de poliacrilamida teñido.....	38

ABREVIATURAS

A	Adenina
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Akt	Proteína quinasa B
ARN	Ácido Ribonucleico
BUAP	Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
c-HDL	Lipoproteína de Alta Densidad
CIBO	Centro de Investigación Biomédica de Occidente
C	Citocina
c-LDL	Lipoproteína de Baja Densidad
DM 2	Diabetes Mellitus Tipo 2
GLUT4	Transportador de Glucosa Tipo 4
HbA1c	Hemoglobina glucosilada
HOMA-IR	Modelo Homeostático de Evaluación de Resistencia a la Insulina
HOMA2-IR	Calculadora de Modelo Homeostático de Evaluación de Resistencia a la Insulina
HTA	Hipertensión Arterial
HUP	Hospital Universitario de Puebla
IKK	Inhibidor Kappa-beta Cinasa
IMC	Índice de Masa Corporal
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IRS1	Sustrato del Receptor de Insulina Tipo 1
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PTOG	Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa
RI	Resistencia a la Insulina
SM	Síndrome Metabólico
SNP	Polimorfismo de un Solo Nucleótido
TLR	Receptor Tipo Toll
TNF	Factor de Necrosis Tumoral

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1 ANTECEDENTES GENERALES

1.1.1 Insulina

La insulina es una hormona peptídica de 5.8 kDa, considerada un heterodímero de 51 aminoácidos, que dentro de su conformación tiene dos cadenas, una α y una β de 21 y 30 residuos, respectivamente, unidas entre sí por dos enlaces disulfuro derivados de residuos de cisteína; tiene función anabólica y es secretada, por estimulación de los niveles de glucosa (el más representativo), por el páncreas a nivel de los islotes de Langerhans por medio de las células β (1). La función principal de esta hormona es regular los niveles de glucosa en sangre, aunque también se conoce que participa en la homeostasis de lípidos y proteínas, inhibe la producción hepática de glucosa y permite la captación de glucosa en el músculo esquelético y el tejido adiposo (2).

Otras de las funciones de la insulina se llevan a cabo a nivel cardiovascular regulando la contractibilidad cardíaca y el tono vascular; mientras que, en el sistema nervioso central, tiene acción neuromoduladora, produciendo efectos en el desarrollo neuronal, regulación en el metabolismo de la glucosa, del peso corporal y la conducta alimentaria, además, de contribuir a la atención, aprendizaje y memoria (3).

1.1.2 Vía de señalización de la insulina

La acción de la insulina requiere de su unión a un receptor de membrana, el cual es una glucoproteína hetero-tetramérica de 350 000 kDa, formada por dos subunidades α extra membranales de 735 aminoácidos que contienen sitios de unión a insulina, y dos subunidades β de 620 aminoácidos, cada una con una

porción extracelular, una transmembranal y otra intracelular para la actividad de cinasa de tirosina; en ambas subunidades hay sitios potenciales de glucosilación, de los cuales 13 pertenecen a la subunidad α y 4 adicionales en la porción extracelular de la subunidad β (Figura 1) (4,5).

Una vez llevada a cabo la unión a su receptor, las subunidades α , sufren un cambio conformacional para activar a las subunidades β , llevando a cabo su fosforilación, gracias a la fosfotransferasa de dicha subunidad, con lo que se produce la activación de los dominios catalíticos de las tirosinas cinasas; que a su vez producen la fosforilación del sustrato receptor de insulina (IRS), lo que puede activar dos vías de señalización; la primera de ellas es la vía Ras-MAPK (quinasas activadas por mitógenos), que tiene como función regular la expresión de genes y diferenciación celular, y la segunda, es la vía de la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K), que al producir la fosforilación de la cinasa Akt/PKB, se encarga de la acción metabólica de la insulina (Figura 2) (2,6).

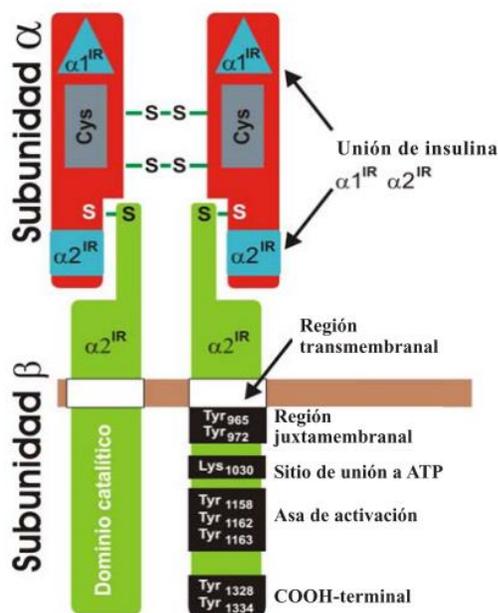


Figura 1. Estructura del receptor de insulina. El receptor de insulina tiene dos subunidades α extracelulares con regiones de unión a insulina y dos subunidades β unidas por puentes disulfuro, con tres dominios; extracelular, transmembranal e intracelular. El dominio intracelular tiene un sitio

catalítico de cinasa de tirosina y sitios de fosforilación en tirosina. Figura tomada de Olivares y Placarte (1)

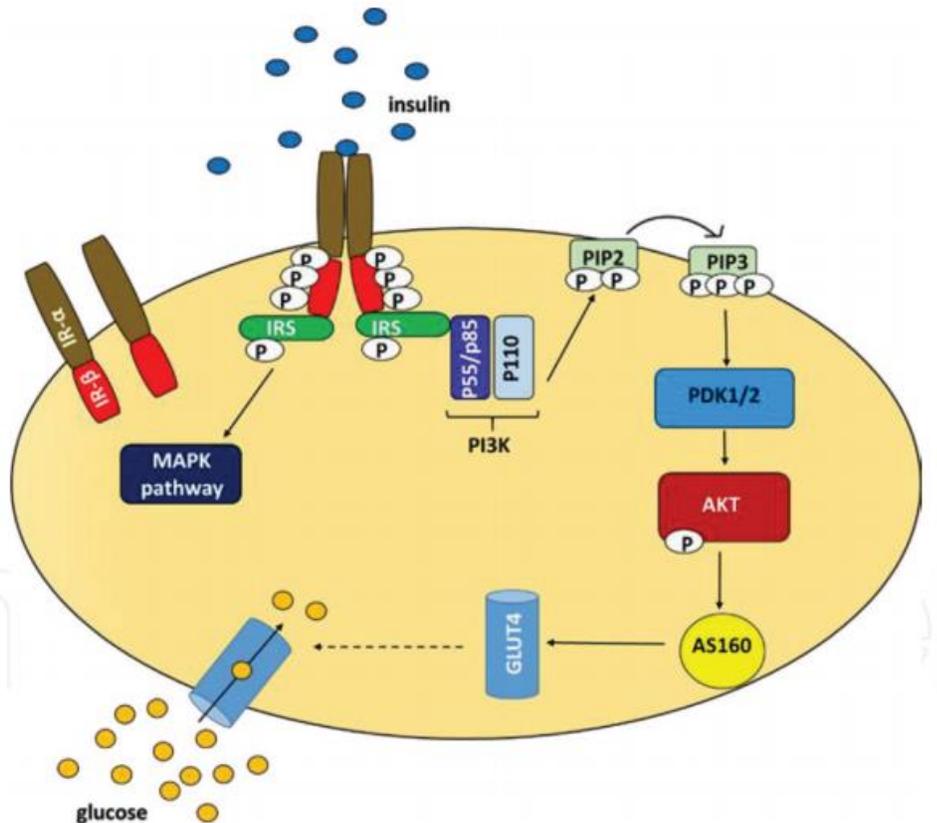


Figura 2. “Vía de señalización de insulina. La insulina se adhiere a los receptores de insulina y desencadena su dimerización y la autofosforilación intracelular de sus residuos de tirosina, estas moléculas también se someten a fosforilación y forman un complejo con PI3K utilizando dominios SH2 fosforilados de PI3K fosfatidilinositol bifosfato (PIP2), que da como resultado la formación de fosfatidilinositol trifosfato (PIP3) y la activación de PDK1 / 2. AKT se fosforila y se activa por PDK1 / 2, que posteriormente provoca la fosforilación de AS160. Este último es responsable de la translocación de GLUT4 a entrada de membrana celular y glucosa”. Tomado de Swiderska y cols. (6)

1.2 Resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina (RI) es un estado patológico en el que los órganos insulino dependientes, como el músculo esquelético y tejido adiposo no responden adecuadamente a la insulina, lo que puede causar hiperglucemia y aumento en la secreción de insulina por las células β pancreáticas, a manera de compensación; dicha resistencia se caracteriza por la disminución del transporte de glucosa a adipocitos y músculo esquelético, aumento de producción de glucosa en hígado y alteraciones en el metabolismo de lípidos en el tejido adiposo y hepático (7).

Estudios han demostrado que en la RI, se presentan procesos de hiperglucemia e hiperinsulinemia (8,9), mientras que uno de los factores predisponentes más importantes para el desarrollo de la RI, es la obesidad central que se puede determinar mediante la circunferencia cintura (CC) (10–12).

La obesidad, principalmente de tipo abdominal que precede a la RI, puede determinarse mediante indicadores antropométricos validados (13). De acuerdo con Roriz y cols. (14) después de evaluar doce artículos en los que se estudió la relación de diferentes indicadores antropométricos clínicos y la grasa visceral determinada por medio de tomografía computarizada en población brasileña, la CC fue un buen indicador antropométrico de la adiposidad visceral con un coeficiente de correlación significativo de $r=0.73$ y $r=0.77$ para hombres y mujeres ($p<0.05$), respectivamente, con iguales resultados para japoneses $r=0.66$ ($p<0.05$), y para coreanos $r=0.705$ y $r=0.636$ para hombres y mujeres, respectivamente, con $p<0.05$.

En México, la guía de práctica clínica para el diagnóstico y tratamiento del sobrepeso y obesidad exógena, establece que los valores de CC mayores de 80 cm en mujeres y a 90 cm en hombres se asocian a enfermedades como síndrome metabólico y DT2 y establece dichos valores como punto de corte dentro de la evaluación diagnóstica (15).

1.3 Evaluación de la resistencia a la insulina

Existen diversos métodos para evaluar la RI, su uso es dependiente de su complejidad técnica o grado de invasión en el paciente, por lo que algunos no son aptos para la aplicación en toda la población (16). Uno de esos métodos es el Clamp Hiperinsulinémico-Euglucémico, desarrollado por DeFronzo y cols., en 1979 (17), siendo considerado el estándar de oro para la determinación de resistencia a la insulina, su objetivo es suprimir la producción hepática de glucosa y con ello mantener la glucemia en sangre, mediante la infusión endovenosa de dosis mayores a 80 mU/m² por minuto de glucosa.

Actualmente, debido a lo simple y sensible, el método más utilizado, es la evaluación del modelo de homeostasis de resistencia a la insulina (HOMA-IR, por sus siglas en inglés), que fue desarrollado en 1985 por Matthews y cols.(18), este método calcula la homeostasis basal del paciente a partir de las concentraciones de glucosa e insulina en ayuno y ha sido considerado un buen indicador en referencia al estándar de oro antes mencionado, incluso tomando en cuenta diferentes edades. La fórmula para su cálculo es la siguiente: $HOMA-IR = \text{glicemia de ayuno (mg/dL)} \times \text{insulinemia de ayuno (uU/mL)} / 22.5$.

Cabe destacar que en el año 2000, Bonora y cols.(19), validaron el índice HOMA-IR con el clamp Hiperinsulinémico-euglucémico para la determinación de RI en una muestra de 53 sujetos con Diabetes mellitus tipo 2 (DT2) y 62 sujetos sanos con edad de 41.3 ± 1.4 y 55.6 ± 1 años respectivamente; atendidos en la Universidad de Verona, Italia; con un coeficiente de correlación de $r = 0.820$ y $p < 0.0001$.

En el año 2002, Jonathan Levy y cols., de la Universidad de Oxford, Inglaterra, desarrollaron la actualización del índice HOMA-IR y elaboraron una calculadora (HOMA2-IR) que permite determinar además de la insulinoresistencia, tomando en cuenta la relación de la resistencia a la glucosa periférica y hepática así como la pérdida de glucosa renal, ajustándose de mejor manera al estado fisiológico (20).

Debido a la variabilidad fenotípica entre poblaciones es necesario que el punto de corte para dicho índice sea determinado para cada una de ellas. Algunos estudios que han utilizado el índice HOMA2-IR, son el desarrollado en el año 2017 por Rodríguez y cols., (21), en población mexicana, donde toman como punto de corte 1.4, por lo que valores mayores determinaron RI; sin embargo, no se establece el criterio bajo el cual se tomó como referencia el punto de corte, y por lo tanto tampoco se encontró la metodología que se utilizó para su determinación. Por otra parte, en un estudio realizado a 258 sujetos de la ciudad de Puebla, para evaluar la RI se utilizó HOMA2-IR con un punto de corte ≥ 2 , definido a partir de los valores menores a la media +1 desviación estándar, de los valores encontrados en la muestra, ya que de ese modo se cubría aproximadamente el 85.5% de la muestra (22).

1.4 Epidemiología

En la actualidad, no existen registros epidemiológicos a nivel global referentes a la RI; sin embargo, al realizar la determinación de RI por medio del índice HOMA2-IR con los datos recabados por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2016, se encontró que a nivel nacional existe una prevalencia del 24.1 %, mientras que en el estado de Puebla la prevalencia aumenta a 27.9 % en un rango de edad de 20 a 65 años; así mismo, al clasificar a la muestra por grupo de edad, en el rango de 20 a 44 años, la prevalencia de RI es de 23.4 % a nivel nacional y del 25.8 % en Puebla y para las edades comprendidas entre 45 y 65 años, una prevalencia de 25.1 % y 30.3 % a nivel nacional y en Puebla, respectivamente.

Por otro lado, existen diferentes estudios en los cuales se ha reportado la prevalencia de RI tanto en poblaciones infantiles y juveniles como en adultos (21,23,24).

En el año 2017 Rodríguez y cols. (21), en una muestra de 60 mujeres universitarias con edad comprendida entre 18 y 21 años de San Luis Potosí, México,

reportaron que el 26 % de esta población presentó RI, determinada mediante el índice HOMA2-IR y utilizando un punto de corte >1.4 .

Mientras que en el año 2014 Porchia y cols. (23), en una muestra de 569 sujetos del centro de México con edades entre 18 y 84 años, reportaron que el 23 % de la muestra total, presentaban RI, determinada por HOMA2-IR, cuyo punto de corte utilizado fue ≥ 1.8 .

Por su parte, Ortega-Cortés y cols., en el año 2014 (24), reportaron que de 103 pacientes con edades de 10 a 15 años, en un hospital pediátrico de México, el 60.4 % presentó RI y el 64.5 % hiperinsulinemia, evaluados mediante insulina en ayuno y el índice HOMA-IR, respectivamente.

