



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN

TESIS

“ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO DE LINFOTOXINA ALFA +252 A/G CON RESISTENCIA A LA INSULINA EN SUJETOS CON HISTORIA FAMILIAR DE DIABETES TIPO 2”

Que para obtener el grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN

Presenta:

Rubiceli Hernández Peña

Directoras de Tesis:

D. C. Irma Zamora Ginez

D. C. Blanca Guadalupe Baez Duarte

Director de Tesis Externo:

D. C. Francisco Mendoza Carrera

D. C. Irma del Carmen Zamora Ginez

D. C. Blanca Guadalupe Baez Duarte

D. C. Francisco Mendoza Carrera

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis de maestría es un gran paso en el camino de mi crecimiento no solo profesional, sino personal. Ha requerido de arduo trabajo, esfuerzo, dedicación y constancia, de superar adversidades de distintas índoles que se fueron presentando en el camino, de la ayuda y participación de un gran equipo de trabajo, incluyendo a mis asesores de tesis y a mí misma, que sin el apoyo o aporte de cada uno de ellos, el resultado final no hubiera sido posible. Por eso quiero agradecer con toda sinceridad y afecto a las siguientes personas.

Primero que nada, quiero dar gracias a Dios, porque nunca me ha dejado en los momentos que más lo he necesitado, por darme fuerzas para continuar, por llenar mi corazón de fe y esperanza. Por poner en mi camino a todas aquellas personas que se han ganado mi confianza, afecto y gratitud, y que de una u otra manera me han reconfortado, han sido de gran apoyo y parte de esta gran aventura.

Gracias a mis padres, Margarita y Leoncio, que han sido un gran soporte en todos los aspectos, se han preocupado por mi bienestar, siempre han estado conmigo en mis alegrías y logros y sobre todo porque siempre me han apoyado en los momentos más difíciles, han sabido orientarme. Gracias por su dedicación, su amor, su apoyo y sus consejos. Los amo.

Gracias también a mis hermanas, Fabiola y Sofía, que me han impulsado a seguir adelante, gracias por sus consejos y su amor.

Mi más sincero y profundo agradecimiento a mis directores de tesis, D.C. Irma Zamora Ginez, D.C. Blanca Baez Duarte y D.C. Francisco Mendoza Carrera, por la oportunidad de trabajar junto a ustedes, por transmitirme sus conocimientos, por su apoyo, respaldo y soporte en cada una de las etapas de este trabajo de investigación, a pesar de las adversidades presentadas. Por la paciencia, dedicación y ánimo brindados en la realización de este proyecto, son un gran ejemplo para mí.

Agradezco a Luis Hernández, amigo y compañero del CIBO-IMSS, por su paciencia, dedicación y enseñanza en la parte del laboratorio para la realización de la parte genética de este trabajo, a Erika Gómez, por su apoyo y amistad. A mi

amigo, Daniel Pérez, que me impulsó a entrar a la maestría, por su sinceridad, sus consejos y su apoyo.

A mis profesores, gracias por su enseñanza y compartir sus experiencias. A mis compañeros de la maestría, y amigos, Dan Peralta, por su apoyo incondicional, su amistad sincera, sus consejos y paciencia; Rosario Sánchez y José Antonio Alameda por su amistad y consejos.

Gracias a todos los que integran el equipo de investigación a cargo de las Dras. Irma Zamora y Blanca Baez, ya que contribuyeron de alguna manera en la realización de esta tesis, especialmente a Valeria Flores, Jessica Ríos y Mariana Juárez, gracias por su amistad sincera y su gran apoyo.

Agradezco la colaboración del Dr. Rosendo Briones Rojas, Director del HUP; Dr. Arturo Árcega Domínguez, Coordinador de Investigación del HUP; M.C. María Susana Pérez Fernández, Jefa del Laboratorio de Análisis Clínicos del HUP; Q.F.B. Julia González Ortega; Q.F.B. Gisela Ariza Gallardo; así como al personal que labora en el Laboratorio de Análisis Clínicos del HUP, todos pertenecientes a la BUAP.

Gracias al Centro de Investigación Biomédica de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social; al D.C. José Sánchez Corona, Director del CIBO-IMSS, a la D.C. Silvia Esperanza Flores Martínez, Jefa de la División de Medicina Molecular; al D.C. Francisco Mendoza Carrera un agradecimiento especial por aceptar una estancia en dicho Centro de Investigación, por sus enseñanzas y paciencia; así como al personal que labora en la División de Medicina Molecular del CIBO-IMSS.

Gracias a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la BUAP, por los recursos otorgados para la realización de este trabajo, por el apoyo del costo de los vuelos de ida y vuelta de la Ciudad de México a Guadalajara y viceversa cuando realicé mi estancia.

Agradezco enormemente a CONACyT por su apoyo brindado para la realización de este proyecto, por la beca otorgada en el periodo comprendido de Agosto de 2015 a Julio de 2017 y por extender mi beca para la realización de una estancia en el CIBO-IMSS de Guadalajara, Jalisco, México.

DEDICATORIA

ESTE TRABAJO DE TESIS LO DEDICO A LAS PERSONAS MÁS IMPORTANTES EN MI VIDA,
MAMÁ, PAPÁ Y HERMANAS, A QUIENES AMO CON TODO MI CORAZÓN.

RESUMEN

Antecedentes: La historia familiar de diabetes tipo 2 (HFDT2) se ha estudiado como factor de riesgo para el desarrollo de diversas alteraciones metabólicas, como las alteraciones relacionadas con la insulina, entre las que se encuentra la resistencia a la insulina (RI). En la fisiopatogenia de la RI se ha descrito la asociación de la obesidad con un estado inflamatorio crónico a nivel sistémico que se encuentra reflejado por la elevación persistente de diversas citocinas proinflamatorias, las cuales alteran la vía de señalización de la insulina. La linfotoxina alfa (LTA) es una citocina proinflamatoria que se ha asociado con alteraciones metabólicas, así como algunas variaciones en el gen que la codifica. Existe un estudio en población japonesa que reportó que el polimorfismo de *LTA* +252 A/G disminuye la RI. Sin embargo, existe evidencia que indica que la variabilidad genética y su asociación con alguna patología dependen del tipo de población. Considerando la importancia de la RI como base para desarrollar DT2 y otras enfermedades, y la existencia de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) del gen de *LTA* que pueden modificar la expresión de ésta y su función, es importante estudiarlos para sentar las bases del tipo de asociación en población mexicana.

Objetivo general: Determinar la asociación del polimorfismo de *LTA* +252 A/G con RI en sujetos con HFDT2.

Material y método: Se realizó un estudio comparativo, observacional, transversal, prolectivo y homodémico. La muestra estuvo conformada por el personal académico y administrativo de las Facultades de Arquitectura, Contaduría y el Instituto de Ciencias Sociales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), que cumplieron con los criterios de selección y que aceptaron participar en el estudio. El proyecto de investigación se dividió en las siguientes etapas: 1) Explicación detallada del proyecto a todos los candidatos a participar y firma de consentimiento informado. 2) Realización de historia clínico-antropométrica. 3) Recolección de muestra sanguínea para la determinación de hemoglobina glucosilada (HbA1c), glucosa e insulina de ayuno y prueba de

tolerancia oral a la glucosa (PTOG). Se determinó la RI mediante el índice del modelo homeostático de evaluación de RI (HOMA-IR, por sus siglas en inglés) por medio de la calculadora HOMA2-IR. 4) Conformación de los grupos, control (sujetos de investigación sin RI) y de estudio (sujetos de investigación con RI), de acuerdo con los criterios de selección. 5) Realización del análisis genético para determinar el nucleótido presente (alelo A o G) en la posición +252 del gen de *LTA*, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) específica de alelo. 6) Análisis estadístico.

Resultados: Se encontró una prevalencia de HFDT2 de 46.5%, de éstos el 85.4% de los sujetos de estudio no presentaron RI y el 14.6% si la presentaron. El 60.4% de la muestra estuvo conformada por mujeres y el 39.6% por hombres. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos de estudio en las variables peso, glucosa, insulina, índice de masa corporal (IMC) y PTOG. El genotipo encontrado con mayor frecuencia es el AG en ambos grupos de estudio; sin embargo, no se encontró diferencia significativa ($p=0.111$). El alelo que se presentó con mayor frecuencia en el grupo con HFDT2 sin RI fue el A (64.6%) y en el grupo con HFDT2 con RI ambos alelos presentaron la misma frecuencia (50.0%), sin presentar diferencia significativa entre ambos grupos de estudio ($p=0.139$). Se encontró una diferencia significativa entre los grupos de estudio al comparar el genotipo mayor (AA) con respecto de los genotipos heterocigoto (AG) y menor (GG), ($p=0.044$). Se estableció una asociación entre los genotipos AG+GG (modelo dominante) y RI en los sujetos con HFDT2 sólo cuando se ajustó a sobrepeso/obesidad ($IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$), ($p=0.048$).

Conclusiones: El alelo *LTA* +252G (AG+GG) se asocia con RI en sujetos con HFDT2 sólo si está presente sobrepeso/obesidad ($IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$), por lo que podemos sugerir que éste alelo se comporta como un probable factor de riesgo en nuestra población.

Palabras clave: historia familiar de diabetes tipo 2, resistencia a la insulina, linfotóxina alfa, polimorfismo.

TABLA DE CONTENIDO

Carátula	I
Firma de tutores de tesis	II
Agradecimientos	III-IV
Dedicatoria	V
Resumen	VI-VII
Tabla de contenido	VIII
Índice	IX-XI
Lista de cuadros	XII
Lista de figuras	XIII
Lista de abreviaturas	XIV

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1	Antecedentes generales	1
1.1.1	Historia familiar de diabetes tipo 2	1
1.1.2	Resistencia a la insulina	2
1.1.3	Linfotoxina alfa	6
1.1.4	Polimorfismo genético de linfotoxina alfa	7
1.2	Antecedentes específicos	10

CAPÍTULO 2. MARCO METODOLÓGICO

2.1	Justificación	13
2.2	Planteamiento del problema	14
2.3	Objetivos	15
2.3.1	Objetivo general	15
2.3.2	Objetivos específicos	15
2.4	Metodología	16
2.4.1	Diseño del estudio	16
2.4.2	Ubicación espacio temporal	16
2.4.3	Marco muestral	16
2.4.4	Criterios de selección de la muestra	17
2.4.5	Definición de las variables y escalas de medición	17
2.4.6	Técnicas y procedimientos	18
	Estrategia de trabajo	18
	Etapa 1. Identificación de la población, información y firma del consentimiento informado	18
	Etapa 2. Caracterización clínica y antropométrica	18
	Etapa 3. Caracterización bioquímica y conformación de los grupos	18
	Etapa 4. Determinación del polimorfismo de linfotoxina alfa +252 A/G	19
	Diagrama de flujo	20