1.5 Fisiopatología de la Resistencia a la Insulina

La RI desde el punto de vista molecular es generada por la deficiente señalización de la insulina, causada por: 1) Disminución del número de receptores de insulina y su actividad catalítica, 2) Aumento de la fosforilación de los residuos de serina/treonina del receptor de insulina y del sustrato de receptor de insulina, 3) aumento de actividad de fosfatasa de residuos de tirosina, especialmente de la proteína fosfatasa de tirosina 1-B que, a su vez, produce actividad disminuida de cinasas como, PI3K y AkT y defectos de la expresión y función del transportador de glucosa 4 (GLUT-4) (3).

Una de las condicionantes para que se genere RI, es la obesidad que es consecuencia de la acumulación de lípidos en el tejido adiposo, y que propicia la expansión de dicho tejido, con la consecuente alteración en la secreción de mediadores de la inflamación, aumento de infiltración de macrófagos y el cambio de macrófagos tipo 2 (antiinflamatorios) a tipo 1 (secretor proinflamatorio). Entre los principales mediadores inflamatorios, se encuentran el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la interleucina (IL) 6 (IL-6), la IL-18 y la IL-1 β , la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) y la Angiotensina II, las cuales generan un proceso inflamatorio local y sistémico (2,3).

1.6 Inflamación y resistencia a la insulina

En la obesidad los mediadores inflamatorios son secretados al activarse los macrófagos de tipo 1 que a su vez, contienen complejos proteicos ubicados en su citoplasma, denominados inflamosomas, y cuya principal función es detectar daño e iniciar el proceso inflamatorio, y que dentro de su estructura pueden contener; receptores tipo NOD (NLR), activados en presencia de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), receptores tipo Toll (TLR), RIG-I (por sus siglas en inglés de “*retinoic acid-inducible gene-1-like receptor*”) y CLR_s (por sus siglas en inglés de “*Calcitonin receptor like receptor 1*”) (25).

En la RI, el inflamosoma que se activa es el relacionado con los receptores NLR, cuya subfamilia es la 3 (NLRP3) y los Toll tipo 4 (TLR-4); con respecto al NLRP3, éste se encuentra conformado estructuralmente por la proteína adaptadora ASC (por sus siglas en inglés de “*apoptosis-associated speck-like protein*”) y una procaspasa-1, la cual se compone de 2 proteínas activas de la caspasa-1; p10 y p20, por lo que, cuando el NLRP3, se activa y oligomeriza, se produce la activación de caspasa-1 y la consecuente secreción de IL-1 β e IL-18 que son proteínas activas del proceso inflamatorio (figuras 3 y 4) (26).

Mientras que el TLR-4, que se encuentra abundantemente en el músculo y tejido adiposo, contribuye al proceso inflamatorio cuando activa al factor nuclear kappa B (NF- κ B), y promueve la síntesis y secreción de citocinas IL-6, TNF- α IL-1 β e IL-18; mientras que el mecanismo mediante el cual TLR-4 promueve la RI, es por fosforilación e inactivación de Akt y la activación de los reguladores negativos de la señalización de la insulina, al inducir la expresión de la proteína supresora de señalización de citocinas 3 (SOCS-3) y la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP-1B) que subsecuentemente inhiben la señal de la insulina (3,27).

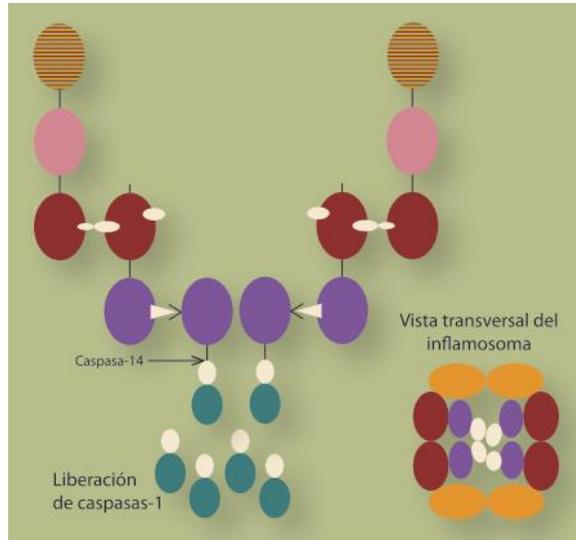


Figura 3. Representación gráfica de la conformación del inflamosoma en vista transversal y oligomerizado. NLRP3 contiene dentro su estructura caspasa-1 que, al activarse, genera la secreción de IL-1 β e IL-18 en obesidad y RI. Figura tomada de Montañó y cols. (18)

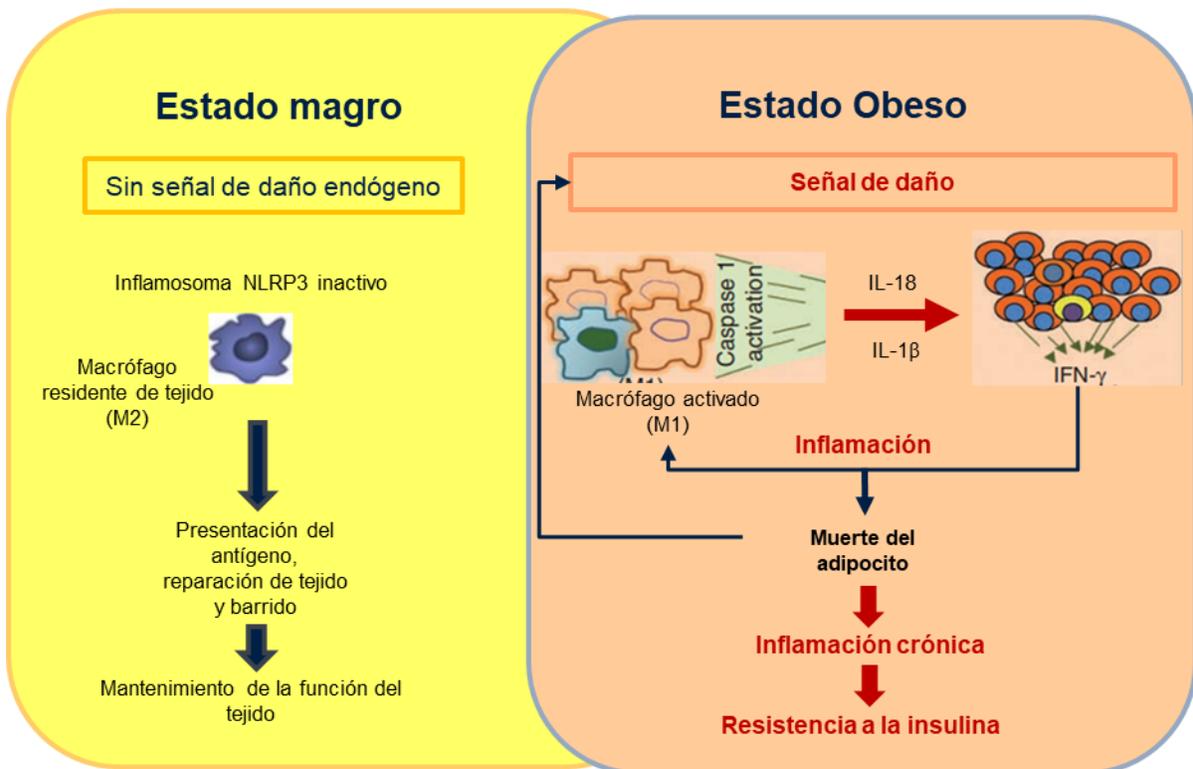


Figura 4. Activación del inflamosoma y generación de resistencia a la insulina en la obesidad. Figura traducida y modificada de Vandanmagsar, B. y cols. (10)

1.7 Interleucina 18 (IL-18)

1.7.1 Citocinas

Las citocinas son glucoproteínas extracelulares de bajo peso molecular, sintetizadas por diferentes células del sistema inmune, principalmente por linfocitos T, neutrófilos y macrófagos e intervienen en la respuesta inmune como diferenciadoras, proliferadoras y activadores de células y otras citocinas que actúan en condiciones normales y patológicas (28). Dentro de sus características se encuentran la vida media limitada, actividad paracrina y autocrina, pleiotropismo, redundancia, sinergia y antagonismo (29). Según la familia a la que pertenecen o a la función que realizan, las citocinas se clasifican en familias, quimiocinas, estimuladoras de hematopoyesis (factores de crecimiento) e interferones. (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación de las citocinas

Clasificación	Miembro	Función
Familia 1	IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β y IL-36 γ	Actividad agonista
	IL-1R α , IL-36 R α e IL-38	Receptores de actividad antagonista
	IL-37	Antiinflamatoria
Familia 2 (de la cadena y común)	IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21	Factores de crecimiento y proliferación para células progenitoras y maduras
Quimiocinas	IL-8 (CXCL8)	Reclutamiento de neutrófilos y mantenimiento de respuesta inflamatoria
	MCP-1 (CCL2) y CCL11 (eotaxina)	Reclutamiento de leucocitos, especialmente de monocitos y eosinófilos.
Estimuladoras de hematopoyesis	LCR	Crecimiento de progenitores de monocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y macrófagos.
	GM-CSF	Proinflamatorias
	M-CSF	
Interferones	IFN α y β	Inmunidad natural, evitan replicación viral
	IFN γ	Activa respuesta de LTH1, es antiviral y antiproliferativa, activadora de fagocitos y diferenciación de LTyB, estimulador de IgG2 e IgG3.

MCP-1: Proteína 1 quimioatrayente de monocitos, LCR: factor estimulante de colonias, GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos), M-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos, TH1: Linfocitos colaboradores, IgG: Inmumoglobulina G Adaptado de Vega y Ferreira. (29)

La IL-18 es una citocina pleiotrópica de 24 kDa, es considerada proinflamatoria, y miembro de la familia 1, se encuentra presente en la respuesta inmunitaria innata y adquirida. Actualmente, se sabe que es inductora de interferón gama y es producida en muchas células, entre ellas macrófagos, células endoteliales, de músculo liso, dendríticas, de Kupffer y en adipocitos. Así mismo, su activación depende de la caspasa-1, y trabaja en sinergia con la IL-12, induciendo una respuesta mediante linfocitos T colaboradores (Th1) (30).

1.8 Resistencia a la insulina e IL-18

Algunos estudios apoyan la hipótesis de que IL-18 se puede considerar como un marcador específico de RI y DT2 (31–33).

Un estudio realizado en el año 2015 (31), en una población de 218 hombres brasileños aparentemente sanos con promedio de edad de 50 ± 5 años, se les determinó circunferencia cintura, glucosa e insulina de ayuno, IL-18 sérica y perfil de lípidos, concluyeron que al subdividir los niveles de IL-18 por terciles, el tercil 3 (407.7 pg/mL) se presentó en los sujetos con los niveles más altos de HOMA-IR $p < 0.001$ (1.5).

Aparentemente, sólo se han recabado dos estudios que relacionan de manera directa los niveles de IL-18 y DT2. El primero de ellos es de Zilverschoon y cols. (32), en el año 2008, quienes con una muestra de 42 sujetos provenientes de los Países bajos, divididos en tres grupos; sin diabetes magros ($n=17$, 9 hombres y 8 mujeres), grupo de sujetos con obesidad sin diabetes ($n=11$, 6 hombres y 5 mujeres) y grupo con DT2 pareados por edad y peso ($n=14$, 8 hombres y 6 mujeres), determinaron que los sujetos obesos y con DT2, presentan altos niveles de IL-18 circulante (360.6 ± 36.5 pg/mL⁻¹, 438.3 ± 49.5 pg/mL⁻¹, respectivamente, $p < 0.05$); que los niveles séricos de IL-18 correlacionaron con la circunferencia de cintura ($r: 0.45$, $p < 0.05$) y que la expresión de receptores de IL-18, fue aproximadamente 50% menor en obesos y diabéticos en comparación con individuos delgados.

A su vez, Hivert y cols., en el año 2009 (33), realizaron un estudio en una cohorte de casos (DT2) y controles (sanas) de enfermeras estadounidenses con edades comprendidas entre los 30-55 años; en total la muestra fue de 1,012 participantes como casos y 1,081 en el grupo control, mismas que fueron seguidas del año 1976 a 2002. En dicho estudio, obtuvieron como resultado que los niveles de IL-18 en el quintil más alto se asociaron con un RR de 1.75 para el desarrollo de DT2 a largo plazo ($p < 0.0001$); además, cuando se realizó el ajuste por el IMC la tendencia siguió siendo significativa con un RR de 1.44, ($p < 0.0001$); por lo que, concluyeron que dicha asociación es independiente de los factores de riesgo habituales, entre ellos el IMC.

1.9 Polimorfismo de IL-18

1.9.1 Polimorfismo

Un polimorfismo se define como *“la existencia simultánea en una población de genomas con distintos alelos para un locus determinado”* (Torrades, 2002, p.122); el término “genético” hace referencia a las variaciones genéticas en la población y a su vez es responsable de la variabilidad entre individuos de la misma especie; los polimorfismo pueden ser cromosómicos o de secuencia del ADN, dentro de este último grupo se encuentran los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) que consisten en la variación en un solo par de bases y representan los cambios genéticos más distribuidos en el genoma humano (34).

La mayoría de los SNP's tienen dos alelos, los cuales se denominan, principal o mayor y raro o menor; este último debe tener una frecuencia superior a 1% en la población para que sea considerado como polimorfismo (35). La idea de que los polimorfismos genéticos tienen nulo o poco impacto en la salud se ha abandonado y, actualmente, se acepta que los polimorfismos pueden estar asociados con la susceptibilidad a padecer enfermedades como: DT2, síndrome metabólico, obesidad, asma, lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide. (35,36). En este sentido, hay algunas propuestas de nombrar a algunos SNPs en

función de su efecto, como en el caso de los SNP reguladores (rSNP), los cuales pueden localizarse en los sitios promotores de los genes que sintetizan proteínas y afectar la tasa de transcripción y producción de la proteína que codifican (Figura 5) (29)

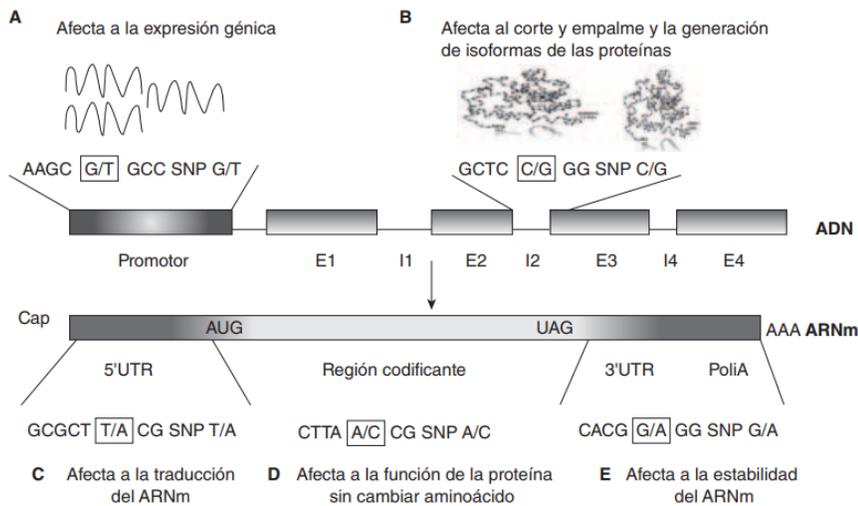


Figura 5. Efecto funcional de los rSNP. Figura tomada de Ramírez- Bello y cols., (29)

A. Los rSNP ubicados en el ADN pueden afectar a los niveles de expresión si están en el promotor B. Los SNP en la estructura de los ARNm pueden afectar al corte y empalme especialmente si se ubican en intrones- exones C. Afectar la traducción del ARNm a proteínas. D. En la región 5'UTR, (regiones codificantes sin cambiar aminoácidos) tienen papel importante en la función de la proteína. E. En la región 3'UTR pueden afectar a la estructura y estabilidad del ARNm.

1.9.2 Equilibrio Hardy-Weinberg

En genética, los cambios evolutivos en la población pueden describirse en función de los alelos y frecuencias genotípicas. Para ello se cuenta con postulados como el equilibrio de Hardy-Weinberg (38), el cual describe que, bajo ciertas condiciones, (una población de gran tamaño, cuyos individuos en su totalidad son viables y fecundos, y que además se aparean al azar), las frecuencias alélicas de un locus determinado se mantienen constantes de una generación a la siguiente;

también postula que la relación entre frecuencias alélicas y genotípicas puede describirse bajo términos matemáticos; por ejemplo, para un sistema de dos alelos, la suma de sus frecuencias es igual a la unidad y se puede representar con la siguiente fórmula (38):

$$p + q = 1$$

Donde p representa la frecuencia del alelo A_1 y q la frecuencia del alelo A_2 . Además, si no existen más alelos que los dos antes mencionados, las frecuencias genotípicas de equilibrio se determinan con la siguiente ecuación:

$$p^2 + 2pq + q^2$$

Donde p^2 representa los homocigotos A_1 (A_1A_1), $2pq$ representa a los heterocigotos A_1A_2 y q^2 representa a los homocigotos A_2 (A_2A_2).

De tal forma que, con valores cualesquiera de p y q , bajo las condiciones descritas al inicio, se pueden predecir las frecuencias genotípicas de la siguiente generación de una población en particular (38).

Por otra parte, la estimación de las frecuencias genotípicas y alélicas se define como la proporción relativa de genotipos o alelos en determinada población y puede expresarse en porcentajes o unidad (39). Las fórmulas para la determinación de las frecuencias alélicas y genotípicas son las siguientes:

$$f(\text{Alélica})^n = \frac{\text{número de alelos observados}}{\text{número total de alelos}}$$

$$f(\text{genotípicas})^n = \frac{\text{número de genotipos}}{\text{número de muestras}} ; f(\text{genotípicas})^n = f(\text{genotípicas}) \times 100\%$$

1.9.3 IL-18 y sus polimorfismos

El gen de la IL-18 se localiza en la región 11q22.2-22.3 y su región promotora contiene múltiples sitios de inicio de la transcripción, y se han identificado tres SNP's en el promotor de dicho gen, en las posiciones -137 G/C (rs187238), -607 C/A (rs1946518) y -656 G/T (rs1946519), y se ha propuesto que los dos primeros pueden influir en la expresión y producción de IL-18 mediante la modificación de la eficiencia de la transcripción (40). En el caso de -137 G/C, se altera el sitio de unión del factor nuclear H4TF-1, considerado como un sitio de unión a factores nucleares de genes específicos de la histona H4; mientras que el cambio de citocina por adenina en la posición -607 interrumpe un sitio de unión a la proteína de unión al elemento sensible al AMPc (CREB) (41).

1.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

1.2.1 Polimorfismo -607 C/A de IL-18 y resistencia a la insulina

Seyda y cols., (42) realizaron un estudio observacional, con el objetivo de analizar la utilidad del SNP de IL-18 como marcador genético en el síndrome metabólico. En este se incluyeron 180 individuos de Pakistán, divididos en tres grupos, cada uno de 60 sujetos: un grupo con normopeso, otro con sobrepeso y el tercero con obesidad; se determinaron varios parámetros metabólicos, entre ellos RI por medio de HOMA-IR y se analizó el genotipo para el SNP de IL-18 -607 C/A, dentro de sus resultados se reportaron que el número de sujetos con genotipo AA fue más alto en los sujetos con sobrepeso y obesidad en comparación con los de normopeso (24, 24 y 10 sujetos, respectivamente; $p < 0.001$); además los sujetos con genotipo AA tuvieron niveles más altos de grasa corporal en comparación con los de genotipo CC ($29.31\% \pm 9.46\%$ vs $24.70\% \pm 10.30\%$, $p < 0.001$) y RI determinado por HOMA-IR (9.47 ± 3 vs 7.75 ± 4.34 , $p = 0.007$) y que los niveles de IL-18 tuvieron correlación con RI, $r = 0.699$, y cuando se realizó el ajuste por edad, IMC y porcentaje de grasa corporal, se reportó que la correlación disminuyó pero se mantuvo significativa (HOMA-IR $r = 0.344$, $p < 0.001$).

Por otra parte, en el año 2015, Martínez-Hervas y cols., (43) realizaron un estudio en donde determinaron el SNP rs7559479 del gen receptor de la IL-18 como modulador de los niveles plasmáticos de IL-18 durante la insulinemia; para ello estudiaron una muestra de 746 sujetos del área metropolitana de Valencia, España, a los que se les midieron varios parámetros metabólicos, entre ellos, RI (tomando como punto de corte valores mayores a 14 de insulina en ayuno) y niveles plasmáticos de IL-18. Dentro de sus resultados reportaron que los niveles de la citosina se correlacionaron con los niveles de glucosa e insulina, obteniendo valores de $r =$ a 0.225 y 0.206, respectivamente, que los niveles más altos de IL-18 se presentaron en los sujetos con RI ($p < 0.001$) y finalmente, que el genotipo GG del SNP rs7559479 (asociado al receptor de IL-18) se asoció directamente con los altos

niveles de dicha interleucina (GG con niveles de IL-18 de 493 ± 41 pg/mL vs AA+AG con 428.3 ± 8.5 pg/mL, $p < 0.025$).

Estos estudios encontraron diferencias entre sus grupos de estudio con referencia a los niveles de IL-18 y el SNP -607 C/A o el SNP para el receptor de IL-18 y con algunos parámetros antropométricos y metabólicos, incluidos el peso y la RI.

Capítulo 2. MARCO METODOLÓGICO

3. Planteamiento del problema

Se sabe que la resistencia a la insulina tiene como componente fisiopatológico la expresión de citocinas proinflamatorias. Hasta hace poco las más asociadas a este proceso eran la IL-6, IL-1 β y TNF α ; sin embargo, recientemente en algunos estudios, se ha observado una participación importante de IL-18. Asimismo, se sabe que los polimorfismos en la región promotora de este gen, -607 C/A y -137 G/C influyen en la expresión y producción de dicha citocina.

Se ha visto que el polimorfismo -607 C/A de IL-18 se asocia con algunos componentes del síndrome metabólico, pero no de manera directa con RI. Además, hasta nuestro conocimiento, no existen estudios que hayan analizado la posible asociación de este polimorfismo con parámetros antropométricos y metabólicos en población mexicana.

Es por lo anterior que surge la siguiente pregunta de investigación para nuestro trabajo:

¿El polimorfismo -607 C/A del gen de IL-18 está asociado con resistencia a la insulina?

4. Hipótesis

El genotipo AA del SNP -607 C/A del gen de IL-18 se asocia con RI

5. Justificación

Hasta nuestro conocimiento no existen estudios a nivel internacional que estudien la asociación del polimorfismo -607 C/A de IL-18 con la RI y tampoco se ha descrito en población mexicana.

Determinar si el polimorfismo -607 C/A del gen de IL-18 se relaciona con RI, nos permitiría ampliar el conocimiento del componente genético que influye dentro de la expresión del estado proinflamatorio en la RI en población mexicana y con ello contribuir en la comprensión de la fisiopatología de la enfermedad, así mismo, podrían surgir intervenciones en función de esta citocina o puede valorarse como factor de riesgo.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Determinar la asociación entre el SNP -607 C/A del gen de IL-18 con la presencia de resistencia a la insulina en una muestra de la población del estado de Puebla

6.2 Objetivos específicos

1. Determinar los valores de HOMA en los sujetos de estudio por medio de la calculadora HOMA2-IR
2. Determinar el SNP -607 C/A del gen de IL-18 en los sujetos de estudio.
3. Determinar y comparar las frecuencias alélicas en los grupos de estudio (sujetos con y sin RI)
4. Establecer el equilibrio Hardy-Weinberg en el grupo de estudio y la población general.
5. Analizar el SNP -607 C/A del gen de IL-18 con modelos de herencia (dominante y recesivo) y su relación con RI.
6. Analizar la influencia del SNP -607 C/A del gen de IL-18 con modelos de herencia en la relación de alteraciones metabólicas con la RI.

7. Metodología

7.1 Descripción del estudio

Se realizó un estudio comparativo, observacional, transversal y homodémico, en las instalaciones del Hospital Universitario de Puebla (HUP), por medio de la Clínica “Dale un minuto a tu vida” y en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) a través del Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO) de Guadalajara, Jalisco, en el periodo comprendido entre agosto de 2018 y julio de 2020 con un número de registro del comité de investigación de la Facultad de Medicina, BUAP 692 (Anexo 1).

El universo de estudio fue la población general que acudió a la clínica “Dale un minuto a tu vida” de manera voluntaria, de los cuales, se obtuvo una muestra de estudio conformada por 89 sujetos de 18 a 55 años, que cumplieron con los criterios de inclusión, aceptaron participar y firmaron el consentimiento informado (Anexo 2).

Todos los procedimientos se apegaron a los lineamientos éticos vigentes en la Ley General de Salud y las pautas de la declaración de Helsinki (Anexo 3). El tamaño de la muestra fue a conveniencia y el tipo de muestreo no probabilístico, debido a que solo se eligieron los sujetos que cumplieron con los criterios de selección.

7.2 Criterios de selección de la muestra

7.2.1 Criterios de inclusión

- Ambos sexos
- Edad de 18 a 65 años
- Hijos/as de padres mexicanos
- Sujetos que aceptaron participar en el estudio y firmaron el consentimiento informado

7.2.2 Criterios de exclusión

- Sujetos con diabetes
- Sujetos con diagnóstico de cáncer
- Mujeres embarazadas o lactando
- Sujetos que al momento de la entrevista reportaron diagnóstico de enfermedades inflamatorias autoinmunes, insuficiencia renal, traumatismos en etapa inflamatoria, alcoholismo, tabaquismo, enfermedades cardiovasculares y alteraciones tiroideas.

7.2.3 Criterios de eliminación

- Sujetos que no se presentaron a la toma de estudios de laboratorio.
- Sujetos que fueron diagnosticados con diabetes durante el estudio

7.3 Variables de estudio

Definición de variables y escalas de medición (Anexo 4)

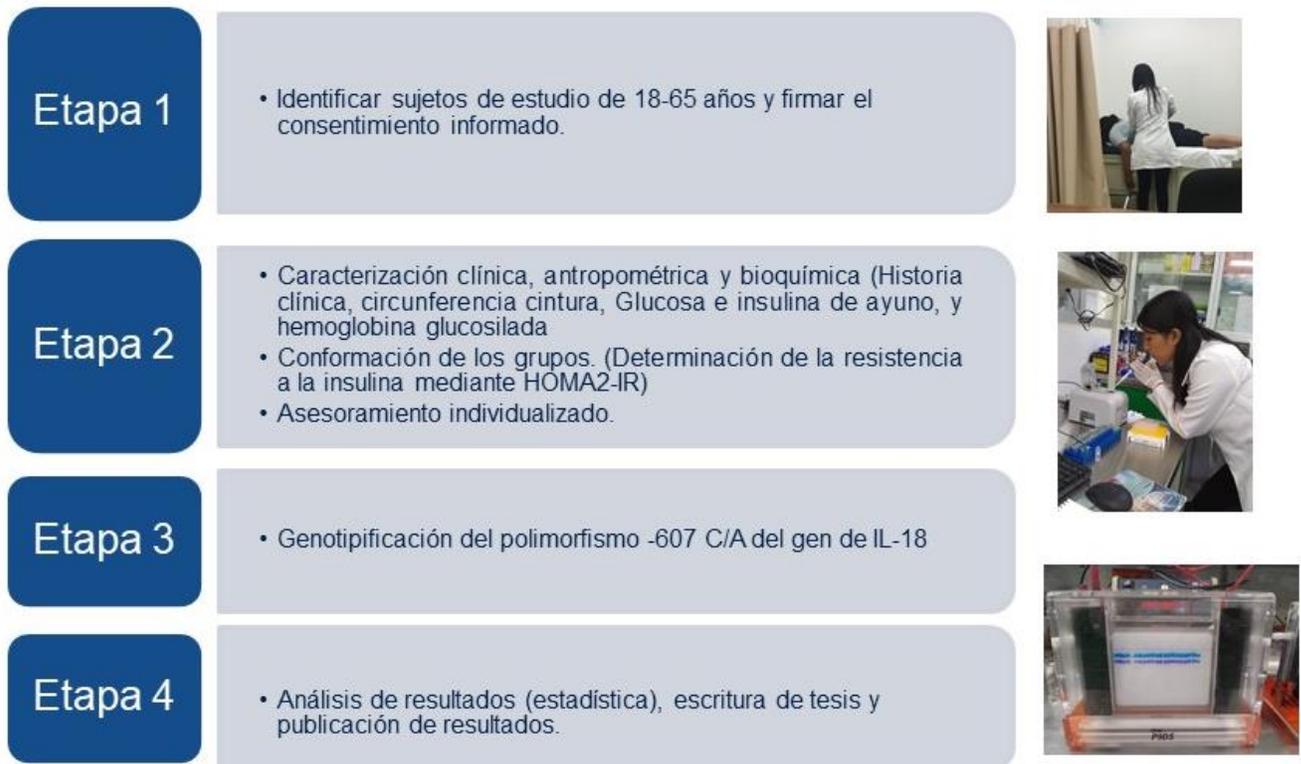
Variable independiente: Genotipo para el polimorfismo de IL-18 -607 C/A

Variable dependiente: Resistencia a la insulina

Variable de ajuste: Circunferencia cintura

Variables demográficas: Sexo, edad

7.4 Diagrama de Flujo



7.5 Técnicas y procedimientos

El estudio se realizó en 4 etapas:

Etapas 1: Información y firma del consentimiento informado

La población para el proyecto de investigación estuvo conformada por sujetos que acudieron a la clínica de asesoramiento para disminuir el riesgo a enfermedades crónico-degenerativas “Dale un minuto a tu vida”, anexa al Hospital Universitario de Puebla (HUP), de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Se les invitó a participar en el proyecto de investigación, se les explicó ampliamente los objetivos y en qué consistiría su participación y los beneficios a los que accedería en caso de aceptar. También, se les proporcionó la Carta de Consentimiento Informado para proyectos de investigación clínica que cumple con los requerimientos de ética en investigación clínica en salud (Anexo 3), misma que leyeron y firmaron (Anexo 2). Finalmente, se les agendó una cita para asistir a la caracterización clínica y antropométrica en el consultorio anexo al HUP.