Método de recolección de datos	20
Técnicas	20
2.4.7 Análisis estadístico	21
CAPÍTULO 3. ANÁLISIS DE DATOS	
3.1 Resultados	23
3.2 Discusión	29
3.3 Conclusiones	33
3.4 Perspectivas	34
Referencias bibliográficas	35
Anexos	44
Anexo 1. Definición de las variables y escalas de medición	44
Anexo 2. Carta de consentimiento informado	48
Anexo 3. Formato de captura de datos	51
Anexo 4. Aspectos éticos	53
Anexo 5. Registro del Comité de Ética e Investigación del Hospital Universitario de Puebla	55
Anexo 6. Registro del Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina de la BUAP	56
Anexo 7. Logística	57
Anexo 8. Determinación de glucosa sanguínea	58
Anexo 9. Determinación de insulina sanguínea	59
Anexo 10. Determinación de prueba tolerancia oral a la glucosa	60
Anexo 11. Determinación de hemoglobina glucosilada	61
Anexo 12. Evaluación de resistencia a la insulina	62
Anexo 13. Determinación del polimorfismo de linfotoxina alfa +252 A/G	63
13.1 Extracción y purificación de ADN	63
13.2 Cuantificación y determinación de la pureza del ADN	64
13.3 Determinación de la integridad del ADN	65
13.4 Amplificación de regiones génicas específicas mediante PCR	66
13.5 Electroforesis de los productos de PCR	68

13.6 Tinción con nitrato de plata	69
13.7 Identificación alélica en los geles de poliacrilamida	70

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1. Variables demográficas, antropométricas y bioquímicas
- Cuadro 2. Equilibrio de Hardy-Weinberg del SNP del gen de linfotoxina alfa +252 A/G
- Cuadro 3. Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP del gen de linfotoxina alfa +252 A/G en los grupos de estudio
- Cuadro 4. Análisis de asociación entre el SNP del gen de linfotoxina alfa +252 A/G con resistencia a la insulina
- Cuadro 5. Variable independiente
- Cuadro 6. Variable dependiente
- Cuadro 7. Variable de ajuste
- Cuadro 8. Variables demográficas
- Cuadro 9. Variables antropométricas
- Cuadro 10. Variables bioquímicas
- Cuadro 11. Concentraciones de reactivos para linfotoxina alfa +252 A/G para su amplificación por reacción en cadena de la polimerasa
- Cuadro 12. Ciclos de temperatura para la reacción en cadena de la polimerasa de linfotoxina alfa +252 A/G

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Relación de la historia familiar de diabetes tipo 2 y la resistencia a la insulina y su posible asociación con el SNP de linfotóxina alfa +252 A/G
- Figura 2. Reclutamiento y selección de sujetos
- Figura 3. Gel de poliacrilamida teñido

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
BUAP	Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
c-HDL	Lipoproteína de Alta Densidad
CIBO	Centro de Investigación Biomédica de Occidente
c-LDL	Lipoproteína de Baja Densidad
CPH	Complejo Principal de Histocompatibilidad
DT2	Diabetes Tipo 2
G	Guanina
GLUT4	Transportador de Glucosa Tipo 4
HbA1c	Hemoglobina glucosilada
HFDT2	Historia Familiar de Diabetes Tipo 2
HGH	Hormona del Crecimiento Humana
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
HOMA-IR	Modelo Homeostático de Evaluación de Resistencia a la Insulina
HTA	Hipertensión Arterial
HUP	Hospital Universitario de Puebla
ICAM	Molécula de Adhesión Intercelular
IKK	Inhibidor Kappa-beta Cinasa
IMC	Índice de Masa Corporal
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IRS1	Sustrato del Receptor de Insulina Tipo 1
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
LTA	Linfotoxina Alfa
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
TNFR	Receptor del Factor de Necrosis Tumoral
VCAM	Molécula de Adhesión Celular Vascular
VIEP	Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1 ANTECEDENTES GENERALES

1.1.1 HISTORIA FAMILIAR DE DIABETES TIPO 2

Estudios epidemiológicos en Europa y Latinoamérica demuestran que se ha detectado historia familiar de diabetes tipo 2 (HFDT2) en sujetos con diabetes tipo 2 (DT2).(1–3) La asociación entre estas variables es fuerte y se ha reportado que entre los indios Pima menores de 25 años de edad, la DT2 se presenta exclusivamente en individuos con al menos un familiar diabético.(1) También se ha demostrado que aquellos sujetos con HFDT2 son más susceptibles a padecer DT2 comparados con sujetos sin HFDT2.(4) Además, la HFDT2 se asocia con DT2 independientemente del familiar afectado (ambos padres, madre, padre u otro familiar en primer grado).(3) Asimismo, los sujetos con HFDT2 tienden a ser diagnosticados con DT2 a una edad más temprana, comparados con aquellos sujetos sin HFDT2 (5); indicando que la HFDT2 quizá conduzca a una ocurrencia de la enfermedad sugiriendo una influencia genética.

La prevalencia de HFDT2 depende del tipo de población estudiada, en población china alcanza el 26.9% (3), en población coreana el 23.7% (6), en población mexicana el 59% (7) y en población mexicana-americana hasta el 80%.(2)

La HFDT2 se ha asociado con un incremento en el riesgo de padecer desórdenes metabólicos, tales como alteraciones en la glucosa, síndrome metabólico (SM) y alteraciones en la insulina.(6) La insulinemia de ayuno se encuentra mayormente incrementada en aquellos sujetos con HFDT2 en comparación con sujetos sin HFDT2, además también está asociada con una disminución de la sensibilidad a la insulina y con trastornos del equilibrio entre la sensibilidad a la insulina y la secreción de ésta.(8,9)

Un estudio realizado por Zamora-Ginez y col.(7) en 2012 en población mexicana reportó que los sujetos con HFDT2 en primer grado (padre, madre, hermanos y/o hijos) tienen un incremento de los niveles de insulina en ayuno, una disminución de la sensibilidad a la insulina y mayor prevalencia de obesidad y prediabetes en comparación con sujetos controles.

Igualmente se ha reportado que la HFDT2 es un factor de riesgo para desarrollar resistencia a la insulina (RI) (2,6), además de manifestar una disminución de la sensibilidad a esta hormona en un 25% en comparación con individuos sin HFDT2.(2) Estos datos demuestran la importancia de la HFDT2 en los desórdenes relacionados con la insulina.

1.1.2 RESISTENCIA A LA INSULINA

DEFINICIÓN

La RI se define como la incapacidad genética o adquirida de los tejidos diana de responder normalmente a la acción de la hormona insulina.(10) En un estado de RI, la acción de esta hormona está reducida a nivel celular, lo que estimula al páncreas para aumentar su secreción. Esto permite compensar el defecto en la acción tisular y así mantener la homeostasis glucémica. Este fenómeno da cuenta del estado hiperinsulinémico, el cual es característico en sujetos con RI, particularmente después de una comida alta en carbohidratos.(11)

La insulina es una hormona proteica secretada por las células beta del páncreas en respuesta a diversos estímulos, siendo el incremento de glucosa plasmática el más relevante. Su principal función es mantener la homeostasis glucémica y la de otros sustratos energéticos.(12)

La RI se considera como un tronco común fisiopatológico de algunas enfermedades; y asociada a factores de susceptibilidad genética puede condicionar

a una serie de alteraciones clínicas como hipertensión arterial (HTA), intolerancia a la glucosa que, en última instancia deriva en DT2, obesidad central, arterioesclerosis como consecuencia de la disminución del colesterol de alta densidad (c-HDL), la elevación del colesterol de baja densidad (c-LDL) y de los triglicéridos, además de estar presente en individuos intolerantes a la glucosa o incluso en el 25% de sujetos delgados, aparentemente sanos, con tolerancia normal a la glucosa.(13,14)

La RI y la disfunción de la secreción de insulina por las células beta del páncreas son defectos fundamentales que se observan en la DT2.(8) La DT2 es una enfermedad metabólica compleja que se caracteriza por una hiperglucemia resultante de una inadecuada actividad de la insulina, que se desencadena cuando la secreción de insulina por parte de las células beta del páncreas no puede compensar la resistencia a la misma en los tejidos periféricos. Esta hiperinsulinemia crónica contribuye gradualmente al fracaso de la célula beta pancreática, provocando alteraciones en la glucosa hasta desencadenar DT2.(15)

Se ha demostrado que la RI, evaluada mediante el índice del modelo homeostático de evaluación de RI (HOMA-IR, por sus siglas en inglés), se asocia con un elevado índice de masa corporal (IMC) y obesidad abdominal.(16)

Por su simplicidad y buena correlación con mediciones más complejas de sensibilidad a la insulina, así como bajo costo, el método validado más utilizado para medir RI es el cálculo del índice HOMA-IR, que toma en cuenta la glucosa e insulina de ayuno.(17) El modelo fue actualizado con algunos ajustes fisiológicos para una versión en computadora, HOMA2-IR, que proporciona un índice más preciso porque modela la relación de retroalimentación entre la insulina y la glucosa en los diversos órganos del cuerpo.(18) El punto de corte para definir RI es étnico-dependiente (16,19); en nuestra población definimos RI con un índice HOMA2-IR > 2.0 de acuerdo a un estudio previo realizado por Zamora-Ginez y col.(20)

FACTORES PATOGENICOS DE RESISTENCIA A LA INSULINA

La RI está comúnmente asociada a desórdenes del metabolismo lipídico que incluye la acumulación tisular ectópica de lípidos, entre ellos en el músculo esquelético. Esta relación no es sólo asociativa, sino que existe evidencia concluyente, tanto en animales como en humanos, de que los lípidos pueden inducir RI. Este hecho se comprobó al realizar una infusión endovenosa de una emulsión lipídica o administrar una dieta hipercalórica e hipergrasa en individuos sanos, y se observó que se induce RI en el lapso de algunas horas (infusión) a días (dieta).(21,22)

Los ácidos grasos libres circulantes constituyen un estímulo proinflamatorio, dada su capacidad de unirse a receptores de membrana como los receptores tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés). La activación del TLR activa factores de transcripción inflamatorios con la subsecuente liberación de citocinas proinflamatorias.(23)

En los sujetos obesos la producción de ácidos grasos libres aumenta, esto origina que disminuya la utilización de glucosa como fuente primaria de energía provocando disminución en su captación periférica lo que condiciona RI e hiperinsulinismo secundario. El hiperinsulinismo crónico disminuye el número de receptores de insulina en los órganos diana.(13)

La inflamación es uno de los mecanismos fisiopatológicos por los cuales se puede condicionar RI, ya que se ha reportado una correlación entre los factores inflamatorios con el índice HOMA-IR y con el IMC. La obesidad ha sido asociada a un estado inflamatorio crónico leve a moderado, que se manifiesta a nivel sistémico por un aumento de los factores inflamatorios y leucocitos circulantes.(24)

A nivel tisular y particularmente en el tejido adiposo, se ha observado una infiltración de células inmunes. A nivel molecular, diversos tipos celulares (adipocitos, células endoteliales, leucocitos, células hepáticas, células beta

pancreáticas, neuronas, entre otras) manifiestan una mayor unión de factores de transcripción proinflamatorios a elementos de respuesta nuclear. En condiciones proinflamatorias, los mediadores inflamatorios se unen a sus receptores en las membranas celulares, lo que desencadena la migración de factores de transcripción desde el citosol al núcleo celular para la síntesis de nuevos mediadores inflamatorios.(25,26)