Etapas 2: Caracterización clínica, antropométrica y bioquímica

Una vez que el participante acudió a su cita de caracterización, se le realizó una historia clínica y la toma de medidas antropométricas (Anexos 5 y 6)

Además, se le realizó una toma de muestra de sangre periférica suficiente, según los procedimientos y las técnicas estandarizadas establecidas por el Laboratorio de Análisis Clínicos del HUP para la caracterización bioquímica. Se determinaron los niveles de glucosa (Anexo 7) e insulina en ayuno (Anexo 8) y hemoglobina glucosilada (Anexo 9).

Los valores de glucosa e insulina se utilizaron para el cálculo del índice HOMA2-IR, y los sujetos con valores ≥ 2 fueron asignados al grupo de RI (Anexo

10). Los sujetos con hemoglobina glucosilada con valores $\geq 6.5\%$ fueron eliminados del estudio, por ser criterio diagnóstico para DT2 y se les refirió con un especialista para su seguimiento.

Además, se tomó una muestra de sangre periférica adicional para el análisis genético, la cual fue almacenada a 4°C.

Como parte del servicio de la clínica, se realizó la entrega e interpretación de los resultados antropométricos y bioquímicos, acompañado de un asesoramiento médico, nutricio, fisioterapéutico y odontológico individualizado.

Etapa 3: Genotipificación para el polimorfismo -607 C/A del gen de IL-18

A partir de la muestra sanguínea que se les tomó a los sujetos para el análisis genético se obtuvo el ADN genómico. El ADN obtenido, se cuantificó por espectrofotometría de luz UV y se hicieron diluciones de trabajo a 25 ng/ μ L. Estas diluciones se utilizaron para la genotipificación. El método que se utilizó fue la reacción en cadena de la polimerasa por confrontación de dos pares de cebadores (tetra-cebador) de acuerdo a las condiciones reportadas por Seyda y cols. (42). Las secuencias de los oligonucleótidos cebadores fueron las siguientes: CCTACAATGTTACAACACTTAAAAT y ATAAGCCCTAAATATATGTATCCTTA, con los que se amplificó un fragmento de 440 pb que contenía el sitio de interés. Para la amplificación del alelo A, se utilizó el oligonucleótido cebador con la siguiente secuencia: GATACCATCATTAGAATTTTGTG, con el cual se esperaba amplificar un fragmento de 278 pb, mientras que para el alelo C, la secuencia del oligonucleótido cebador fue: GCAGAAAGTGTA AAAATTATCAA y con el que se obtuvo un fragmento de 208 bp. Figura 6 (Anexo 11).

Longitud	Fragmento de interés	Fragmento complementario
440 pb	CCTACAATGTTACAACACTTAAAAT	ATTTAAGTGTGTAACATTGTAGG
440 pb	ATAAGCCCTAAATATATGTATCCTTA	TAAGGATACATATATTTAGGGCTTAT
278 pb	GATACCATCATTAGAATTTTGTG	CACAAAATTCTAATGATGGTATC

208 pb GCAGAAAGTGTA AAAAATTATCAA **TTGATAATTTTTACACTTTCTGC**
CCTACAATGTTACAACACTTAAAAATATTTCTAAAATGTAACATTTTAAAAAAGGAACATTTTGCAAATA
TTTTCTTTTACTTTATAACCTCATT CAGGACTTCCCCTTCCTCCCAAGCTCAATATGGTGTCAAAGGATA
GTTGATACAGGCCATTAAGATTTACTTTTCAGTGGAACAGGAGTCCATTTTCATAAAACTTCTTTATCTG
CTGTATCAGATGCAAGCCACACG**GATACCATCATTAGAATTTTATG****TAATAATTTTTACACTTTCTGCAA**
CAGAAAGTAAGCTTGGGGAGAGGGATACCAAAATTCAGGTAAGAGGGCAAATATTTACTTGCAGTTTCCA
GTGTTAAAAC TTTCTATTTCCTGGAATGATAGCAAAGACTGACCTAAAATATTTGAAATACAATT**TAAGGA**
TACATATATTTAGGGCTTAT

Figura 6. Fragmentos esperados en la secuencia de ADN de la región promotora del gen de IL-18. Color verde: oligonucleótido cebador de inicio, color azul: oligonucleótido cebador final, color rosa: oligonucleótido cebador para amplificar alelo A, color rojo: oligonucleótido cebador para amplificar alelo C, color amarillo: región de identificación de SNP estudiado.

En la figura 7 se muestra un gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata en donde se observan los tamaños de los fragmentos obtenidos en pares de bases (pb), así como la interpretación de genotipos: la banda control de 440 pb, alelo A de 278 pb y alelo C de 208 pb.

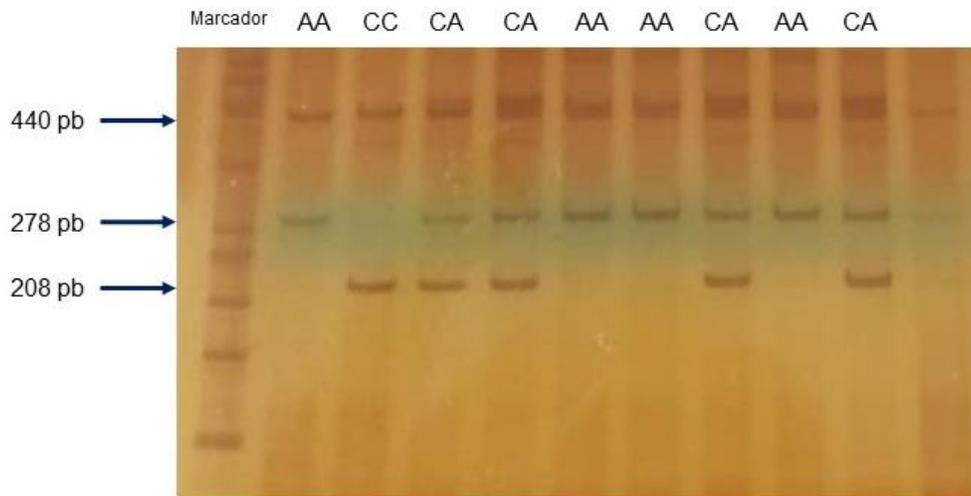


Figura 7. Gel de poliacrilamida teñido, con genotipos para el SNP -607 C/A del gen de IL-18, pb: pares de bases. Carril no.1: Marcador o escalera de tamaño molecular, carriles 2-10, genotipos para algunas muestras.

Etapa 4: Análisis de resultados

Se realizó en análisis estadístico, la escritura de tesis y publicación de los resultados.

7.6 Análisis estadístico

El análisis de los datos incluyó la estadística descriptiva de las frecuencias genotípicas y alélicas por medio de valores absolutos y porcentajes y para las variables numéricas media y desviación estándar.

Para realizar el análisis estadístico inicialmente se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluar la distribución de las variables, y una vez obtenido el resultado se realizó la comparación de medias entre grupos por medio de la prueba de U de Mann-Whitney para las variables insulina y glucosa de ayuno, HOMA2-IR y circunferencia cintura ya que no siguieron una distribución normal. Además, se realizaron tablas de contingencia y χ^2 de Pearson para determinar la diferencia de frecuencias de las variables edad y sexo entre grupos.

El equilibrio de Hardy-Weinberg se calculó por medio de la prueba χ^2 de Pearson, mientras que para descartar la existencia de endogamia en la población se utilizó el estadístico F, calculado a partir de la fórmula: $F = P_{AA}/P_A + P_{aa}/P_a - 1$, en donde P_{AA}/P_{aa} son las frecuencias genotípicas y P_A/P_a las frecuencias alélicas. Ambos resultados fueron comparados con el de una población general proveniente del estado de Puebla y reportada previamente (22). Además, se utilizó la prueba de χ^2 de Pearson para comparar la frecuencia de genotipos entre grupos a partir de los modelos de herencia dominante y recesivo.

Finalmente, para determinar la asociación del SNP por modelo de herencia con la RI, se realizó una regresión logística binaria con el correspondiente intervalo de confianza y ajustado para la variable circunferencia cintura.

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el uso del paquete SPSS versión 23, y tomando en cuenta un valor de significancia <0.05 ($p < 0.05$).

Debido a que el tamaño de muestra fue tomada a conveniencia, se realiza el cálculo del poder de la muestra para la regresión logística binaria mediante G* Power 3.1.9.4.

8. Resultados

Se realizó la invitación a participar al estudio a un total de 250 personas, de los cuales, 161 sujetos aceptaron participar y firmaron el consentimiento informado, de ellos, 88 cumplieron con los criterios de inclusión, 25 fueron eliminados y 48 excluidos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Criterios de exclusión y eliminación de los sujetos reclutados

Numero de sujetos	Criterios de exclusión / eliminación
2	Hipotiroidismo
12	Alcoholismo
2	Tabaquismo
32	Muestra insuficiente para lectura del polimorfismo
19	Diagnostico DT2
6	HC incompleta

DT2: Diabetes Mellitus tipo 2

En el cuadro 3, se muestran las características demográficas, bioquímicas y antropométricas de los sujetos que conformaron la muestra total para este estudio. Del total de sujetos, 40 (46%) se clasificaron en el grupo de RI y 48 (54%) en el de sin RI. Además, del total de la muestra, 52 (59.1%) sujetos fueron hombres y 36 (40.9%) fueron mujeres, mientras que la muestra tuvo en promedio 43.7 ± 12.1 años de edad.

Cuadro 3. Características generales de la población de estudio

Variable	n=88	Rango de normalidad
Edad (años)	43.7 ± 12.1	N/A
Insulina (uU/mL)	14.4 ± 8.5	8.7-12 µU/mL
Glucosa (mg/dL)	96.1 ± 14.3	70-100 mg/dL
HOMA2-IR	1.9 ± 1.1	≥2
CC (cm)		
Mujeres	86.8 ± 9.7	≤80 cm
Hombres	97 ± 11.8	≤90 cm
Sexo (M/H)	36/52	N/A
RI (Si/ No)	40/48	N/A

CC: Circunferencia cintura, Media ± Desviación estándar, RI; Resistencia a la insulina.

En el cuadro 4, vemos que al realizar la comparación de los grupos con y sin RI, se encontró diferencia significativa para el sexo, menor número de mujeres en el grupo con RI que en el de sin RI y mayor número de hombres en el grupo con RI que sin RI ($p < 0.001$), también se encontró diferencia en los niveles de insulina, glucosa de ayuno y HOMA2-IR, siendo mayores en el grupo con RI, las tres mediciones tuvieron una $p < 0.001$ y en el caso de circunferencia cintura la diferencia solo fue significativa para los hombres ($p < 0.001$), ya que los sujetos en el grupo de RI tuvieron valores mayores.

Cuadro 4. Características demográficas, bioquímicas y antropométricas por grupo de estudio

	Sin RI (n=48)	Con RI (n=40)	p
Sexo (M/H)	31/17	5/35	<0.001*
Edad (años)	41.6 ± 12.4	46.2 ± 11.4	0.084**
Insulina (uU/mL)	8.4 ± 2.9	21.5 ± 7.5	<0.001**
Glucosa (mg/dL)	89.2 ± 8.7	104.3 ± 15.4	<0.001**
HOMA2-IR	1.08 ± 0.4	2.8 ± 0.96	<0.001**
CC (cm)			
Mujeres	83 ± 11.7	92 ± 8.1	0.929**
Hombres	86.3 ± 7.5	102.8 ± 10.1	<0.001**

CC: Circunferencia cintura, *Prueba de Chi cuadrada, ** Prueba U de Mann Whitney, $p < 0.05$.

Las frecuencias alélicas y genotípicas para la población general de Puebla y para los sujetos de estudio se muestran en el cuadro 5, en donde se observa que no hay diferencia en las frecuencias genotípicas entre ambos grupos ($p=0.564$). Cabe resaltar que se determinaron dichas frecuencias para la población general de Puebla debido a que no hay datos de referencia para población mexicana. Además, a la muestra se le determinó el coeficiente de endogamia, siendo de -0.43, lo que significa que en la muestra encontramos gran diferenciación genética.

Cuadro 5. Frecuencias genotípicas del SNP -607C/A del gen de IL-18 en población general y muestra de estudio.

	Población General (n=98)	Muestra de estudio (n=88)	Chi cuadrada	p
Genotipo				
AA	26 (26.5%)	29 (32.6%)		
CC	23 (23.5%)	22 (24.7%)	1.146	0.564
CA	49 (50%)	37 (42.7%)		

Los datos se expresan en frecuencias absolutas y porcentajes SNP: Polimorfismo de único nucleótido, $p < 0.05$

En el cuadro 6, se presentan las frecuencias genotípicas y alélicas del SNP -607 C/A del gen de IL-18 para cada grupo de estudio; no encontrándose diferencia significativa entre grupos.

Cuadro 6. Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP -607C/A del gen de IL-18 en los grupos de estudio.

Genotipos		Sin RI	Con RI	<i>p</i>
		n (%)	n (%)	
IL-18 -607 (CA)	AA	16 (33)	13 (32)	0.68*
	CC	13 (27)	8 (22)	
	CA	19 (40)	19 (46)	
Alelos				
	A	51 (53)	45 (47)	0.81*
	C	45 (55)	37 (45)	

Datos expresados en frecuencias absolutas y porcentajes, *Prueba de Chi Cuadrada

En el cuadro 7, se presenta la comparación entre grupos para las frecuencias genotípicas del SNP -607 C/A del gen de IL-18. De acuerdo con el modelo dominante de herencia genética, en donde se asume que una sola copia del alelo de riesgo es suficiente para modificar el riesgo y el modelo recesivo que apunta que es necesario tener dos copias del alelo de riesgo para causar la modificación del riesgo. No hubo diferencia entre grupos.