En estado basal, los factores de transcripción están inactivos en el citosol, unidos a sus respectivos inhibidores, lo que les impide migrar al núcleo. En respuesta a una señal externa proinflamatoria, por ejemplo, del factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés) alfa, se producen proteínas como la inhibidor kappa beta cinasa (IKK, por sus siglas en inglés), que inducen la degradación de los inhibidores dejando migrar a los factores de transcripción hacia el núcleo celular, transmitiendo la señal inflamatoria. La proteína IKK también fosforila al sustrato del receptor de insulina 1 (IRS1, por sus siglas en inglés), si éste se fosforila en su residuo serina existe una inhibición de la transducción de la señal insulínica, determinando una menor translocación del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) desde el citosol hasta la membrana celular, lo que disminuye la captación de la glucosa sanguínea. Como respuesta compensatoria, ocurre una hipersecreción de insulina, lo cual explica la típica hiperinsulinemia de los individuos con RI. De esta manera, una célula expuesta a un entorno inflamatorio es una célula resistente a insulina.(25,26)

La RI parece estar asociada con el incremento de niveles plasmáticos de citocinas proinflamatorias como interleucina 1, interleucina 6 y el TNF alfa, entre otras.(14) La linfotóxina alfa (LTA) se ha asociado con inflamación crónica y se sugiere que puede estar involucrada en la inducción de insulinitis y en el desarrollo de RI.(27)

1.1.3 LINFOTOXINA ALFA

DESCRIPCIÓN GENERAL

La LTA, también conocida como TNF beta, es una citocina proinflamatoria que pertenece a la familia del TNF y cumplen funciones críticas importantes en las respuestas inflamatoria e inmunológica, proliferación, citodiferenciación y apoptosis.(28) A diferencia del TNF alfa, la LTA es producida principalmente por células T activadas y no por macrófagos (29), aunque también puede ser secretada por células B y células Natural Killer.(27,30)

FUNCIONES DE LINFOTOXINA ALFA

La LTA tiene muchas actividades, en general similares, pero no idénticas, a las del TNF alfa, incluyendo necrosis tumoral, inducción de un estado antivírico, activación de leucocitos polimorfonucleares, inducción de antígenos del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) de clase I en células endoteliales, inducción de moléculas de adhesión en el endotelio y estimulación de la hormona de crecimiento.(29) También es esencial para el desarrollo de los órganos linfoides, la organización y el mantenimiento de microambientes linfoides.(30)

RECEPTOR Y VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LINFOTOXINA ALFA

La LTA es un homotrímero soluble que se une y activa vías de señalización intracelular a través del receptor del TNF (TNFR, por sus siglas en inglés) tipos 1 y 2, para ejercer sus actividades biológicas. El mecanismo por el cual la LTA promueve la inflamación está pobremente comprendido. Una de las teorías es que la LTA induce moléculas de adhesión intercelular (ICAM, por sus siglas en inglés) en células endoteliales así como moléculas de adhesión celular vascular (VCAM, por sus siglas en inglés). Otra teoría es que la LTA puede contribuir a la inflamación por la inducción de otras citocinas proinflamatorias y favorecer la expresión de RANTES, que es una quimiocina de regulación por activación, expresada y secretada por los linfocitos T.(30)

Se ha sugerido que la LTA participa en el desarrollo de trastornos relacionados con la insulina.(27) La producción de LTA se encuentra bajo control genético y su nivel de expresión ha sido correlacionada con polimorfismos del gen que codifica a esta proteína.(31,32)

1.1.4 POLIMORFISMO GENÉTICO DE LINFOTOXINA ALFA

DESCRIPCIÓN GENERAL

El polimorfismo genético se define por la existencia de varios alelos (formas diferentes de un mismo gen) en la población.(33) Un polimorfismo genético es considerado como tal cuando la frecuencia de uno de sus alelos en la población es superior al 1%.(34)

Existen diferentes tipos de polimorfismos genéticos, uno de los más frecuentes es el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés), del cual existen aproximadamente 10 millones en todo el genoma humano. La mayoría de los SNP's tienen dos alelos, los cuales están representados por una sustitución de una base por otra. En las poblaciones, este tipo de alelos se clasifican en alelo mayor (el alelo más común) y en alelo menor (el alelo menos común).(34)

La variabilidad fenotípica de cada individuo, así como la susceptibilidad o la resistencia individual a distintas enfermedades radica principalmente en los SNP's y en menor grado a inserciones, deleciones, secuencias repetidas y/o rearrreglos cromosómicos.(34)

En el humano, el gen que codifica para LTA se encuentra localizado dentro de la región del antígeno leucocitario humano (HLA, por sus siglas en inglés), en el cromosoma 6, posición 6p21.3, cerca de la región que codifica para el TNF alfa, ambos genes están incluidos en el locus denominado TNF.(35)

Las variaciones genéticas en el locus TNF son escasas y han sido altamente conservadas en la evolución. Sin embargo, se han reportado varios SNP's en el gen *LTA*, específicamente en la posición +252.(36) La presencia de Guanina (G) en esta posición, se denomina TNFB1 y ha sido relacionada con una mayor síntesis de LTA, mientras que la variante alélica con Adenina (A) se denomina TNFB2 y se ha relacionado con mayor síntesis de TNF alfa.(36,37)

Se ha reportado otro polimorfismo tipo SNP en este gen, pero en la posición +80; este SNP ha sido relacionado con sepsis (36), infarto agudo al miocardio, asma, cáncer, malaria y enfermedades autoinmunes, más no se ha asociado con enfermedades metabólicas.(38)

Se ha sugerido también que el polimorfismo de *LTA* +252 A/G puede estar involucrado en el desarrollo de alteraciones metabólicas, como el incremento de glucemia de ayuno y alteraciones de parámetros lipídicos (31), por lo que es necesario conocer su asociación con RI en sujetos con HFDT2.

POLIMORFISMO DE LINFOTOXINA ALFA +252 A/G Y DIFERENTES ENFERMEDADES

Un estudio realizado en población caucásica y afroamericana, en el cual participaron 854 pacientes con sepsis severa pareados con sujetos sin infección con similar edad, sexo y raza, reportó que el alelo *LTA* +252G se asoció con una mayor ocurrencia de sepsis y su mortalidad, además de que ésta predisposición podría ser modulada por el sexo y la edad, ya que se presentó principalmente en hombres mayores de 60 años.(39)

Un estudio llevado a cabo en población escandinava que incluyó a 527 pacientes con síndrome de Sjögren y 532 sujetos sanos, reportó que el SNP *LTA* +252, variante alélica G, es un fuerte indicador para desarrollar este síndrome.(40)

Por otro lado, se realizó un meta-análisis sobre la asociación del polimorfismo de *LTA* +252 A/G con lupus eritematoso sistémico (LES) y artritis reumatoide. Los

autores recolectaron 19 estudios, de los cuales hubo 13 sobre LES con 1346 pacientes con la enfermedad y 1951 controles y 6 estudios sobre artritis reumatoide con 1079 pacientes y 1057 controles. Solo se reportó una asociación de la variante alélica A del SNP de *LTA* +252 y LES en la población asiática. En los estudios de artritis reumatoide no se encontró asociación significativa.(41)

Un meta-análisis realizado con 13 trabajos, con un total de 1396 pacientes con sarcoidosis y 2344 pacientes aparentemente sanos, encontró una asociación entre el alelo *LTA* +252G y la enfermedad en población europea en comparación con población asiática.(42)

Un estudio realizado en población adulta china comparó una muestra de 292 pacientes con asma y 292 sujetos aparentemente sanos. Aunque no se encontró asociación del SPN de *LTA* +252 A/G con el riesgo de padecer asma de forma general, en la estratificación que se realizó, el grupo de pacientes asmáticos con atopia resultó asociado con el genotipo AG.(43)

Un meta-análisis que incluyó a 36 publicaciones que involucraron a 35 677 sujetos participantes, de los cuales 13 817 fueron sujetos con cáncer y 21 860 fueron sujetos aparentemente sanos, encontró una asociación entre el alelo *LTA* +252G y el riesgo de desarrollar cáncer, específicamente entre la presencia del polimorfismo y el adenocarcinoma; así como para desarrollar malignidad hematológica. En cuanto al riesgo de padecer cáncer, de acuerdo a la población estudiada, se encontró mayor susceptibilidad genética en las poblaciones asiáticas, europeas y norteamericanas, en comparación con las australianas y sudamericanas.(44)

Un estudio realizado en población húngara ha sugerido que la variante alélica G del SNP de *LTA* +252 es un factor de riesgo para el desarrollo de ataques isquémicos de los grandes vasos y del corazón. Se estudiaron a 353 pacientes con ataque isquémico y a 180 pacientes aparentemente sanos.(45)

1.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

POLIMORFISMO DE LINFOTOXINA ALFA +252 A/G Y ALTERACIONES METABÓLICAS

Hasta nuestro conocimiento, solo se ha reportado un estudio sobre la asociación del SNP del gen de *LTA* +252 A/G con RI (46) y ningún estudio ha evaluado esta asociación en sujetos con HFDT2.

El estudio mencionado se llevó a cabo en una población japonesa integrada por 211 hombres aparentemente sanos. La frecuencia del alelo *LTA* +252G en esta población fue de 0.41; la RI se determinó mediante el índice HOMA-IR. Los autores concluyeron que este alelo no se asocia con RI, sino con menor predisposición a ésta.(46)

Asimismo, existe evidencia de la asociación del SNP del gen de *LTA* +252 A/G con alteraciones metabólicas. Un estudio realizado en 113 sujetos caucásicos aparentemente sanos, a los cuales se les realizó una prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG), fueron clasificados en sujetos con tolerancia normal ($n=62$), sujetos con intolerancia ($n=41$) y sujetos con DT2 ($n=10$). Se reportó una asociación del alelo *LTA* +252G con el incremento de los valores de glucosa en ayuno y c-LDL en sujetos sanos con tolerancia normal a la glucosa, sugiriendo que este polimorfismo está involucrado en la regulación de la glucosa y la homeostasis lipídica.(31)

Por otro lado, en población mexicana en el año 2013, García-Elorriaga y col. llevaron a cabo un estudio de asociación del SNP del gen de *LTA* +252 A/G con DT2, donde participaron 48 sujetos sanos y 51 sujetos con DT2; sin embargo, no observaron una asociación significativa, por lo que los autores sugirieron ampliar el tamaño de la muestra para poder estudiar la asociación entre el polimorfismo y DT2, así como con RI e inflamación.(47)

Basados en esta evidencia de la asociación entre la HFDT2 y la RI en población mexicana, con la consecuente elevación de citocinas proinflamatorias, esta asociación podría verse influenciada por la presencia del SNP en la posición +252 A/G del gen de *LTA* (Figura 1).

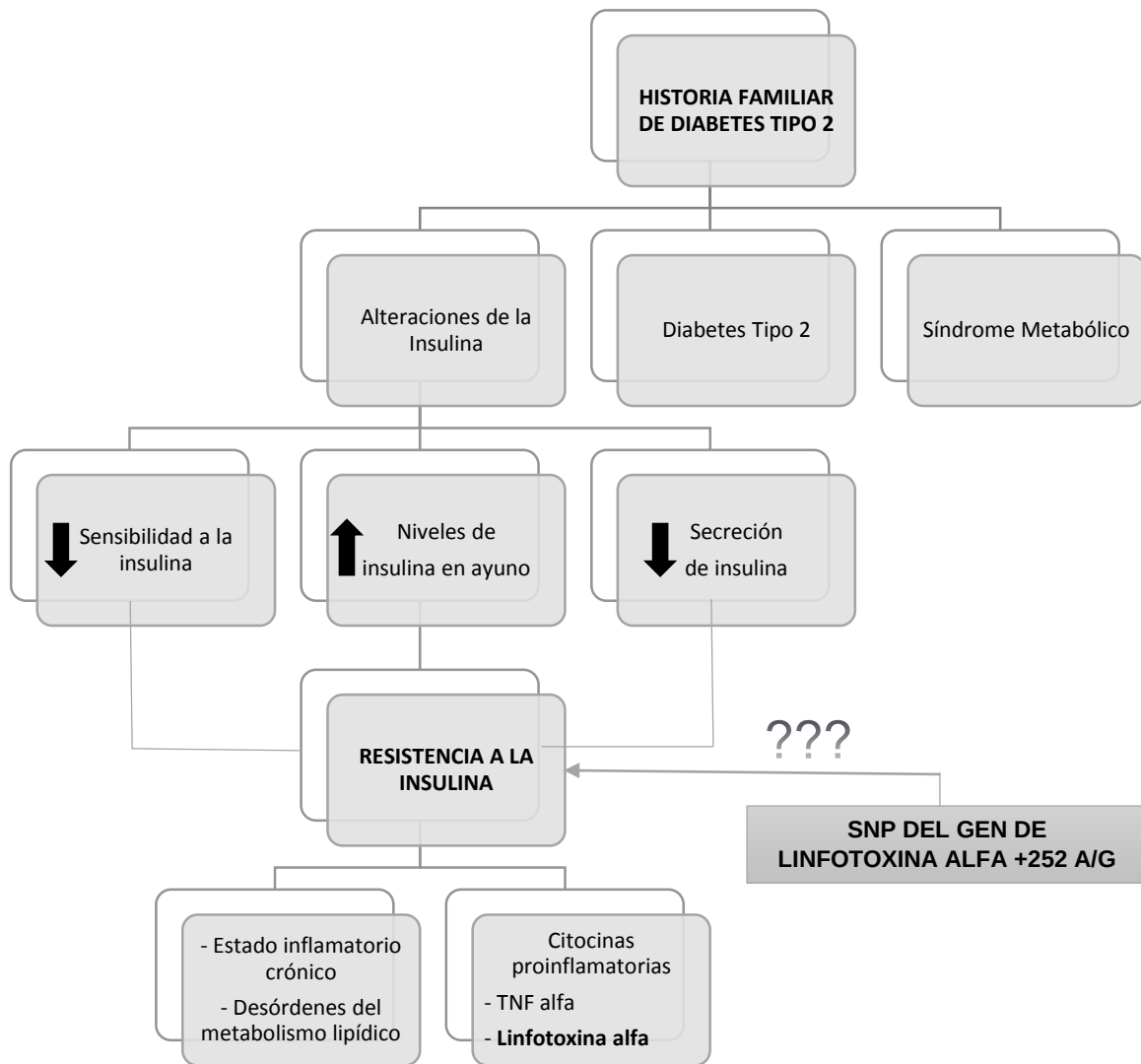


Figura 1. Relación de la historia familiar de diabetes tipo 2 y la resistencia a la insulina y su posible asociación con el SNP de linfotoxina alfa +252 A/G.

TNF: Factor de Necrosis Tumoral. SNP: Polimorfismo de un Solo Nucleótido.

CAPÍTULO 2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 JUSTIFICACIÓN

De acuerdo a la literatura, no se ha reportado a nivel genético que los sujetos con HFDT2 tengan una susceptibilidad mayor a presentar RI. Ésta es un factor de riesgo para desarrollar enfermedades con bases inflamatorias como obesidad, HTA y DT2, entre otras.

El estudio sobre la determinación de la asociación del polimorfismo de *LTA* +252 A/G es importante por diversas razones. La primera es que los resultados obtenidos aportarán un conocimiento sobre la variabilidad en la población mexicana para este polimorfismo. La segunda es que se determinará la asociación entre la RI en sujetos con HFDT2 y el polimorfismo de *LTA* +252 A/G. La tercera es que se podrán tomar acciones específicas de prevención y/o modificar patrones de conducta dañinos para la salud.

Por todo lo anterior, es necesario enfatizar en la necesidad de realizar estudios sobre los factores que puedan potenciar y/o atenuar la aparición de la RI, y no sólo eso, sino conocer la probable susceptibilidad genética que cada individuo posee para desarrollar o no este tipo de patologías y así poder modificar patrones de conducta de forma temprana y específica; lo que traerá como consecuencia menores daños a la salud pública y una disminución en los costos.

2.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio de la participación de la variación genética en la predisposición de diversas enfermedades con bases hereditarias ha cobrado nuevas dimensiones en la era genómica. Uno de los factores predisponentes más importantes para padecer DT2 es la RI, de la cual se tiene evidencia que sugiere un componente hereditario, aunque no definido aún. En la fisiopatogenia de la RI se ha descrito la asociación de la obesidad con un estado inflamatorio crónico a nivel sistémico que se encuentra reflejado por la elevación persistente de diversas citocinas proinflamatorias, las cuales alteran la vía de señalización de la insulina.

Una de las familias de citocinas proinflamatorias más importantes es la del TNF, que incluye a la LTA. El gen que codifica a esta proteína se ha identificado de forma amplia y se ha asociado con diversas enfermedades con bases inflamatorias e inmunológicas. Sin embargo, existen controversias en cuanto al tipo de asociación que se presenta con las diversas enfermedades, debido a que una gran variedad de estudios poblacionales señalan que, a pesar de que la citocina tiene funciones específicas y que su elevación correlaciona con algunas patologías, sus polimorfismos genéticos no se relacionan con éstas de manera concluyente. Además, existe evidencia contundente que indica que la variabilidad genética y su asociación con alguna patología dependen del tipo de población estudiada.

Considerando la importancia de la RI como base para desarrollar DT2 y otro tipo de enfermedades, y la existencia del SNP +252 A/G en el gen de *LTA* que puede modificar su expresión y función, el presente estudio aborda la siguiente pregunta:

¿Existe asociación entre el polimorfismo de *LTA* +252 A/G con RI en sujetos con HFDT2?

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la asociación del polimorfismo de *LTA* +252 A/G con RI en sujetos con HFDT2.

2.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la RI en los sujetos de estudio.
2. Identificar el SNP +252 A/G del gen de *LTA* en los sujetos de investigación mediante PCR específica de alelo.
3. Establecer el equilibrio Hardy-Weinberg en el grupo de estudio y la población general.
4. Determinar y comparar las frecuencias genotípicas y alélicas en los grupos de estudio.
5. Determinar la asociación del polimorfismo con el estado de RI.

2.4 METODOLOGÍA

2.4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Se diseñó un estudio comparativo, observacional, transversal, prolectivo y homodémico.

2.4.2 UBICACIÓN ESPACIO TEMPORAL

El estudio se llevó a cabo en la Facultad de Medicina y en el Hospital Universitario de Puebla (HUP), ambos pertenecientes a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP); y en la División de Medicina Molecular del Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) de Guadalajara, Jalisco, México; en el periodo comprendido entre agosto de 2015 y julio de 2017.

2.4.3 MARCO MUESTRAL

La población de estudio estuvo conformada por el personal académico y administrativo de la BUAP que eran derechohabientes del HUP.

Se realizó una invitación para participar en el estudio a todo el personal académico y administrativo de las Facultades de Arquitectura, Contaduría e Instituto de Ciencias Sociales de la BUAP y se seleccionaron a todos aquellos sujetos que reunieron los criterios de selección.

El muestreo es no probabilístico y el tamaño de la muestra es por conveniencia.

2.4.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LA MUESTRA

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- ✧ Sujetos que aceptaron participar voluntariamente en el estudio y firmaron el consentimiento informado.
- ✧ Ambos sexos.
- ✧ Edad de 18 años o más.
- ✧ Sujetos con familiares en primer grado de DT2 (madre, padre, hermanos y/o hijos).

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- ✧ Mujeres embarazadas o lactando.
- ✧ Sujetos con diagnóstico previo de enfermedad inflamatoria, enfermedad autoinmune, sepsis, enfermedad crónico degenerativa (excepto sobrepeso, obesidad, HTA, dislipidemia), cáncer, enfermedades cardiovasculares.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- ✧ Sujetos con la caracterización clínica, bioquímica, antropométrica y/o genética incompleta.
- ✧ Sujetos que fueron diagnosticados con DT2 durante el proyecto.

2.4.5 DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES Y ESCALAS DE MEDICIÓN

- ✧ **Variable independiente:** polimorfismo de linfotoxina alfa +252 A/G (Anexo 1, Cuadro 5).
- ✧ **Variable dependiente:** resistencia a la insulina (Anexo 1, Cuadro 6).
- ✧ **Variable de ajuste:** sobrepeso/obesidad (Anexo 1, Cuadro 7).
- ✧ **Variables demográficas:** edad, sexo (Anexo 1, Cuadro 8).
- ✧ **Variables antropométricas:** peso, talla, IMC (Anexo 1, Cuadro 9).

- ☞ **Variables bioquímicas:** glucosa e insulina de ayuno, PTOG, hemoglobina glucosilada (HbA1c) (Anexo 1, Cuadro 10).

2.4.6 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

ESTRATEGIA DE TRABAJO

El proyecto se dividió en 4 etapas:

ETAPA 1. IDENTIFICACIÓN DE LA POBLACIÓN, INFORMACIÓN Y FIRMA DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

Se impartió una plática de sensibilización al personal académico y administrativo de las Facultades de Arquitectura, Contaduría e Instituto de Ciencias Sociales de la BUAP, en la cual se les explicó de forma detallada, precisa y concisa en qué consistió el estudio, los objetivos, los beneficios que se esperaban, los riesgos posibles y se resolvió cualquier duda o aclaración que se presentó. Los sujetos que aceptaron voluntariamente participar en el estudio firmaron la Carta de Consentimiento Informado (Anexo 2).

ETAPA 2. CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y ANTROPOMÉTRICA

Caracterización clínica. Se realizó una historia clínica (Anexo 3), mediante la cual se determinó la presencia de por lo menos un familiar con DT2 de primer grado (madre, padre, hermanos y/o hijos).