Cuadro 7. Frecuencias genóticas en modelo dominante y recesivo

Genotipo	Con RI <i>n</i> = 40	Sin RI <i>n</i> =48	<i>p</i>
Modelo dominante			
C/C	8 (22%)	13 (27%)	
C/A + A/A	32 (78%)	35 (73%)	0.464*
Modelo recesivo			
C/C + C/A	26 (66%)	33 (69%)	
A/A	14 (34%)	15 (31%)	0.821*

Datos expresados en frecuencias absolutas y porcentajes *Prueba de Chi cuadrada, $p < 0.05$

Se determinó la asociación entre los modelos dominante y recesivo del SNP -607 C/A del gen de IL-18 con RI como se muestra en el cuadro 8; sin embargo, no se encontró asociación aún después de hacer el ajuste por CC.

Cuadro 8. Análisis de asociación del SNP -607 C/A del gen de IL-18 con RI

RI	OR	95% CI	<i>p</i>
Modelo Dominante	1.321	0.498-3.504	0.576
Modelo Dominante*	1.049	0.374-2.946	0.927
Modelo Recesivo	1.141	0.469-2.773	0.771
Modelo Recesivo*	1.038	0.411-2.623	0.937

Grupo 1: Modelo dominante (CA+AA). Grupo 2: Modelo recesivo (CA+CC), *Ajustado para obesidad central, Regresión logística binaria, $p < 0.05$

Finalmente, debido a que algunos estudios han reportado que la CC (>80 cm para mujeres y >90 cm para hombres), la hiperglucemia (≥ 100 mg/dL) y la hiperinsulinemia (≥ 11.25) se asocian fuertemente a RI, se realizó un análisis de asociación entre estas alteraciones metabólicas y RI y se ajustó para los modelos dominante y recesivo, como se muestra en el cuadro 9; en donde podemos ver que

el aumento en 1 unidad de la obesidad central (1cm de cintura) aumenta significativamente la posibilidad de presentar RI (OR= 0.288, IC95%=1.282-9.388 $p<0.014$) y que una vez ajustada esta asociación para el modelo recesivo (CA + CC vs. AA) del SNP -607 del gen de IL-18, la probabilidad de presentar RI aumenta a 3.489 (IC95%=1.276-9.537; $p<0.015$). No sucediendo lo mismo con las otras variables de interés.

Cuadro 9. Asociación entre alteraciones metabólicas y RI ajustado para los modelos dominante y recesivo

RI	OR	IC 95%	<i>p</i>
Obesidad central	0.288	1.282-9.388	0.014
Ajustado con modelo dominante	0.291	0.106-0.799	0.017
Ajustado con modelo recesivo	3.489	1.276-9.537	0.015
Glucosa alterada	0.190	0.072-0.505	0.001
Ajustado con modelo dominante	0.190	0.071-0.504	0.001
Ajustado con modelo recesivo	0.172	0.063-0.471	0.001
Hiperinsulinemia	0.000	0.000	0.000
Ajustado para modelo dominante	0.000	0.000	0.997
Ajustado para modelo recesivo	0.000	0.000	0.997

Modelo dominante (CA+AA vs. CC). Grupo 2: Modelo recesivo (CA+CC vs. AA), Regresión logística binaria, $p<0.05$, Obesidad central (>80 cm para mujeres y >90 cm para hombres), hiperglucemia (≥ 100 mg/dL) e hiperinsulinemia (≥ 11.25).

9. Discusión

Debido a que diversos estudios han reportado que la obesidad central (determinada por medio de la circunferencia cintura), la hiperglucemia y la hiperinsulinemia se asocian a RI, se realizó un análisis de asociación entre estas alteraciones metabólicas y RI y se ajustaron a los modelos dominante y recesivo del SNP -607 C/A del gen de IL-18; encontrándose que la asociación entre RI y la obesidad central aumento cuando se porta el modelo recesivo de herencia; si bien no hay artículos que reporten asociaciones de este tipo con el SNP de estudio, Zamora y cols. (22,44) han reportado que las alteraciones metabólicas relacionadas a DT2 se modifican cuando se ajustan a algún modelo de presentación de haplotipos de IL-6. Por lo que, derivado de los resultados, se propone que el riesgo a presentar RI debido a obesidad central aumenta cuando se porta el modelo recesivo (CA+CC) del SNP -607 C/A del gen de IL-18.

Se encontró diferencia significativa en el sexo de los sujetos de estudio por grupo, teniendo mayor proporción de hombres que mujeres en el grupo con RI, lo que se asemeja a lo reportado por Gallo y cols., (45) en una muestra de sujetos colombianos, en donde, el 31.1% de resistentes a la insulina fueron hombres y el 19.7% mujeres, además se encontró que los hombres tuvieron mayores valores de circunferencia cintura en el grupo de RI en comparación con el grupo sin RI y cómo se sabe la obesidad central es un factor importante relacionado a la RI. Los valores de CC encontrados en los hombres pueden estar relacionados al estilo de vida, como la actividad física y la alimentación. Algunos estudios como el de Mamtani y cols. (12), realizado en una muestra de sujetos Mexico-Americanos, concluyó que la circunferencia de cintura para un valor de HOMA-IR de 3.8 predijo fuertemente DT2 (OR= 4.83). Mientras que Shao-Jie y cols. (11), concluyeron que el riesgo de padecer RI aumentó cuando los valores de la CC de hombres y mujeres se encontraba por encima de los valores de referencia (OR, 2.84, $p<0.05$).

La RI tiene como factor desencadenante a la obesidad central, recientemente se ha propuesto que esto es debido a que, en la obesidad se produce la polarización de macrófagos tipo M2 a M1 (proinflamatorios), además, se activan complejos

proteicos (NLRP3) en el citoplasma de dichos macrófagos, lo que produce activación de caspasa 1 y con ello secreción de interleucinas, lo que produce perpetuación de la inflamación de bajo grado, que junto con la activación de receptores TLR-4 en músculo y tejido adiposo bloquean a Akt y la vía de señalización de insulina PI3K contribuyen al desarrollo de RI (2,17,18).

Al realizar la comparación entre grupos para la edad de los sujetos, no hubo diferencia significativa, y la edad promedio de los sujetos con RI los clasifica en el grupo de adultos de acuerdo a la OMS, lo cual garantiza que nuestros resultados no están asociados a comorbilidades asociadas a la edad, esto de acuerdo con algunos estudios, como el de Peng y cols. (46), quienes determinaron que sujetos con RI y edad mayor a 65 tenían valores más altos de HOMA-IR en comparación con los sujetos de edad <65 años; y el estudio de Refaie y cols. (47), que concluyeron que la RI parece ser un rasgo característico del proceso normal de envejecimiento y puede considerarse un factor de riesgo inevitable para la intolerancia a la glucosa y el síndrome metabólico, debido a que, al comparar las edades de un grupo control sano (44.6 ± 3.5 años) con uno de edad mayor a 65 años (65.6 ± 4.8 años) y otro con DT2 (49.2 ± 6.8 años), así como sus niveles de glucosa, insulina y valores de HOMA-IR, los tres resultados fueron mayores en los grupos de edad mayor a 65 años y el de edad mayor a 65 con DT2, pero de todos ellos el grupo con DT2 tuvo los valores más altos ($p < 0.001$).

Como era esperado, en el presente estudio los niveles de insulina y glucosa en ayuno de los sujetos con RI fueron significativamente mayores que los del grupo sin RI, y estos resultados se ajustan a la fisiopatología de la enfermedad, como se mencionó dentro de los antecedentes generales. Cabe mencionar que los valores de insulina de ayuno del grupo sin RI fueron muy parecidos a los reportados por Vázquez y cols. (9), para población mexicana, quienes lo propone como punto de corte para determinar insulinemia normal; mientras que en grupo con RI observamos que la media y DE se encuentran dentro del punto de corte para hiperinsulinemia propuesta por Zamora y cols.(22), en población mexicana del estado de Puebla. Con relación a los niveles de glucosa que también tuvieron

diferencia significativa entre los grupos de estudio, Esparza-Romero y cols. (8), reportaron que en sujetos con tolerancia normal a la glucosa, es decir, pacientes sanos, el rango de 92.9 ± 8.8 mg/dL de glucosa, corresponde a los sujetos con mayores valores de HOMA-IR, lo que fue descubierto cuando se compararon dos grupos de mexicanos radicados en distintos países. Por lo que, altos niveles de glucosa e insulina se relacionan con altos valores del índice HOMA-IR y, por lo tanto, RI a largo plazo, cuando la RI es estimada de acuerdo con el punto de corte establecido para cada población.

Con respecto a las frecuencias genotípicas del SNP -607 C/A del gen de IL-18, no hay estudios que reporten las frecuencias en grupos divididos con y sin RI; en este estudio, no encontramos diferencia significativa al comparar sujetos con y sin RI; sin embargo, las frecuencias genotípicas encontradas en nuestra muestra de estudio, se asemeja a las reportadas en el estudio de Pawlik y cols. (48), quienes determinaron que las frecuencias genotípicas del SNP -607 C/A del gen de IL-18 son del 32.3 % para el CC, 41.9 % para CA y 25.8 % para AA en una muestra de hombres y mujeres caucásicos de Polonia, pero las frecuencias genotípicas halladas en este estudio difirieron con lo reportado por Seyda y cols. (42), quienes en una muestra de hombres de Pakistán, determinaron mayor frecuencia genotípica de AA en comparación con los otros dos genotipos y que este genotipo se relacionó con los puntajes más altos de HOMA-IR. La variabilidad genética dada por herencia es modificada por el ambiente y estilo de vida; por lo que, las diferencias genotípicas del SNP -607 del gen de IL-18 encontradas probablemente depende de cada población estudiada.

Además, en este estudio, se agruparon las frecuencias genotípicas por modelo hereditario (dominante y recesivo) y se compararon entre los grupos de estudio, no encontrándose diferencia significativa. Posteriormente, al realizar el análisis de regresión logística, entre RI y los modelos hereditarios con y sin ajuste a obesidad central, no se encontró asociación significativa, contrario a los resultados de Seyda y cols. (42), en dónde reportaron que los sujetos portadores del genotipo

AA del SNP -607 del gen de IL-18 con obesidad presentan valores más altos de HOMA-IR; sin embargo, no se realizaron análisis de asociación.

10. Conclusiones

Cuando se compararon las características bioquímicas y antropométricas entre grupos se encontraron diferencias significativas en los valores de glucosa, insulina y circunferencia cintura como era esperado. Además, se encontró diferencia significativa en el sexo de los sujetos de estudio, en donde, hubo mayor número de hombres que de mujeres en el grupo de RI.

No hubo diferencia significativa en las frecuencias alélicas y genotípicas en población general sana y la muestra de estudio.

El SNP -607 C/A de IL-18 no se asoció con RI de manera directa en población poblana; sin embargo, se encontró que influye significativamente en la relación que existe entre la obesidad central y la RI cuando se ajusta al modelo recesivo.

Capítulo 3.

11. Limitaciones y debilidades

Como limitaciones tenemos que, aunque hubo buena asistencia de personas a la “Clínica Dale un minuto a tu vida” para participar en este estudio, al hacerles la evaluación a varias de ellas se les diagnosticó DT2 y otros más fueron sanos, asimismo la captura de pacientes se detuvo a inicios de año debido a las medidas de seguridad por COVID-19, lo que limitó el número final de sujetos de estudio.

No se analizaron estilos de vida en relación a los valores de CC, por ejemplo, actividad física y alimentación.

Finalmente, aunque el índice HOMA-IR utilizado para la determinación de RI, cuenta con buena correlación con el clamp euglicémico - hiperinsulinémico, determinado como estándar de oro, éste último resulta ser invasivo, costoso y complejo para su aplicación en el consultorio y en estudios como este, motivo por el cual se utilizó el índice y no el clamp.

El tiempo de traslado de muestras a CIBO que afecta la calidad del ADN.

12. Fortalezas y oportunidades

1. La edad de los sujetos de estudio por grupo no tuvo diferencia y la edad media los clasificó en el grupo de adultos, por lo que aseguramos que la RI es independiente a los cambios asociados al envejecimiento.

2. Se compararon las frecuencias genotípicas para el SNP -607 C/A del gen de IL-18 del grupo de estudio con población general, para determinar el equilibrio Hardy Weinberg

3. El investigador recibió un taller teórico-práctico en técnicas de análisis genético para asegurar que el procesamiento de las muestras obtenidas y su posterior análisis fuera el correcto.

4. La caracterización bioquímica se llevó a cabo por un laboratorio certificado, que asegura el correcto protocolo de obtención de las muestras a analizar.

5. Con la capacitación adquirida en CIBO se hallaron estrategias para la extracción de ADN en Puebla y con ello asegurar las óptimas condiciones del ADN previo a su análisis molecular en Guadalajara.

13. Perspectivas

Con el objetivo de dar seguimiento al trabajo de esta tesis se propone como perspectiva abordar los siguientes puntos:

1. Genotipificar sujetos de diferentes regiones del país.
2. Realizar un estudio de haplotipos para los SNP's -607 C/A y -137 G/C de IL-18 en asociación a RI y alteraciones metabólicas.
3. Medir los niveles de IL-18 en asociación con el estudio de haplotipos de los SNP's -607 C/A y -137 G/C de IL-18.
4. Determinar la expresión de IL-18 en asociación con el estudio de haplotipos de los SNP's -607 C/A y -137 G/C de IL-18.