Caracterización antropométrica. Se determinó el peso y la talla de cada sujeto, para posteriormente calcular el IMC mediante la fórmula:

$$\text{peso (kg)} / \text{talla}^2 \text{ (m)}$$

ETAPA 3. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y CONFORMACIÓN DE LOS GRUPOS

Se determinaron los niveles de glucosa e insulina de ayuno. Además, se estableció la ausencia de diabetes de cada sujeto participante mediante la PTOG y

hemoglobina glucosilada, según técnicas y procedimientos del Laboratorio de Análisis Clínicos del HUP de la BUAP.

Se determinó la presencia de RI mediante el cálculo del índice HOMA-IR que utiliza la siguiente fórmula:

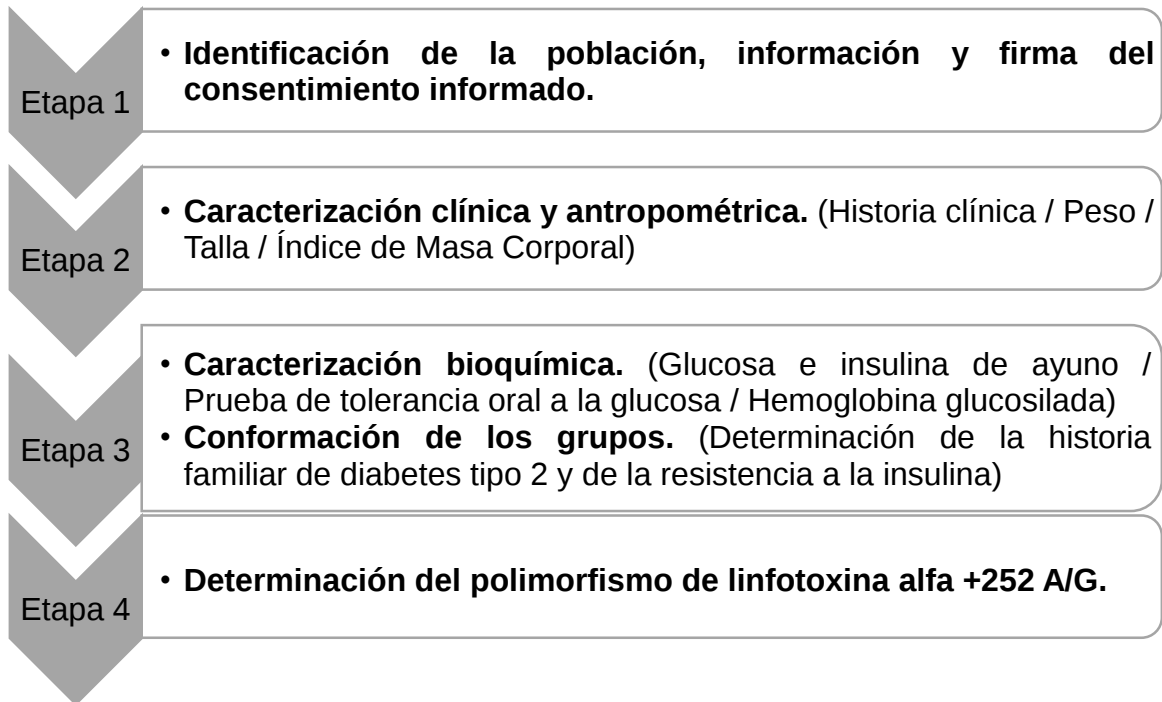
$$\text{HOMA-IR} = \text{glucemia de ayuno (mg/dL)} \times \text{insulinemia basal } (\mu\text{U/mL}) / 405$$
mediante la calculadora HOMA2-IR, para conformar los grupos de estudio, tomando como punto de corte para considerar RI > 2.0.

ETAPA 4. DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO DE LINFOTOXINA ALFA +252 A/G

Con una muestra de sangre extraída a los sujetos de investigación se realizó el análisis genético para determinar el genotipo y los nucleótidos presentes (alelos A o G) en la posición +252 del gen de *LTA*. La determinación de los genotipos se realizó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) específica de alelo, según Perrey y cols. (48), seguida de electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción con nitrato de plata. Finalmente, se compararon las frecuencias genotípicas y alélicas entre los grupos de estudio.

Esta tesis ha sido realizada considerando los principios de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, el Código de Núremberg, la Norma Oficial Mexicana (PROY-NOM-012-SSA3-2007) y la Declaración de Helsinki, ajustándose a dichos principios científicos y éticos (Anexo 4). Asimismo, se anexan los registros por parte del Comité de Investigación y Ética de Investigación en Salud del HUP (Anexo 5), y por parte del Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina de la BUAP (Anexo 6). La parte logística de este trabajo se encuentra especificada en el Anexo 7.

DIAGRAMA DE FLUJO



MÉTODO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

HISTORIA CLÍNICA

Se integró por la ficha de identificación, antecedentes hereditarios de diabetes tipo 2, antecedentes personales patológicos, padecimiento actual y exploración física que incluyó toma de signos vitales y medidas antropométricas (Anexo 3).

TÉCNICAS

CONDICIONES DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO PARA LAS MEDICIONES ANTROPOMÉTRICAS

Los sujetos de estudio se encontraron descalzos y vistiendo una mínima cantidad de ropa para la obtención del peso, la talla y el IMC.

CONDICIONES DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO PARA LA OBTENCIÓN DE SANGRE PERIFÉRICA

Los sujetos de estudio se presentaron a la toma de muestras de sangre con un ayuno de 8 a 12 horas. Sin haber consumido alcohol al menos 24 horas previas al estudio y sin haber fumado antes de la realización del mismo.

OBTENCIÓN DE SANGRE PERIFÉRICA

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción de la vena media cefálica, bajo medidas de asepsia estrictas, en cantidad suficiente para las determinaciones en ayuno de glucosa (Anexo 8), insulina (Anexo 9), PTOG (Anexo 10), hemoglobina glucosilada (Anexo 11), HOMA2-IR (Anexo 12).

- ↪ Muestra de suero para la evaluación bioquímica: la toma de sangre se realizó en tubo seco, se dejó reposar 15-20 minutos y se realizó la extracción de la fracción sérica para realizar las determinaciones bioquímicas.
- ↪ Muestra de sangre total para la extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN): la toma de sangre se realizó en tubo con EDTA para la posterior determinación del polimorfismo de *LTA* +252 A/G (Anexo 13).

2.4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos obtenidos consistió de estadística descriptiva empleando frecuencias absolutas y porcentajes para las variables nominales, y media y desviación estándar para las variables dimensionales.

Se realizaron las pruebas de normalidad para evaluar las distribuciones de las variables dimensionales mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov; se realizó la prueba T de Student para las variables con distribución normal (edad, peso, talla) y la prueba U de Mann-Whitney para las variables con distribución no normal (IMC, glucosa e insulina de ayuno, PTOG, hemoglobina glucosilada).

Se utilizó la prueba de chi cuadrado para realizar la comparación de frecuencias de las variables categóricas (sexo, frecuencias genotípicas, frecuencias alélicas, genotipo mayor).

Por último, se realizó una regresión logística binaria para determinar la asociación del polimorfismo con la RI mediante odds ratio con su respectivo intervalo de confianza, y se efectuó un ajuste con la variable sobrepeso/obesidad.

El análisis estadístico se llevó a cabo con el paquete SPSS versión 21. Todas las pruebas estadísticas se interpretaron con un valor de p significativo ≤ 0.05 .

CAPÍTULO 3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 RESULTADOS

De un total de 310 sujetos que aceptaron participar voluntariamente en el estudio, 144 sujetos (46.5%) reportaron tener HFDT2 en primer grado, de los cuales 96 sujetos (66.6%) cumplieron con los criterios de inclusión. De estos sujetos, 14 (14.6%) fueron diagnosticados con RI y 82 (85.4%) sin RI, (Figura 2).

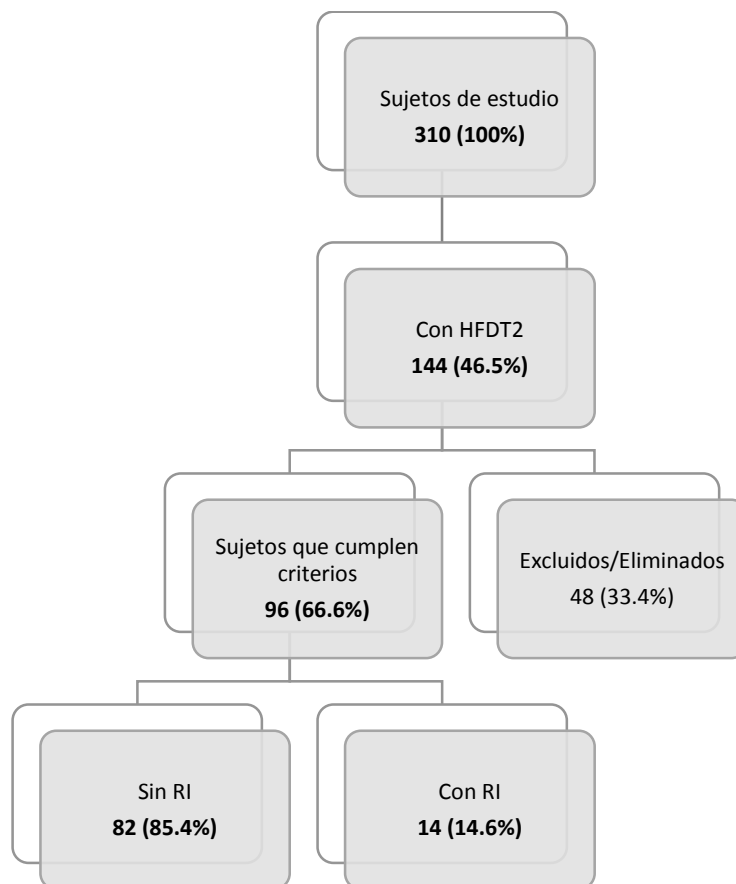


Figura 2. Reclutamiento y selección de sujetos.

HFDT2: Historia Familiar de Diabetes Tipo 2. RI: Resistencia a la Insulina.

La muestra estuvo conformada por 60.4% mujeres y por 39.6% hombres; al dividir a los sujetos por grupo de estudio no se observaron diferencias significativas entre estos en las variables de sexo y edad ($p > 0.05$; Cuadro 1).

Las variables antropométricas (peso e IMC) mostraron diferencias significativas entre los grupos de estudio ($p < 0.01$), siendo el grupo de sujetos con RI el que presentó un valor promedio de IMC correspondiente a obesidad. Con respecto a las variables bioquímicas, el grupo de sujetos con RI presentó valores mayores de glucosa e insulina de ayuno y de PTOG ($p < 0.01$), sin diferencia significativa en los valores de hemoglobina glucosilada ($p > 0.05$) en comparación al grupo de sujetos sin RI (Cuadro 1).

Cuadro 1. Variables demográficas, antropométricas y bioquímicas

	Con HFDT2 (n=96)		p
	Sin RI (n=82)	Con RI (n=14)	
Sexo*			
Mujer	51 (53.1%)	7 (7.3%)	0.388
Hombre	31 (32.3%)	7 (7.3%)	
Edad (años)**	46.65 $\pm$ 10.64	47.29 $\pm$ 10.96	0.837
Peso (kg)**	68.45 $\pm$ 12.71	81.73 $\pm$ 11.97	< 0.001
Talla (m)**	1.59 $\pm$ 0.07	1.61 $\pm$ 0.09	0.493
IMC (kg/m²)***	26.86 $\pm$ 4.08	31.62 $\pm$ 5.27	0.001
Glucosa en ayuno (mg/dL)***	93.10 $\pm$ 7.80	105.00 $\pm$ 8.29	< 0.001
Insulina en ayuno (μU/mL)***	10.74 $\pm$ 8.27	20.91 $\pm$ 7.59	< 0.001
PTOG (mg/dL)***	105.64 $\pm$ 25.21	138.79 $\pm$ 37.74	0.002
Hemoglobina glucosilada (%)***	5.70 $\pm$ 0.31	5.86 $\pm$ 0.34	0.132

HFDT2: Historia Familiar de Diabetes Tipo 2. RI: Resistencia a la Insulina. IMC: Índice de Masa Corporal. PTOG: Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa.

*Chi cuadrada, los datos se expresan en frecuencias absolutas y porcentajes. **T de Student, los datos se expresan en media y desviación estándar. ***U de Mann-Whitney, los datos se expresan en media y desviación estándar. Todos los resultados se interpretaron con un valor de p significativo ≤ 0.05 .

Se realizó la identificación del SNP +252 A/G del gen de *LTA* en los sujetos de investigación mediante PCR específica de alelo. En el gel de poliacrilamida de la figura 3 se muestran ejemplos de las lecturas de los alelos para cada uno de los sujetos de estudio.

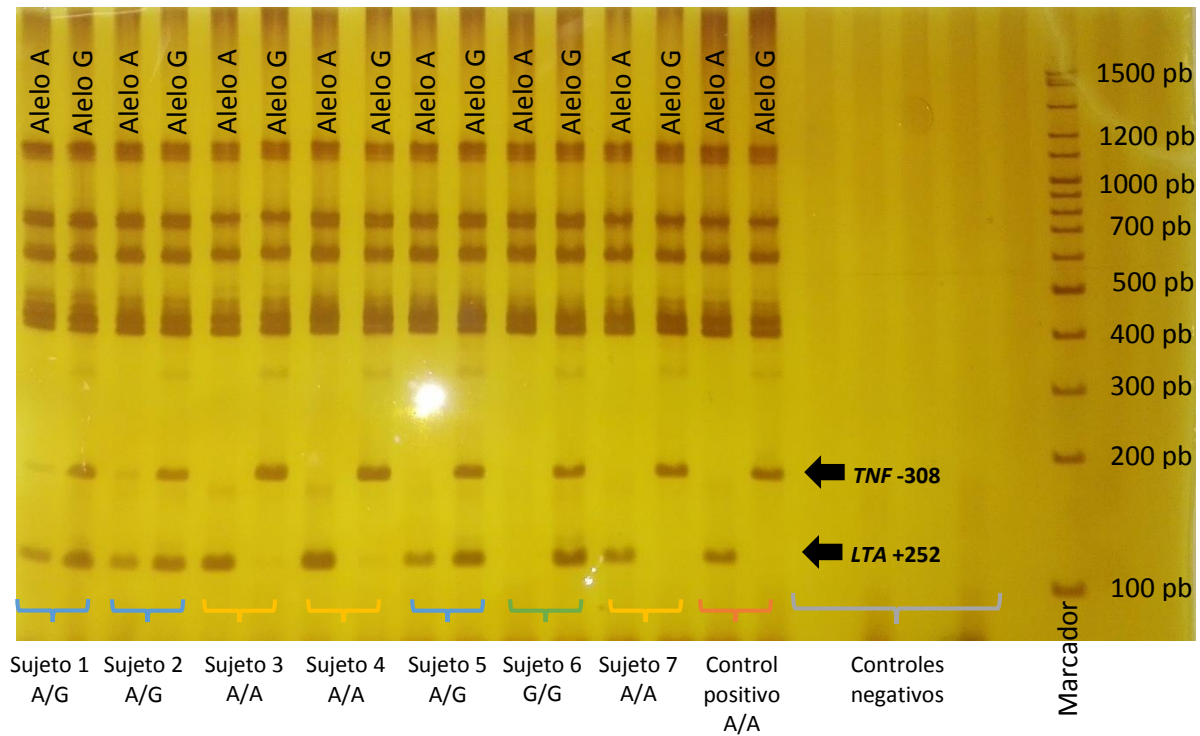


Figura 3. Gel de poliacrilamida teñido. Muestra los alelos presentes en cada sujeto de investigación. Tamaño del producto obtenido por PCR para el gen de *LTA* +252 A/G = 112 pb.

Alelos del gen de *TNF* -308, resultados no mostrados en este trabajo.

TNF: Factor de Necrosis Tumoral. LTA: Linfotoxina Alfa. pb: pares de bases.

Los resultados de la evaluación del equilibrio Hardy-Weinberg tanto en la población general como en la población de estudio se muestran en el cuadro 2, donde se puede observar que las poblaciones se encontraron en equilibrio.

Cuadro 2. Equilibrio de Hardy-Weinberg del SNP del gen de linfotóxina alfa +252 A/G

	Población General (n=105)	Frecuencias esperadas	Población de Estudio (n=96)	Frecuencias esperadas	Chi cuadrada*	p
Genotipo						
AA	42 (40.0%)	41.3	37 (38.5%)	37.7	0.235	0.889
AG	47 (44.8%)	48.6	46 (47.9%)	44.4		
GG	16 (15.2%)	15.1	13 (13.6%)	13.9		
Alelo						
A	131(62.4%)	131.6	120(62.5%)	120.4	0.018	0.895
G	79 (37.6%)	78.4	72 (37.5%)	71.6		

SNP: Polimorfismo de un Solo Nucleótido. *El valor de chi cuadrada calculada debe ser menor al valor de chi cuadrada tabulada (3.84) para establecer que las poblaciones se encuentran en equilibrio.

Chi cuadrada, los datos se expresan en frecuencias absolutas y porcentajes. Todos los resultados se interpretaron con un valor de p significativo ≤ 0.05 .

Se encontró una prevalencia en los sujetos con HFDT2 con RI de 14.3% para el genotipo AA, una prevalencia de 71.4% para el genotipo AG y una prevalencia de 14.3% para el genotipo GG. El genotipo que presentó una mayor frecuencia en los sujetos sin y con RI fue el AG, que es el estado heterocigoto del gen, en un 43.9% y 71.4% respectivamente, no encontrándose una diferencia significativa entre los grupos de estudio ($p > 0.05$; Cuadro 3). Para las frecuencias alélicas encontramos una prevalencia en los sujetos con HFDT2 con RI para el alelo A de 50.0% y una prevalencia para el alelo G de 50.0%. Se observó que el alelo predominante en los sujetos con HFDT2 sin RI fue el A (64.6%); sin embargo, no hubo diferencia significativa entre los grupos de estudio ($p > 0.05$; Cuadro 3).

Posteriormente, se realizó un agrupamiento de genotipos para determinar la diferencia del genotipo mayor (AA) con respecto de los genotipos heterocigoto (AG) y menor (GG) (modelo dominante), donde se encontró una diferencia significativa entre los sujetos con y sin RI ($p \leq 0.05$; Cuadro 3).

Cuadro 3. Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP del gen de linfotoxina alfa +252 A/G en los grupos de estudio

Con HFDT2 (n=96)			
	Sin RI (n=82)	Con RI (n=14)	p
Genotipo			
AA	35 (42.7%)	2 (14.3%)	0.111
AG	36 (43.9%)	10 (71.4%)	
GG	11 (13.4%)	2 (14.3%)	
Alelo			
A	106 (64.6%)	14 (50.0%)	0.139
G	58 (35.4%)	14 (50.0%)	
Genotipo			
AA	35 (42.7%)	2 (14.3%)	0.044
AG+GG	47 (57.3%)	12 (85.7%)	

SNP: Polimorfismo de un Solo Nucleótido. HFDT2: Historia Familiar de Diabetes Tipo 2. RI: Resistencia a la Insulina.

Chi cuadrada, los datos se expresan en frecuencias absolutas y porcentajes. Todos los resultados se interpretaron con un valor de p significativo ≤ 0.05 .

En el cuadro 4 se presentan los resultados del análisis de asociación entre el SNP del gen de *LTA* +252 A/G con RI, en los sujetos con HFDT2 en primer grado, donde se puede observar que la asociación entre RI y el SNP es significativa cuando está presente sobrepeso y obesidad ($IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$; $p \leq 0.05$). El genotipo AA se utilizó como genotipo de referencia para realizar las comparaciones con respecto de los genotipos AG y GG, así como del modelo dominante (AG+GG).

Cuadro 4. Análisis de asociación entre el SNP del gen de linfotoxina alfa +252 A/G con resistencia a la insulina

Con Resistencia a la Insulina	Odds ratio	IC 95%	<i>p</i>	Odds ratio*	IC 95%*	<i>p</i> *
Alelo A	0.547	0.244 – 1.226	0.143	0.478	0.209 – 1.095	0.081
Alelo G	1.828	0.815 – 4.096	0.143	2.093	0.914 – 4.793	0.081
Genotipo AA	0.224	0.047 – 1.065	0.060	0.205	0.042 – 0.988	0.048
Genotipo AG	3.194	0.925 – 11.026	0.066	3.026	0.861 – 10.638	0.084
Genotipo GG	1.076	0.212 – 5.469	0.930	1.568	0.279 – 8.823	0.610
Genotipos AG+GG	4.468	0.939 – 21.254	0.060	4.888	1.012 – 23.618	0.048

SNP: Polimorfismo de un Solo Nucleótido. IC: Intervalo de Confianza. *Ajustado a sobrepeso/obesidad (IMC $\geq$ 25 kg/m²). Regresión Logística Binaria. Todos los resultados se interpretaron con un valor de *p* significativo $\leq$ 0.05.

3.2 DISCUSIÓN

En este estudio se analizó la asociación del polimorfismo +252 A/G del gen de *LTA* con RI en sujetos con HFDT2. De acuerdo a los resultados obtenidos, se encontró una prevalencia de 46.5% de sujetos con HFDT2 en la población estudiada, a diferencia de lo reportado por Zamora-Ginez y col. (7) y por Acevedo-Negrete y col. (49), quienes reportaron una prevalencia de 59% y 55%, respectivamente; ambos estudios fueron realizados en el estado de Puebla.