14. Referencias Bibliográficas

1. Hua Q. Insulin: A small protein with a long journey. *Protein Cell*. 2010;1(6):537–51.
2. Olivares Reyes JA, Arellano Plancarte AA. Bases Moleculares De Las Acciones De La Insulina. *Rev Educ Bioquímica*. 2008;27(1):9–18.
3. Gutiérrez-Rodelo C, Roura-Guiberna A, Olivares-Reyes JA. Mecanismos Moleculares de la Resistencia a la Insulina : Una Actualización. *Gac Med Mex*. 2017;153:214–28.
4. Boucher J, Kleinridders A, Ronald K. Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6:a009191.
5. Zick Y. The insulin receptor: Structure and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1989;24(3):217–69.
6. Świdarska E, Strycharz J, Wróblewski A, Szemraj J, Drzewoski J, Śliwińska A. Role of PI3K/AKT Pathway in Insulin-Mediated Glucose Uptake. In: *Blood Glucose Levels [Internet]*. IntechOpen; 2020. p. 18.
7. Schinner S, Scherbaum W, Bornstein S, Barthel A. Molecular Mechanisms of Insulin Resistance in Glucagon-Producing. *Diabet Med*. 2005;22:674–82.
8. Esparza-Romero J, Valencia ME, Martínez ME, Ravussin E, Schulz LO, Bennett PH. Differences in insulin resistance in Mexican and U.S. Pima Indians with normal glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(11):358–62.
9. Vázquez Chávez, Cuauhtémoc Salinas Orozco S, Gómez Díaz RA, Rosso Juárez, Ma. Magdalena Jiménez Villaruel M. ¿Cuál es el nivel de insulina en una población mexicana en peso ideal? *Rev Endocrinol y Nutr*. 2003;11:22–7.
10. Fahed M, Abou M, Merhi S, Mosleh J, Ghadieh R, Ghadieh R, et al. Evaluation of risk factors for insulin resistance: A cross sectional study among employees at a private university in Lebanon. *BMC Endocr Disord*. 2020;20(1):1–14.
11. Pang SJ, Man QQ, Song S, Song PK, Liu Z, Li YQ, et al. Relationships of Insulin Action to Age, Gender, Body Mass Index, and Waist Circumference Present Diversely in Different Glycemic Statuses among Chinese Population. *J Diabetes Res*. 2018;2018.
12. Mamtani M, Kulkarni H, Dyer TD, Almasy L, Mahaney MC, Duggirala R, et al. Waist Circumference Independently Associates with the Risk of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes in Mexican American Families. *PLoS One*. 2013;8(3).
13. Dominguez-Reyes T, Quiroz-Vargas I, Salgado-Bernabé A, Salgado-Goytia L, Muñoz-Valle J, Parra-Rojas I. Nutrición Hospitalaria Trabajo Original. *Nutr Hosp*. 2017;34(1):96–101.
14. Carneiro Roriz AK, Santana Passos LC, Cunha De Oliveira C, Eickemberg M, De Almeida Moreira P, Barbosa Ramos L. Anthropometric clinical indicators in the assessment of visceral obesity: An update. *Nutr Clin y Diet Hosp*. 2016;36(2):168–79.
15. Lleverino A, Bermúdez D, Gutiérrez A, Molina M. Diagnóstico y tratamiento del sobrepeso y obesidad exógena. *Guía de Evidencias y Recomendaciones: Guía de Práctica Clínica. Guía de práctica clínica GPC*. México; 2018.
16. Reyes-Muñoz E, Martínez-Herrera E, Ortega-González C, Arce-Sánchez L, Ávila-Carrasco A, Zamora-Escudero R. Valores de referencia de HOMA-IR y QUICKI durante el embarazo en

- mujeres mexicanas HOMA-IR and QUICKI reference values during pregnancy in Mexican women . *Ginecol Obs Mex*. 2017;85(5):306–13.
17. Tam CS, Xie W, Johnson WD, Cefalu WT, Redman LM, Ravussin E. Defining insulin resistance from hyperinsulinemic-euglycemic clamps. *Diabetes Care*. 2012;35(7):1605–10.
 18. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412–9.
 19. BONORA E, TARGHER G, ALBERICHE M, BONADONNA RC, SAGGIANI F, ZENERE MB, et al. Homeostasis Model Assessment Closely Mirrors the Glucose Clamp Technique in the Assessment of Insulin Sensitivity. *Diabetes Care*. 2000;23(1):57–63.
 20. Buccini G, Wolftbal DI. Valores de corte para índices de insulinorresistencia , insulinosensibilidad e insulinosecreción derivados de la fórmula HOMA y del programa HOMA2 . Interpretación de los datos . *Rev Argent Endocrinol Metab*. 2008;45(1):3–20.
 21. Rodríguez A, Cruz M, María R, Pérez M, Hernández P, Algara P. Relación entre composición corporal y concentración de leptina sérica en mujeres estudiantes de nivel superior . *Arch Latinoam Nutr*. 2018;68(1):17–28.
 22. Zamora-ginez I, Garc G. Low Prevalence of Interleukin-6 Haplotypes Associated with a Decreased Risk of Type 2 Diabetes in Mexican Subjects with a Family History of Type 2 Diabetes. 2013;44:529–34.
 23. M Porchia L, Gonzalez-Mejia E, Torres-Rasgado E, Ruiz-Vivanco G, Baez-Duarte B, Pulido-Pérez P, et al. Identification of Anthropometric Indices That Best Correlate With Insulin Sensitivity and Insulin Resistance from Subjects from Central Mexico. *J Diabetes Metab*. 2014;05(10):5–10.
 24. Ortega-Cortés R, Hurtado-López E, López-Beltrán A, Trujillo-Trujillo X, Tlacuilo-Parra J, Colunga-Rodríguez C. Caracterización de niños obesos con y sin diagnóstico de síndrome metabólico en un hospital pediátrico. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2014;52(1).
 25. Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med*. 2011;17(2):179–89.
 26. Montañó L, Fortoul T, Rendón E. El NLRP3 como ejemplo. 2016;42–9.
 27. Shi H, Kokoeva M V, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid – induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006;116(11):3015–25.
 28. Ferreira V, Borba H, Bonetti A, Leonart L, Pontarolo R. Cytokines and Interferons: Types and Functions. *IntechOpen*. Paraná; 2012. 65–86 p.
 29. Vega B. www.medigraphic.com Citocinas. *Rev Fac Med UNAM*. 2010;53(2):94–5.
 30. Dávalos-de Cruz AP, Flores-chávez A, Hernández-Cuervo P, Ramírez-Villafaña M, González-Ponce F, Bonilla-Lara D, et al. Interleucina-18 en síndrome metabólico. *El Resid*. 2015;10(3):118–24.
 31. de Oliveira A, Hermsdorff HH, Cocate PG, Santos EC, Bressan J, Natali AJ. Accuracy of plasma interleukin-18 and adiponectin concentrations in predicting metabolic syndrome and cardiometabolic disease risk in middle-age Brazilian men. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2015;40(10):1048–55.
 32. Zilverschoon GRC, Tack CJ, Joosten LAB, Kullberg BJ, Van Der Meer JWM, Netea MG. Interleukin-18 resistance in patients with obesity and type 2 diabetes mellitus. *Int J Obes*. 2008;32(9):1407–14.

33. Hivert MF, Sun Q, Shrader P, Mantzoros CS, Meigs JB, Hu FB. Circulating IL-18 and the risk of type 2 diabetes in women. *Diabetologia* [Internet]. 2009 Oct 8;52(10):2101–8.
34. Torrades S. Diversidad del genoma humano: polimorfismos. *Offarm*. 2002;21(5):122–6.
35. Checa Caratachea MA. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *REV INST NAL ENF RESP MEX*. 2007;20(3):213–21.
36. Ramírez-Bello J, Vargas-Alarcón G, Tovilla-Zárate C, Fragoso JM. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): Implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gac Med Mex*. 2013;149(2):220–8.
37. Ramírez-Bello J, Vargas-Alarcón G, Tovilla-Zárate C, Fragoso JM, Badiano J. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas *Gaceta Médica de México*. 2013;149:220-8 Artículo de Revisión correspondencia. 2013.
38. Cabrero J, Pedro J, Camacho M. Capítulo 6: FUNDAMENTOS DE GENÉTICA DE POBLACIONES. 1998;83–126.
39. Hernández-Rodríguez AW, Trejo-Medinilla F de M. Estudio genético poblacional de frecuencias alélicas para 15 marcadores str presentes en la población del estado de zacatecas aplicado a la práctica forense. *Arch Med*. 2014;10(1):1–24.
40. Giedraitis V, He B, Huang W, Hillert J. Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter : a possible role of polymorphisms in expression regulation. 2001;112:146–52.
41. Khripko OP, Sennikova NS, Lopatnikova JA, Khripko JI, Filipenko ML, Khrapov EA, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in the IL-18 gene with production of IL-18 protein by mononuclear cells from healthy donors. *Mediators Inflamm*. 2008;2008.
42. Seyda SF, Zehra J, Syed HA, Daniyal N, Zara B, Ahmed A. *World Journal of. World J Diabetes*. 2017;8(6):304–10.
43. Martínez-Hervas S, Martínez-Barquero V, Nuñez Savall E, Lendínez V, Olivares L, Benito E, et al. Los niveles plasmáticos de IL-18 se relacionan con la insulinemia y están modulados por polimorfismos del gen de IL-18. *Clin e Investig en Arterioscler*. 2015;27(6):265–71.
44. Zamora-Ginez I, Sánchez-Guillén M del C, Pérez-Fuentes R, Baez-Duarte BG, Brambila E, García-Zapién A, et al. Association of Interleukin-6 Haplotypes, Obesity, and Metabolic Abnormalities in a Population of Central Mexico. *Lab Med*. 2010;41(10):597–600.
45. Gallo J, Aristizábal D, Segura Á, Correa M, Zapata N. Relación de la resistencia a la insulina con la estructura, la función cardíaca y el metabolismo en adultos jóvenes no obesos. *Acta méd colomb*. 2008;33(3):117–26.
46. Peng P Sen, Kao TW, Chang PK, Chen WL, Peng PJ, Wu LW. Association between HOMA-IR and Frailty among U.S. Middle-aged and Elderly Population. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–8.
47. Refaie MR, Sayed-Ahmed NA, Bakr AM, Abdel Aziz MY, El Kannishi MH, Abdel-Gawad SS. Aging is an Inevitable Risk Factor for Insulin Resistance. *J Taibah Univ Med Sci*. 2006;1(1):30–41.
48. Pawlik A, Dziedziejko V, Kurzawski M, Paczkowska E, Safranow K, Machalinski B. Association between IL18 gene polymorphisms and the release of interleukin-18 from stimulated peripheral blood mononuclear cells. *Biotechnol Biotechnol Equip*. 2012;26(3):2987–90.

ANEXO 1. CONSTANCIA DE REGISTRO ANTE COMITÉ DE ÉTICA E INVESTIGACIÓN



BUAP

Oficio No SIEP / C.I. / 076/2019

Asunto: Constancia de Registro

D.C. BLANCA GUADALUPE BAEZ DUARTE
D.C. IRMA DEL CARMEN ZAMORA GINEZ
D.C. FRANCISCO MENDOZA CARRERA
ALINE ARELI HUERTA RODRÍGUEZ

PRESENTES:

El Comité de Investigación de la Facultad de Medicina de la B.U.A.P., a través de la Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado hace **CONSTAR** que el Proyecto de Investigación presentado en autoría Colectiva por:

- ALINE ARELI HUERTA RODRÍGUEZ
- D.C. BLANCA GUADALUPE BAEZ DUARTE
- D.C. IRMA DEL CÁRMEN ZAMORA GINEZ
- D.C. FRANCISCO MENDÓZA CARRERA

Titulado:

"ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO -607 C/A DEL GEN DE INTERLEUCINA 18 EN SUJETOS CON RESISTENCIA A LA INSULINA"

Ha sido registrado en esta Secretaría con los siguientes datos:

Fecha de registro: 18 de febrero de 2019.

Número de Libro: 2

Número de Hoja: 92

Número de Registro: 692

Vigencia: Inicio 03 de diciembre-de-2018 Termino 04 de diciembre de 2020

ATENTAMENTE

"PENSAR BIEN, PARA VIVIR MEJOR"

H. PUEBLA DE Z., A 18 DE FEBRERO DE 2019

M.C. JOSE LUIS GANDARA RAMIREZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

D.C. JORGE ALEJANDRO CEBADA RUIZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

C.C.P. 60478
C.C.P. 60480
C.C. 61795481



Facultad de Medicina | 13 Sur 2702, Col. Volcanes,
Puebla, Pue. C.P. 72410
01 (222) 229 55 00
Ext. 6047 y 6048

ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO

Proyecto: Asociación entre el polimorfismo -607 c/a, de interleucina 18 en sujetos con resistencia a la insulina

Sede: Hospital Universitario, Facultad de medicina; BUAP, CIBO IMSS
Grupo de estudio: D.C. Zamora Ginez I, D.C. Baez Duarte B.G, Huerta Rodriguez Aline Areli y cols.

Consentimiento informado participación en proyectos de investigación

Nombre:

No. de Folio: Fecha: / /20

Entrevistador:

OBJETIVO GENERAL:

Determinar la asociación entre el polimorfismo -607 C/A del gen de IL-18 en sujetos mexicanos con resistencia a la insulina

Se me ha explicado que mi participación consistirá en ser sometido a toma de signos vitales, mediciones antropométricas, así como a la toma de muestra sanguínea para lo cual me presentaré en tiempo y forma a todas las citas establecidas y en las condiciones indicadas para cada procedimiento. Además de lo anterior, estoy consciente de que una cantidad de las muestras de suero y plasma que me serán tomadas se almacenarán en congelación para su uso futuro y determinación de algún metabolito importante o sus genes.

PARTICIPACIÓN:

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes: el tiempo necesario para ser sometido a las mediciones antropométricas y para punción de vena de brazo para la toma de muestra sanguínea.

Me comprometo a contestar con veracidad todas y cada una de las preguntas relacionada con el protocolo de investigación.

Entiendo que de no concluir el protocolo, o de establecerse algún criterio de eliminación durante mi participación, seré eliminado del protocolo. El coordinador del proyecto me ha explicado que de existir algún criterio de eliminación, que ponga en peligro mi salud, se me dará a conocer, de manera verbal, individual y en total confidencialidad; se me explicará la posible causa y se me orientará para la búsqueda de ayuda profesional. Con lo cual se dará por finalizada mi relación con el proyecto de investigación.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte mi estancia en la facultad. El coordinador del proyecto me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque ésta pudiera hacerme cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

Anexo 1B. Consentimiento informado participación en proyectos de investigación

Se garantiza a los encuestados la confidencialidad de la información que proporcionen; que los datos obtenidos de ellos no podrán comunicarse, en ningún caso en forma nominativa o individualizada, pudiendo ser divulgados de esta manera en eventos científicos y en publicaciones.

CONFIDENCIALIDAD

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

CONSENTIMIENTO

Yo, _____, he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Nombre y Firma del participante

Nombre y Firma del testigo

He explicado al sujeto de investigación la naturaleza y los propósitos de la investigación, así como los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar la presente investigación y me apego a ella.

D.C. Irma del Carmen Zamora Ginez

Investigador responsable
irma.zamora@correo.buap.mx

D.C. Blanca Guadalupe Baez Duarte

Investigador responsable
blanca.baez@correo.buap.mx

Aline Areli Huerta Rodriguez

Alumna MCM
aline.huertar@alumno.buap.mx

ANEXO 3. ASPECTOS ÉTICOS

A los sujetos que aceptan participar en el estudio se les proporciona una explicación amplia en dónde se especifica en qué consiste el proyecto y cuál es su participación. Aquellos que aceptan de manera voluntaria participar en el proyecto, leen y firman la Carta de Consentimiento Informado para la participación en proyectos de investigación clínica (Anexo 2), elaborada de acuerdo con las pautas de la declaración de Helsinki y a los principios y normas éticas para proyectos de investigación en humanos, así como en los lineamientos del Reglamento de investigación de la Ley General de Salud de México, que además bajo su artículo 17, en donde se considera como riesgo de la investigación a la probabilidad de que el sujeto de investigación sufra algún daño como consecuencia inmediata o tardía del estudio, clasifica nuestro estudio en una investigación con riesgo mayor que el mínimo.

Además las personas que colaboran en la investigación tienen garantía de respeto a los principios de autonomía, beneficencia y justicia. Además de mantener con los participantes, un clima de respeto y cordialidad durante el desarrollo del estudio, se mantiene en el anonimato la identidad de dichos participantes y se ponen a la disposición de estos últimos los datos obtenidos.

ANEXO 4. VARIABLES DE ESTUDIO

Variables de estudio					
Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Instrumento de medición	Unidad de medición
SNP -607 C/A de Interleucina 18	Variación en la secuencia del gen de la interleucina 18 que influye en el mecanismo de regulación de la expresión de dicha citocina.	Determinación de la base C/A en la región promotora del gen de IL-18 en la posición -607	Nominal dicotómica	Reacción en cadena de la polimerasa específica de alelo.	Homocigoto AA del polimorfismo -607 C/A Presente/ ausente
Resistencia a la insulina	Estado patológico que altera la capacidad de reducir los niveles de glucosa en sangre en función de la insulina.	Relación de la glucemia y la insulinemia en ayunas. Punto de corte ≥ 2	Nominal dicotómica	HOMA2-IR, mediante calculadora	Presente/ ausente

Variable de Ajuste					
Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Instrumento de medición	Unidad de medición
Circunferencia cintura	Índice que mide la concentración de grasa en la zona abdominal	Valor que resulta de colocar una cinta métrica en la cintura de una persona para medirla	Numérica continua	Cinta antropométrica marca SECA de fibra de vidrio con precisión de 0.1 cm	cm

Variables demográficas					
Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Instrumento de medición	Unidad de medición
Edad	Tiempo que ha vivido una persona u otro ser vivo contando desde su nacimiento	Años de vida que tiene el sujeto al momento de ingresar al estudio	Numérica discreta	Historia clínica	Años
Sexo	Conjunto de características biológicas, físicas, fisiológicas y anatómicas que definen a los seres humanos como hombre y mujer.	Femenino / Masculino	Nominal dicotómica	Historia clínica	Femenino / Masculino

ANEXO 5. HISTORIA CLÍNICA

Proyecto: Asociación entre el polimorfismo -607 c/a, de interleucina 18 en sujetos mexicanos con resistencia a la insulina

Sede: Hospital Universitario, Facultad de medicina; BUAP, CIBO IMSS

Grupo de estudio: D.C. Zamora Ginez I, D.C. Baez Duarte

B.G, Huerta Rodriguez Aline Areli y cols.

Ficha de identificación

No. Folio:

Fecha: / /20

Entrevistador:

Nombre:

Fecha Nacimiento:

Edad: años

Sexo: (M) (F) Estado civil: (sin pareja) (con pareja)

Teléfono fijo:

Teléfono móvil:

Domicilio actual:

email:

Antecedentes personales patológicos

Patología	Si	No	No sabe	Observaciones
Diabetes				
Resistencia a insulina				
HAS				
Cáncer				
Reumatológica				
Cardiovascular				

Hábitos

Hábitos	Calificación Instrumento	Eliminación (Si/No)
Tabaquismo		
Actividad física de alto rendimiento		
Alcoholismo		

Sólo en mujeres: ¿Está embarazada o lactando?

Bioquímica

Prueba	Resultado (unidades)	Observación
Glucosa en ayuno		
Insulina en ayuno		
Hemoglobina glucosilada		

Antropometría

Medición	Resultado (unidades)	Observación
Circunferencia cintura		
HOMA2-IR		

Polimorfismo -607 C/A de IL-18

Presente () Ausente ()

Anexo 5.1 CUESTIONARIO CLASIFICACIÓN CONSUMIDORES DE CIGARRILLO

Nombre:
Entrevistador:

No. Folio:
Fecha:

Esta encuesta es para determinar su consumo de cigarrillos. Su participación en esta encuesta es voluntaria. La información que se requiere es de un día normal. Esta encuesta no influirá en su estancia en la universidad. Por favor contesta con veracidad.

1. ¿Actualmente fuma?
a. Sí b. No
2. ¿Ha fumado por más de seis meses alguna vez en su vida?
a. Sí b. No
3. ¿Hace cuánto tiempo empezó a fumar?
a. Menos de un año
b. Un año
c. Más de un año
d. Entre 3 y 5 e. Más de 5 años
f. Más de 10 años
4. ¿Cuántos cigarrillos fuma en un día normal de consumo?
a. 10 o menos
b. 11 a 20 cigarrillos
c. 21 a 30 cigarrillos
d. 31 o más
5. ¿Cuánto tarda, después de despertarse en fumar su primer cigarrillo?
a. Menos de 5 minutos
b. Entre 6 y 10 minutos.
c. Entre 31 minutos y 1 hora
d. Más de una hora
6. ¿Cómo fuma los cigarrillos?
a. Traga el humo
b. Tiene el humo en la boca
7. ¿Desearía dejar de fumar?
a. Sí b. No
8. ¿Ha intentado dejar de fumar?
a. Sí b. No
9. ¿Fumar le ha acarreado problemas de salud?
a. Sí b. No
10. Cuando deja de fumar un cigarrillo habitual, experimenta: (puede marcar el número de opciones que crea necesario)
a. Irritabilidad o ira
b. Impaciencia
c. Dificultad para concentrarse
d. Dolor de cabeza
e. Tensión o ansiedad
f. Somnolencia
11. ¿Alguien de su familia le ha pedido que deje de fumar?
a. Sí b. No
12. ¿Algún profesional de la salud le ha sugerido que deje de fumar?
a. Sí b. No
13. ¿Encuentra difícil dejar de fumar en sitios donde está prohibido?
a. Sí b. No
14. ¿Encuentra difícil dejar de fumar aun cuando está enfermo?
a. Sí b. No
15. ¿A qué cigarrillo odiaría más renunciar?
a. Al primero de la mañana
b. Al que acompaña un trago
c. Al de antes de un parcial
d. Al de después del almuerzo
e. Al último de la noche

La escala de clasificación va de 0 a 50 y se divide en 4 niveles: bajo (1 a 5 puntos), moderado (6 – 17 puntos), alto con señales de inicio de dependencia (18 a 29 puntos) y dependiente (30 a 50); puntuación que se definió de acuerdo con el cumplimiento de diversos criterios de intensidad, frecuencia, problemas asociados y presencia de indicadores de dependencia nicotínica.

Tomado de CUESTIONARIO PARA LA CLASIFICACIÓN DE CONSUMIDORES DE CIGARRILLO (C4) (Versión estudiantes universitarios Londoño, Constanza y Rodríguez, Ivonne

ANEXO 5.2 AUDIT

Nombre:

No. Folio:

Entrevistador:

Fecha:

Esta encuesta es para determinar trastornos por el uso de alcohol Su participación en esta encuesta es voluntaria. Esta encuesta no influirá en su estancia en la universidad. Por favor contesta con veracidad.

1. Con que frecuencia consume alguna bebida alcohólica?

- (0) nunca
- (1) Una o menos veces al mes
- (2) 2 a 4 veces al mes
- (3) 2 o 3 veces a la semana
- (4) 4 o más veces a la semana

6. Con que frecuencia en el curso del último año ha necesitado beber en ayunas para recuperarse después de haber bebido mucho el día anterior?

- (0) nunca
- (1) menos de una vez al mes
- (2) mensualmente
- (3) semanalmente
- (4) a diario o casi a diario

2. Cuantas consumiciones de bebidas alcohólicas suele realizar en un día de consumo normal?

- (0) 1 o 2
- (1) 3 o 4
- (2) 5 o 6
- (3) 7 a 9
- (4) 10 o más

7. Con que frecuencia en el curso del último año ha tenido remordimientos o sentimientos de culpa después de haber bebido?

- (0) nunca
- (1) menos de una vez al mes
- (2) mensualmente
- (3) semanalmente
- (4) a diario o casi a diario

3. Con que frecuencia toma 6 o más bebidas alcohólicas en un solo día?

- (0) nunca
- (1) menos de una vez al mes
- (2) mensualmente
- (3) semanalmente
- (4) a diario o casi a diario

8. Con que frecuencia en el curso del último año no ha podido recordar lo que sucedió la noche anterior porque había estado bebiendo?

- (0) nunca
- (1) menos de una vez al mes
- (2) mensualmente
- (3) semanalmente
- (4) a diario o casi a diario

4. Con que frecuencia en el curso del último año ha sido incapaz de parar de beber una vez había empezado?

- (0) nunca
- (1) menos de una vez al mes
- (2) mensualmente
- (3) semanalmente
- (4) a diario o casi a diario

9. Usted o alguna otra persona han resultado heridos porque usted había bebido?

- (0) no
- (2) sí, pero no en el curso del último año
- (4) sí, el último año

5. Con que frecuencia en el curso del último año no pudo hacer lo que se esperaba de usted porque había bebido?

- (0) nunca
- (1) menos de una vez al mes
- (2) mensualmente
- (3) semanalmente
- (4) a diario o casi a diario

10. Algún familiar, amigo, médico o profesional sanitario han mostrado preocupación por su consumo de bebidas alcohólicas o le han sugerido que deje de beber?

- (0) no
- (2) sí, pero no en el curso del último año
- (4) sí, el último año

Si la puntuación es mayor a 7.5 para hombre y 5.5 para mujeres se considerará Bebedor de riesgo y será excluido del estudio.

Tomado de: Contel G. M., Gual S. A., y Colom F. J. (1999). Test para la identificación de trastornos por uso de alcohol (AUDIT): Traducción y validación del AUDIT al catalán y castellano. *ADICCIONES*, 11: 4, 337-347.

ANEXO 6. MEDICIÓN DE CIRCUNFERENCIA CINTURA

Para la medición de la circunferencia cintura se utilizará una cinta antropométrica marca SECA de fibra de vidrio con precisión de 0,1 cm. Mientras que la técnica que se seguirá será la siguiente: se colocará al sujeto en bipedestación con los pies juntos en posición erguida, con el abdomen relajado y la zona abdominal descubierta. La cinta se colocará en un plano horizontal en el punto medio entre el reborde costal inferior y la espina ilíaca anterosuperior. La medición se tomará cuidando de no ejercer presión con la cinta para evitar la compresión de la piel. Para la CC, la toma se realiza al final de una espiración normal.

ANEXO 7. DETERMINACIÓN DE GLUCOSA DE AYUNO

La cuantificación de la glucosa en ayuno se lleva a cabo por medio del método glucosa-oxidasa (Trinder), por medio del equipo VITROS GLU, que utiliza deslizadoros VITROS GLU y el calibrador de productos químicos VITROS.

Para la medición se utiliza una gota de muestra sanguínea del paciente, misma que se deposita en un dispositivo y se distribuye uniformemente por la capa de propagación a las capas subyacentes.

La oxidación de la muestra de glucosa se catalizada por la glucosa oxidasa para formar peróxido de hidrógeno y gluconato. Esta reacción continua con un acoplamiento oxidativo catalizado por peroxidasa en presencia de precursores de colorante para producir un colorante. La intensidad del tinte se mide por la luz reflejada.

Secuencia de la reacción



Este método utiliza la colorimetría a través de una longitud de onda de 540nm, el tiempo de incubación para el mismo es de aproximadamente 5 minutos a una temperatura de 37°C y con una muestra de 10 µL.

El intervalo de referencia para GLU en adultos en ayunas es de 74-106 mg/dL o 4.1-5.9 mmol/L.

Tomado de Products VITROS Chemistry. VITROS Chemistry Products GLU Slides; Pub. No. MP2-8_EN: pag. 1-15.

ANEXO 8. DETERMINACIÓN DE INSULINA DE AYUNO

Para la determinación de insulina en ayuno se utilizará el método inmunométrico quimioluminiscente de dos sitios en fase sólida con el equipo IMMULITE / IMMULITE 1000 Insulin. El volumen requerido para este efecto es de 100 μ L de suero o plasma heparinizado.

En el proceso un anticuerpo monoclonal se aplica sobre la superficie de los pocillos de microtitulación y otro anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa de rábano picante, se usa como trazador. Las moléculas de insulina en la solución estándar o suero forman un "sandwich" entre los dos anticuerpos. Después de la formación del complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo-enzima conjugada, la enzima-anticuerpo sin consolidar se elimina por lavado. La actividad de peroxidasa de rábano unida en los pozos es analizada con las reacciones de quimioluminiscencia. La unidad de luz obtenida de la reacción (URL) es proporcional a la concentración de insulina de la muestra.

Para los valores esperados un estudio realizado en 83 voluntarios de laboratorio aparentemente sanos y en ayunas produjo una mediana de 8,9 μ IU / ml y un rango inferior del 95% de hasta 28,4 μ IU / ml, en este caso será <20 μ IU/ml

Referencia: Siemens Healthcare Diagnostics Inc. IMMULITE/IMMULITE 1000 Insulin (PILKIN-13, 2006-02-13), pag. 1-7.

ANEXO 9. DETERMINACIÓN DE HEMOGLOBINA GLUCOSILADA

La determinación de Hemoglobina glucosilada se realizará con el método de inhibición inmunturbidimétrica A1c (HbA1c) como una proporción de la hemoglobina total, en sangre entera humana (% o mmol/mol HbA1c). Esto se realizará a partir de la liberación de la hemoglobina contenida en los glóbulos rojos, mediante la hemólisis de la muestra. La sangre del paciente se pondrá en contacto con el Reactivo Hemolizante que contiene un detergente (bromuro de tetradeciltrimetilamonio - TTAB) que lizará los glóbulos rojos específicamente.

A partir del hemolizado obtenido, se determinará mediante dos reacciones independientes, el nivel de HbA1c y Hb de la muestra.

Durante la primera fase de la reacción, la HbA1c de la muestra reacciona con el anticuerpo específico anti-HbA1c (Reactivo A1), formando complejos antígeno-anticuerpo solubles.

Dado que la molécula de HbA1c posee un solo epitope por β -globina para la fijación del anticuerpo específico, no pueden formarse redes de inmunocomplejos.

Con la adición del polihapteno (Reactivo A2), que posee numerosos epítopes por molécula, se produce la reacción de dichas moléculas con el exceso de anticuerpo específico de la primera reacción, dando lugar a inmunocomplejos insolubles que pueden ser medidos turbidimétricamente a 340 nm.

De esta manera, cuanto mayor es el contenido de HbA1c de la muestra, menor es la formación de inmunocomplejos insolubles y menor la señal turbidimétrica obtenida.

La hemoglobina liberada al hemolizar la muestra es convertida en un derivado que puede ser medido espectrofotométricamente (Reactivo B).

Este método es capaz de detectar todas las variantes de hemoglobina glicadas en la porción N-terminal de la cadena β , cuya región reconocida por el anticuerpo es idéntica a la HbA1c.

Finalmente se determinará Diabetes mellitus tipo 2 si el valor de la determinación es \geq a 6.5% según los valores establecidos por la Federación Mexicana de Diabetes y por la American Diabetes Association.