La prevalencia de RI encontrada en los sujetos con HFDT2 en el presente estudio fue menor (14.6%) en comparación con la prevalencia de 46.2% reportada por Acevedo-Negrete y col. (49) en el mismo tipo de población; sin embargo, ellos determinaron la RI mediante el índice HOMA-IR y en el presente estudio se utilizó el índice HOMA2-IR. Las ventajas de utilizar HOMA2-IR es que el índice toma en cuenta las variaciones en la resistencia a la glucosa hepática y periférica, aumenta la curva de secreción de insulina para concentraciones de glucosa en plasma por encima de 10 mmol/L (180mg/dL) y la contribución de insulina circulante.(18) Hasta nuestro conocimiento, no se han realizado estudios que utilicen el HOMA2-IR en sujetos con HFDT2.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran diferencias significativas en las variables antropométricas y bioquímicas entre los sujetos sin y con RI, observándose que estos últimos tienen una mayor alteración metabólica; esto puede explicarse debido a que la HFDT2 ha sido sugerida como factor de riesgo para el desarrollo de DT2 (50–52), para el desarrollo de SM (53) y para el desarrollo de alteraciones de la insulina.(7,49,53) Específicamente, se ha reportado que existe una asociación entre la HFDT2 con la RI cuando uno de los padres es diabético (OR 1.78, $p < 0.01$), y cuando ambos padres son diabéticos (OR 2.83, $p < 0.01$). (49)

En el presente estudio se encontró una diferencia estadística significativa entre los sujetos sin y con RI con respecto al peso, al IMC, los niveles de glucosa e

insulina de ayuno y PTOG; estos resultados están en concordancia con los reportados en la misma entidad federativa por Acevedo-Negrete y col. (49), donde encontraron diferencias significativas en las mismas variables, además de la edad y la hemoglobina glucosilada, entre los grupos de estudio. Los autores reportaron que el estado de RI se asocia con la edad (46-65 años), con el IMC (sobrepeso y obesidad), con los niveles de glucosa en ayuno (>100 mg/dL), con los triglicéridos (>150 mg/dL) y con la presencia de HFDT2. Además, reportaron que cuando se asocia el sobrepeso y/u obesidad y la HFDT2, ambos factores incrementan el riesgo de desarrollar RI.

Por otro lado, un estudio realizado en población china por Deng y col. (53) en sujetos con HFDT2, reportó que los factores de riesgo que incrementaron los valores del índice HOMA-IR fueron el IMC, la presión arterial sistólica, los triglicéridos y la HFDT2, éste último factor está involucrado en las alteraciones metabólicas relacionadas con el metabolismo de la glucosa.

En cuanto al análisis del SNP del gen de *LTA* +252 A/G, en el presente estudio se encontró una prevalencia del genotipo AA de 14.3%, del genotipo AG de 71.4% y del genotipo GG de 14.3% en los sujetos que tienen HFDT2 con RI; en contraste con lo reportado por Castro-Martínez y col. (54) en sujetos mexicanos del estado de Puebla para el SNP de *LTA* +252 A/G (genotipo AA 40%, genotipo AG 46% y genotipo GG 14%), así como con lo reportado por Hayakawa y col. (46) en hombres japoneses aparentemente sanos, donde reportaron una prevalencia del genotipo AA de 35%, del genotipo AG de 47.9% y del genotipo GG de 17.1%; y diferente con lo reportado por García-Elorriaga y col. (47) en sujetos mexicanos con DT2, (genotipo AA 47%, genotipo AG 43% y genotipo GG 10%), difiriendo además en que el genotipo que se presenta con mayor frecuencia es el AA.

Por otro lado, en el presente estudio se encontró una prevalencia de 50.0% para el alelo A y una prevalencia de 50.0% para el alelo G en sujetos con HFDT2 con RI. Estos resultados difieren con lo reportado por Mendoza-Carrera y col. (55)

en sujetos mexicanos de la población general del estado de Puebla, quienes reportaron una prevalencia de 62.4% para el alelo A y una prevalencia de 37.6% para el alelo G; esto también concuerda con lo reportado por Castro-Martínez y col. (54) en sujetos mexicanos del estado de Puebla con 63% de prevalencia para el alelo A y 37% de prevalencia para el alelo G; así como con lo reportado por García-Elorriaga y col. (47) en sujetos mexicanos con DT2, quienes presentaron una mayor frecuencia del alelo A (69%) en comparación con el alelo G (31%), y también con lo reportado por Hayakawa y col. (46) en sujetos japoneses aparentemente sanos, con prevalencias de 59% y 41%, para los alelos A y G, respectivamente.

El análisis de los genotipos permitió encontrar una asociación entre la RI y los genotipos AG+GG, sólo cuando se ajusta por sobrepeso/obesidad ($IMC \geq 25$ kg/m²). Por lo tanto, se sugiere que el alelo LTA +252G (AG+GG) se comporta como un probable factor de riesgo para RI en los sujetos con HFDT2 con sobrepeso/obesidad.

De manera contrastante con nuestros resultados, en un estudio realizado por García-Elorriaga y col. (47) se reportó que en población mexicana no existe asociación del SNP del gen de LTA +252 A/G con DT2, tampoco encontraron diferencias significativas con respecto a los genotipos de LTA.

Por otro lado, en un estudio realizado por Hayakawa y col. (46) en población japonesa se encontró que los valores del índice HOMA-IR eran significativamente menores en los sujetos homocigotos GG con respecto a los sujetos que portaban el homocigoto AA, concluyendo que la presencia del SNP de LTA +252 A/G disminuye la RI en esa población.

Para explicar el papel que juega la LTA en el desarrollo de la RI se han descrito varias teorías.

1. Se sabe que el TNF-alfa juega un rol importante en la RI y que por lo tanto, el SNP de *LTA* quizá influya en el estado de RI, modulando la secreción de TNF-alfa, debido a la cercanía de la localización genómica de ambos genes.(27,56)
2. Un estudio realizado en ratas sugiere que la *LTA* puede estar bajo el control del promotor de insulina, permitiendo la expresión genética en las células de los islotes de Langerhans que induce signos tempranos de insulitis con acumulación de linfocitos, produciendo así alteraciones en la síntesis de la insulina.(27)
3. Otra teoría demuestra que la *LTA* induce ICAM en células endoteliales así como VCAM, además de que puede contribuir con la inflamación por la inducción de otras citocinas proinflamatorias y favorecer la expresión de RANTES.(30)
4. Finalmente, se ha descrito que la *LTA* puede inducir la activación de factores de transcripción proinflamatorios de una manera monofásica en vez de bifásica, como lo hace el TNF alfa; inhibiendo a los IKK para permitir la migración de los factores de transcripción proinflamatorios desde al citosol al núcleo celular y fosforilando al IRS1 que inhibe la transducción de la señal insulínica, haciendo que las células capten menor cantidad de glucosa, produciendo de esta forma alteraciones de la glucosa y la insulina.(57)

Hasta nuestro conocimiento, no existen estudios que nos permitan conocer si el SNP de *LTA* +252 A/G aumenta o disminuye la síntesis de su proteína, por lo que sería necesario continuar con esta línea de investigación.

Este estudio tiene algunas limitaciones. Primera, en el estudio participó una población cerrada. Segunda, variables tales como tipo de dieta, actividad física y factores socioeconómicos no se incluyeron en el estudio. Tercera, el tamaño de muestra, por ser una población cerrada, no pudo ser mayor, por lo que se sugiere continuar este estudio ampliando el tamaño de la muestra.

3.3 CONCLUSIONES

La prevalencia de la HFDT2 en la población estudiada fue de 46.5% y en estos mismos sujetos, la prevalencia de RI fue de 14.6% utilizando el índice HOMA2-IR.

Las prevalencias de los genotipos del gen de *LTA* +252 reportadas en este estudio fueron AA 14.3%, AG 71.4% y GG 14.3% para los sujetos con HFDT2 con RI; con respecto a las prevalencias alélicas, se encontró el 50.0% para el alelo A y el 50.0% para el alelo G, en los sujetos con HFDT2 con RI.

Se encontró una asociación entre RI y los genotipos AG+GG, sólo cuando se ajusta por sobrepeso/obesidad ($IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$).

Se sugiere que el alelo *LTA* +252G (AG+GG) se comporta como un probable factor de riesgo para RI en los sujetos con HFDT2 con sobrepeso/obesidad; por lo que con la tipificación genética del gen de *LTA* +252 podemos detectar a sujetos en riesgo de desarrollar RI y diseñar estrategias tempranas de prevención de manera individual.

3.4 PERSPECTIVAS

El presente trabajo de tesis, como parte de la línea de trabajo de enfermedades metabólicas y del protocolo de investigación titulado: “Asesoramiento para disminuir el riesgo de desarrollar enfermedades crónico degenerativas en personal académico y administrativo de la BUAP”, de la Facultad de Medicina de la BUAP, podría continuar abordando en perspectiva los siguientes puntos:

1. Incrementar el tamaño de la muestra del estudio en la misma entidad federativa, e incluso, en otros estados de la República Mexicana para poder establecer el comportamiento del SNP del gen de *LTA* +252 y su relación con RI y otras enfermedades relacionadas.
2. Evaluar la síntesis de LTA y reportar si la presencia del SNP +252 del gen aumenta o disminuye su síntesis.
3. Evaluar a la misma población muestreada, con otra distribución de grupos, como lo sería determinar la asociación y las características de los sujetos con HFDT2 pero de acuerdo al genotipo.
4. Establecer un estudio longitudinal con la misma población muestreada, para determinar la progresión hacia RI en los individuos que posean el polimorfismo indicado para riesgo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Diabetes Association. Type 2 diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care*. 2000;23(3):381–9.
2. Arslanian S. Type 2 diabetes in children: clinical aspects and risk factors. *Horm Res [Internet]*. 2002;57(1):19–28. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11979018>
3. Zhao Y, Song C, Ma X, Ma X, Wang Q, Ji H, et al. Synergistic effect of family history of diabetes and dietary habits on the risk of type 2 diabetes in central China. *Int J Endocrinol*. 2017;1–8.
4. Wikner C, Gigante B, Hellénius ML, de Faire U, Leander K. The risk of type 2 diabetes in men is synergistically affected by parental history of diabetes and overweight. *PLoS One*. 2013;8(4):1–8.
5. The InterAct Consortium. The link between family history and risk of type 2 diabetes is not explained by anthropometric, lifestyle or genetic risk factors: the EPIC-InterAct study. *Diabetologia*. 2013;56(1):60–9.
6. Moon JH, Roh E, Oh TJ, Kim KM, Moon JH, Lim S, et al. Increased risk of metabolic disorders in healthy young adults with family history of diabetes: from the Korea National Health and Nutrition Survey. *Diabetol Metab Syndr [Internet]*. 2017;9(1):1–9. Available from:
<http://dmsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13098-017-0210-8>
7. Zamora-Ginez I, Pérez-Fuentes R, Baez-Duarte BG, Revilla-Monsalve C, Brambila E, Multidisciplinary Research Group on Diabetes. Risk factors for diabetes, but not for cardiovascular disease, are associated with family history of type 2 diabetes in subjects from central Mexico. *Ann Hum Biol [Internet]*. 2012;39(2):102–7. Available from:
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/03014460.2011.645507>