ANEXO 10. DETERMINACIÓN DE ÍNDICE HOMA2-IR

El índice HOMA2-IR se medirá por medio de la calculadora HOMA2©, que se descargará de la página de internet <https://www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator/>. Esta calculadora fue desarrollada por la Universidad de Oxford en 2004 y proporciona un acceso rápido y fácil al modelo HOMA2, mismo que permite usar estimaciones derivadas del modelo de % B y % S y no aproximaciones lineales.

Para esta determinación se tomará como punto de corte un valor ≥ 2 , de acuerdo a lo reportado en población poblana por Zamora y cols., 2013.

ANEXO 11. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN

Esta primera etapa consiste en la extracción de leucocitos y de ADN de cada una de las muestras de sangre.

Extracción de leucocitos

Técnica: Método de Miller y cols.

1. Se extraen 5 mL de sangre completa (con EDTA) y se colocan en un tubo Falcon.
2. Se mezclan con buffer de extracción de leucocitos (NH_4HCO_3 0.01 M y NH_4Cl 0.144 M) en una proporción 1:3 volúmenes.
3. Se agita y se refrigera la mezcla por 20 minutos a 4°C.
4. Se centrifuga a 4°C por 20 minutos a 4000 rpm.
5. Se decanta el sobrenadante cuidadosamente para no desprender el botón de leucocitos que se forma en el fondo del tubo.
6. Lavar con buffer de extracción de leucocitos hasta la eliminación total del detritus celular.
7. Transferir el botón de leucocitos a un vial de 1.5 mL (almacenar hasta su uso, puede almacenarse 6 meses o más a -20°C).

Extracción de ADN

Técnica: Método DTAB-CTAB.

1. Descongelar los leucocitos por 30 minutos aproximadamente
2. Centrifugar los leucocitos a 5000 rpm por 5 minutos
3. Decantar la mayor parte del sobrenadante
4. Resuspender el botón de leucocitos por medio de vortex
5. Agregar 600 μL de DTAB 8.0% (NaCl 1.5 M, Trisma base 10 mM, EDTA 50 mM) y evitar agitarlo
6. Incubar la mezcla a 68°C y se agita cada 5 minutos hasta desvanecer el botón de leucocitos, 10 minutos en total aproximadamente.
7. Añadir 900 μL de cloroformo al 100% y agitar mecánicamente durante 5 minutos
8. Centrifugar a 12,000 rpm por 10 minutos, hasta que se formen 2 fases (acuosa/superior y Orgánica/inferior).

9. Transferir la fase acuosa a 2 viales estériles de 1.5 mL de manera proporcional.
10. Añadir 150 µL de CTAB (hexadecil-trimetil-amonio al 5% y NaCl 0.4 M) y 900 µL de agua bidestilada y agitar suavemente con la mano.
11. Centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos
12. Añadir 150 µL de NaCl (1.2M), 750 µL de Etanol frío al 100% y agitar vigorosamente.
13. Centrifugar a 12 000 rpm por 10 minutos
14. Decantar el sobrenadante de los tubos
15. Tomar el botón de un tubo y transferir al otro con ayuda de una pipeta (1 botón en un vial)
16. Añadir 1 mL de Etanol al 70% y centrifugar a 12 000 por 5 minutos y decantar el sobrenadante (repetir 2 veces).
17. Calentar buffer TE (Tris 100 mM, EDTA 1 mM) en el termobloque a 50 °C
18. Secar el botón de leucocitos manteniendo el vial abierto y cubierto con una gasa sobre el termobloque a 50°C el tiempo que sea necesario o a 37°C todo el día.
19. Re-suspender el botón de ADN colocando 300-400 µL de buffer TE (Tris 100 mM, EDTA 1 mM) según sea el tamaño del botón de ADN.
20. Esperar 1 hora antes de almacenar a -80°C y se hará una dilución 50/50 para la utilización del ADN y se almacenará esta dilución a -20°C.

11.1 CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA PUREZA DEL ADN

Se debe estimar la pureza del ADN mediante espectrofotometría, debido a que el ADN se encuentra asociado a proteínas. Se utilizan longitudes de onda de 260 nm y 280 nm, ya que en estas longitudes se obtiene la máxima absorbancia del ADN y de las proteínas, respectivamente. De esta manera, si la relación de la absorbancia 260nm/280nm es >1.6 puede estimarse que la muestra es bastante pura; mientras que si esta relación es <1.6 indica contaminación de la muestra, principalmente por proteínas.

Este equipo permite realizar medidas de espectrofotometría en un amplio rango de longitudes de onda (220-750 nm) con gran exactitud y reproducibilidad, sin necesidad de emplear cubetas. Requiere un volumen de muestra de 1-2 μL . Su funcionamiento se basa en el empleo de un sistema de retención de muestra que aprovecha la tensión superficial para formar un puente de líquido entre el pedestal inferior y un pedestal superior. En los espectrofotómetros NanoDrop el pedestal superior es el extremo de una fibra óptica conectada a una fuente de emisión de Xenon. Ambos pedestales definen un preciso y estrecho paso óptico cuya longitud varía automáticamente con la concentración de la muestra, permitiendo hacer mediciones en un rango muy amplio de concentraciones sin hacer diluciones. El software asociado al equipo incorpora una serie de aplicaciones específicas para el tipo de medidas que se desee realizar (concentración de ácidos nucleicos a 260 nm y su pureza usando la relación 260/280, concentración de proteínas a 280 nm, etc.). Para medir la concentración de una muestra se han de seguirán los siguientes pasos:

1. Se levanta el pedestal superior.
2. Se deposita 1 μL en el pedestal inferior empleando una micropipeta.
3. Se cierra el pedestal superior e iniciar la medida espectral empleando el software asociado al equipo.
4. Se toma la lectura que se muestra en la pantalla de la computadora.

11.2 AMPLIFICACIÓN DE REGIONES GÉNICAS ESPECÍFICAS MEDIANTE PCR

Se determina mediante el uso del sistema de mutación refractaria de amplificación con tetra-cebador y para su amplificación se utilizarán las bandas de control: CCTACAATGTTACAACACTTAAAAT, de reversión externa: ATAAGCCCTAAATATATGTATCCTTA para amplificar a 440 pb, para el alelo A la banda de avance interno: GATACCATCATTAGAATTTTGTG para amplificar a 278 bp y para el alelo C, la banda de reversa interna: GCAGAAAGTGTA AAAATTATCAA para amplificar a 208 bp.

Procedimiento:

1. Preparación de la mezcla para PCR

Reactivo	1x
Mezcla de PCR	3 µL
Oligo genérico	0.2 µL
Oligo A/C	0.5 µL
Taq ADN polimerasa	0.05 µL
ADN	2 µL
H ₂ O	4.25 µL

2. Colocar la mezcla en un vial de 15 µL
3. Centrifugar la muestra 5 minutos a 10 000 rpm
4. Colocar los viales en la placa para termociclador y ajustarlos
5. Programar el termociclador:
 - Primer ciclo: 5 minutos a 95°C (desnaturalización inicial)
 - 35 ciclos a 95°C por 30 segundos
 - 55°C por 30 segundos
 - 72°C por 30 segundos
 - 72°C por 10 minutos para la extensión final

11.3 PREPARACIÓN DE GEL DE POLIACRILAMIDA Y ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR

La electroforesis es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico a través de una matriz porosa, la cual las separa por tamaños moleculares y carga eléctrica. La técnica clásica utiliza una tira recubierta de una sustancia porosa impregnada de un electrolito. Sus extremos se sumergen en dos depósitos independientes que contienen ambos al electrolito y están unidos a los electrodos del generador de corriente. La muestra se deposita en forma de un pequeño trazo transversal en la tira. La distancia de migración se mide en relación a un marcador interno.

Técnica.

1. Se toman los cristales y materiales para la base del gel (alcohol, palitos laterales cepillo y bolsa de plástico).
2. Colocar una compresa en la mesa de trabajo para colocar los cristales y evitar que se rayen.
3. Utilizar alcohol para desengrasar los cristales y palitos laterales, esperar su secado.
4. Colocar sobre uno de los cristales los palitos laterales (ajustar a la orilla), colocar encima el otro cristal y meter en la bolsa a manera de ajustar el ensamble.
5. Colocar en la base de secado de geles y apretar el mecanismo para que la poliacrilamida no se derrame.
6. En un tubo Falcon colocar:
 - 30 μ L de mezcla de poliacrilamida
 - 300-500 μ L de PSA al 10%
 - 30 μ L de TEMED
7. Tapar bien el tubo Falcon con la mezcla y agitar suavemente (10 veces aproximadamente) para no generar burbujas.
8. Colocar la mezcla en la base de los cristales previamente montados y colocar el cepillo en la parte superior de los cristales.
9. Esperar de 15 a 30 minutos y verificar su gelificación.

Montaje de muestras en el gel de poliacrilamida

Materiales:

- 1 placa
- Puntas nuevas
- ADN
- Jugo azul
- Pipeta de 2-20 μ L
- Agua bidestilada

Procedimiento:

1. Agregar en cada muestra de ADN 1 μ L de jugo azul
2. Centrifugar la muestra por 10 segundos

Montaje de cámara de electroforesis:

3. Tomar cámara de electroforesis y agregar buffer de TBE (1x) por la parte posterior y alcanzar la marca inferior.
4. Desmontar el gel de poliacrilamida de la base de polimerización.
5. Retirar la bolsa de plástico en la zona de lavado, enjuagar los cristales con agua destilada y se marcan los carriles con plumón permanente.
6. Montar los cristales en la cámara de electroforesis y sujetar con los tornillos procurando que se mantenga el nivel superior de buffer.
7. Agregar entre 2 y 5 μ L de muestra con jugo azul en los carriles formados en el gel y colocar el marcador (escalera) en la primera celda.
8. Se conecta la cámara de electroforesis y se programa a 150 volts durante 1 hora 0 de 180-190 volts durante 40 minutos.

11.4 TINCIÓN DEL GEL DE POLIACRILAMIDA CON NITRATO DE PLATA

El uso de nitrato de plata produce una coloración caramelo (café claro) o negro. Este efecto cromático se ha demostrado que está dado por la difracción de la luz en la plata. La tinción con nitrato de plata tiene una detección de concentraciones muy pequeñas que varía entre 2 a 5 ng, sin embargo, la detección con plata es exclusivamente cualitativa y no puede ser utilizada para cuantificar.

El mecanismo de esta tinción se basa en la unión de los iones de plata a las cadenas laterales de los aminoácidos (principalmente grupos carboxilo), que en condiciones adecuadas se reducen a plata metálica, lo que permite visualizar las proteínas fijadas al gel como bandas o manchas de color marrón.

Procedimiento:

1. Desconectar la cámara de electroforesis
2. Acomodar los cables de la cámara y sacar el gel de la misma.
3. Tomar los separadores de modo que sea posible desprender los dos cristales para mantener el gel de poliacrilamida en un solo cristal.
4. Introducir el vidrio a una bandeja con solución fijadora y desprender cuidadosamente el gel del cristal.
5. Mantener el gel en solución fijadora por 10 minutos.
6. Retirar la solución fijadora y agregar nitrato de plata durante 5 minutos y mover constantemente la bandeja.
7. Añadir agua destilada a la bandeja por 3 minutos.
8. Retirar el líquido y desecharlo en el frasco destinado a tal caso.
9. Añadir solución reveladora para cubrir el gel y de 500-1000 μ L de formaldehído evitando tocar el gel mover la bandeja constantemente hasta que aparezcan las bandas.

11.5 SECUENCIA DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN DE IL-18

CTACTTGATCCCACCTCGTGCTTTCATGTTAATTGGCCCAATTGGACTCTACAGTTGGAAGGTGAAAACCTTAC
TATTTCAACTTGAGTCACGTATGTATTCTTATCATATACTTCTTAAAGGTACTATTTTTTTCTTCTGATAGTCA
CC ACACCAAGCACTTCAGGCCACCCTGCCACAGACTTCCTTTGTAATCACTGTTGAAGGACATGATGTTTT
ATGACTTCCCAGAAATGAAAACCCTATCTTGTTTTTAAAACAAACAAACCAACAAAAAGTAGTGTATGTAA
GCATTTTGTTCCTGACTCTAGGAACCCCTCTGTTTTATATCAACTCTGACTGGCAAACACAAAAACAAA
ATGCCACCTTGCTAATTCCCTCCTAGCAAAGTAATACAGTTTAGCACATGTTCAAGAAAAAATGGCTAAG
AAATTTGTTTCCACTAATTATTTCAAGACTGTGATATTTACTCTGCTCTTCAAACGTTACATTTTATAAG
ACTATTTTTAACATGTTGAACATAAGCCCTAAATATATGTATCCTTAAATTGTATTTCAAATATTTAGGTGA
GTCTTTGCTATCATTCCAGGAATAGAAAAGTTTTAACTGAAAAGTCAAGTAAATATTTGCCCTCTACCTG
AATTTTGGTAGCCCTCTCCCAAGCTTACTTTCTGTTGCAGAAAGTGTAATAAATTATTA **C**ATAAAATTCTAAT
GATGGTATCCGTGTGGCTTGCATCTGATACAGCAGATAAAGAAGTTTTATGAAAATGGACTCCTGTTCACTG
AAAATAAATCTTAATGGCTGTATCAACTATCCTTTGACACCATATTGAGCTTGGGAGGAAGGGGAAGTCC
TGAATGAGGTTATAAAGTAAAAGAAAATATTTGCAAAATGTTCTTTTTTAAAATGTTACATTTTAGAAATA
TTTTAAGTGTGTAACATTGTAGGAATTACCCAATAGGACTGATTATTCCGCATTGTAAAATAAGAAAAAG
TTTTGTGCTGAAGTGTGACCAGGAAGTCTGAAAATGAAGAGAGACAGATGACAAAAGAAGATGCTTCTAAT
GGACTTAGGAGGTGCTTTCTTAAAGTCAGAAAGAGATACTCAGAAAGAGGTACAGTTTTTGAAGGCACA
GAGCCCCAATTTTACGGAAGAAAAGATTTTATGAAATAGTGATATTACATTAAGAAGTACTCGTATCCT
CTGCCACTTTAATTCGACTTCCATTGCCCTAGGAAAGAGCCTGTTTTGAAGGCGGGCCCAAGGAGTGCCGAC
AGCAGTCTCCTCCCTCCACCTTCTCCTCATTCTCTCCCAGCTTGCTGAGCCCTTTGCTCCCCTGGCGACTGC
CTGGACAGTCAGCAAGGAATTGTCTCCAGTGCATTTGCCCTCCTGGCTGCCAACTCTGGCTGCTAAAGCG
GCTGCCACCTGCTGCAGTCTACACAGCTTCGGAAGAGGAAAGGAAC

C: Región -607 del gen de IL-18

Referencia: V. Giedraitis et al. Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation Journal of Neuroimmunology. 2001; (112):146–152.