8. Francis S, Chandran SP, Nesheera KK, Jacob J. Fasting insulin is better partitioned according to family history of type 2 diabetes mellitus than post glucose load insulin of oral glucose tolerance test in young adults. *J Clin Diagnostic Res.* 2017;11(5):13–6.
9. Arslanian SA, Bacha F, Saad R, Gungor N. Family history of type 2 diabetes is associated with decreased insulin sensitivity and an impaired balance between insulin sensitivity and insulin secretion in white youth. *Diabetes Care.* 2005;28(1):115–9.
10. Zamora-Valdés D, Chávez-Tapia NC, Méndez-Sánchez N. Mecanismos moleculares de resistencia a la insulina. *Médica Sur.* 2004;11(3):149–59.
11. Galgani JE, Ravussin E. Postprandial whole-body glycolysis is similar in insulin-resistant and insulin-sensitive non-diabetic humans. *Diabetologia.* 2012;55(3):737–42.
12. Carrasco N. F, Galgani F. JE, Reyes J. M. Síndrome de resistencia a la insulina. Estudio y manejo. *Rev Médica Clínica Condes.* 2013;24(5):827–37.
13. González Chávez A, Alexánder Rosas EG, Camacho Aguilera J, Cardona Muñoz EG, Cobo Abreu C, Fabian Castro G, et al. Consenso mexicano de resistencia a la insulina y síndrome metabólico. *Rev Mex Cardiol [Internet].* 1999;10(1):3–19. Available from:
<http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumenMain.cgi?IDARTICULO=10363>
14. Cipriani-Thorne E, Quintanilla A. Diabetes mellitus tipo 2 y resistencia a la insulina. *Rev Médica Hered.* 2010;21(11):160–70.
15. Gutiérrez-Rodelo C, Roura-Guiberna A, Olivares-Reyes JA. Mecanismos moleculares de resistencia a la insulina: una actualización. *Gac Med Mex.* 2017;153:214–28.
16. Geloneze B, Junqueira Vasques AC, Camargo Stabe CF, Pareja JC, Frandsen Paez de Lima Rosado LE, de Queiroz EC, et al. HOMA1-IR and HOMA2-IR indexes in identifying insulin resistance and metabolic syndrome:

Brazilian Metabolic Syndrome Study (BRAMS). *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2009;53(2):281–7.

17. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412–9.
18. Levy JC, Matthews DR, Hermans MP. Correct homeostasis model assessment (HOMA) evaluation uses the computer program. *Diabetes Care*. 1998;21:2191–2.
19. Buccini GS, Wolfthal DL. Valores de corte para índices de insulinoresistencia, insulinosensibilidad e insulino secreción derivados de la fórmula HOMA y del programa HOMA2. Interpretación de los datos. *RAEM*. 2008;45(1):3–21.
20. Zamora-Ginez I, García-Zapién AG, Flores-Martínez SE, Sánchez-Corona J, Baez-Duarte BG, Torres-Rasgado E, et al. 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. *Arch Med Res [Internet]*. 2013;44(7):529–34. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24051035>
21. Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet [Internet]*. 2010;375(9733):2267–77. Available from:
[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60408-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60408-4)
22. Bachmann OP, Dahl DB, Brechtel K, Machann J, Haap M, Maier T, et al. Effects of intravenous and dietary lipid challenge on intramyocellular lipid content and the relation with insulin sensitivity in humans. *Diabetes [Internet]*. 2001;50(11):2579–84. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11679437>
<http://diabetes.diabetesjournals.org/content/50/11/2579.full.pdf>

23. Shi H, Kokoeva M V., Inouye K, Tzamelis I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid – induced insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006;116(11):3015–25.
24. Ghanim H, Aljada A, Hofmeyer D, Syed T, Mohanty P, Dandona P. Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation.* 2004;110(12):1564–71.
25. Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest.* 2008;118(9):2992–3002.
26. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* [Internet]. 2006;444(7121):860–7. Available from:
<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature05485>
27. Remouchamps C, Boutaffala L, Ganef C, Dejardin E. Biology and signal transduction pathways of the lymphotoxin- $\alpha\beta$ /LT β R system. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 2011;22(5–6):301–10. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.11.007>
28. Albarbar B, Dunnill C, Georgopoulos NT. Regulation of cell fate by lymphotoxin (LT) receptor signalling: functional differences and similarities of the LT system to other TNF superfamily (TNFSF) members. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 2015;26(6):659–71. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.05.001>
29. Browning, Jeffrey, Ware, F. C. Linfotóxina complejada de superficie. *Of Española Pat y Marcas.* 2001;26(16):1–38.
30. Calmon-Hamaty F, Combe B, Hahne M, Morel J. Lymphotoxin α revisited: general features and implications in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2011;13(4):232–6. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3239340&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

31. Kanková K, Márová I, Jansen EHJM, Vasku A, Jurajda M, Vácha J. Polymorphism Ncol in tumor necrosis factor beta is associated with fasting glycemia and lipid parameters in healthy non-obese caucasian subjects. *Diabetes Metab.* 2002;28(3):231–7.
32. Menges T, König IR, Hossain H, Little S, Tchatalbachev S, Thierer F, et al. Sepsis syndrome and death in trauma patients are associated with variation in the gene encoding tumor necrosis factor. *Crit Care Med* [Internet]. 2008;36(5):1456–62, e1–6. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18434886>
33. Torrades S. Diversidad del genoma humano: polimorfismos. *Offarm.* 2002;21(5):122–6.
34. Checa Caratachea MA. Polimorfismos genéticos: importancia y aplicaciones. *Rev del Inst Nac Enfermedades Respir México.* 2007;20(3):213–21.
35. Andrea Casas L, Gómez Gutiérrez A. Asociación de polimorfismos genéticos de TNF- α e IL-10, citocinas reguladoras de la respuesta inmune en enfermedades infecciosas, alérgicas y autoinmunes. *Asoc Colomb Infectología* [Internet]. 2008;12(1):38–53. Available from:
<http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v12n1/v12n1a05.pdf>
36. Montoya Ruiz C, Rugeles López MT, Jaimes Barragán FA, Velilla Hernández PA. Variaciones alélicas en los genes de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, y su asociación con la susceptibilidad y el curso clínico de la sepsis. *Iatreia.* 2013;26(1):67–76.
37. Garnacho Montero J, Garnacho Montero MC, Ortiz Leyba C, Aldabó Pallás T. Polimorfismos genéticos en la sepsis. *Med Intensiva.* 2005;29(3):185–91.
38. Hernández-Romano J, Martínez-Barnetche J, Valverde-Garduño V. Polimorfismos reguladores y su participación en la patogenia de enfermedades complejas en la era posgenómica. *Salud Publica Mex.* 2009;51(3):455–62.

39. Watanabe E, Buchman TG, Hirasawa H, Zehnbaauer BA. Association between lymphotoxin-alpha (tumor necrosis factor-beta) intron polymorphism and predisposition to severe sepsis is modified by gender and age. *Crit Care Med*. 2010;38(1):181–93.
40. Bolstad AI, Le Hellard S, Kristjansdottir G, Vasaitis L, Kvarnström M, Sjöwall C, et al. Association between genetic variants in the tumour necrosis factor/lymphotoxin α /lymphotoxin β locus and primary Sjögren's syndrome in scandinavian samples. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2012;71(6):981–8. Available from:

<http://ard.bmj.com/lookup/doi/10.1136/annrheumdis-2011-200446>
41. Zhang C, Zhao MQ, Liu J, Huang Q, Li P, Ni J, et al. Association of lymphotoxin alpha polymorphism with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Int J Rheum Dis*. 2015;18(4):398–407.
42. Song GG, Kim JH, Lee YH. Associations between TNF- α -308 A/G and lymphotoxin- α +252 A/G polymorphisms and susceptibility to sarcoidosis: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2014;41(1):259–67.
43. Mak JCW, Ko FWS, Chu CM, Leung HCM, Chan HW, Cheung AHK, et al. Polymorphisms in the IL-4, IL-4 receptor α chain, TNF- α , and lymphotoxin- α genes and risk of asthma in Hong Kong Chinese adults. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007;144(2):114–22.
44. Yu X, Huang Y, Li C, Yang H, Lu C, Duan S. Positive association between lymphotoxin-alpha variation rs909253 and cancer risk: a meta-analysis based on 36 case-control studies. *Tumor Biol*. 2014;35(3):1973–83.
45. Szolnoki Z, Havasi V, Talián G, Bene J, Komlósi K, Somogyváry F, et al. Lymphotoxin alpha gene 252G allelic variant is a risk factor for large vessel associated ischemic stroke. *J Mol Neurosci*. 2005;27(1):205–10.
46. Hayakawa T, Nagai Y, Taniguchi M, Yamashita H, Takamura T, Abe T, et al. Tumor necrosis factor- β gene NcoI polymorphism decreases insulin

resistance in japanese men. *Metabolism*. 2000;49(11):1506–9.

47. García-Elorriaga G, Mendoza-Aguilar M, del Rey-Pineda G, González-Bonilla C. Genetic polymorphisms of the tumor necrosis factor and lymphotoxin alpha in type 2 diabetes. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* [Internet]. 2013;51(1):42–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23550407>
48. Perrey C, Turner SJ, Pravica V, Howell WM, Hutchinson I V. ARMS-PCR methodologies to determine IL-10, TNF-alpha, TNF-beta and TGF-beta1 gene polymorphisms. *Transpl Immunol*. 1999;7:127–8.
49. Acevedo-Negrete AP, Porchia LM, Gonzalez-Mejia ME, Torres-Rasgado E, Solis-Cano DG, Ruiz-Vivanco G, et al. The impact of parental history of type 2 diabetes on hyperinsulinemia and insulin resistance in subjects from central Mexico. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev* [Internet]. 2017; Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.dsx.2017.07.012>
50. Ferdi NEH, Abla K, Chenchouni H. Effect of socioeconomic factors and family history on the incidence of diabetes in an adult diabetic population from Algeria. *Iran J Public Health*. 2016;45(12):1636–44.
51. Kong APS, Luk AOY, Chan JCN. Detecting people at high risk of type 2 diabetes- How do we find them and who should be treated? *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2016;30(3):345–55. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521690X16300203>
52. Han SJ, Kim HJ, Kim DJ, Lee KW, Cho NH. Incidence and predictors of type 2 diabetes mellitus among koreans: A 12-year follow up of the Korean Genome and Epidemiology Study. *Diabetes Res Clin Pract* [Internet]. 2017;123:173–80. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2016.10.004>
53. Deng L, Liu S, Gong Y, Tian H, Liu Y, Song J, et al. Increased metabolic

disorders and impaired insulin secretory function in the first-degree relatives of type 2 diabetic patients with normal glucose tolerance. *Metab Syndr Relat Disord*. 2016;14(9):1–6.

54. Castro-Martínez XH, Leal-Cortés C, Flores-Martínez SE, García-Zapién AG, Sánchez-Corona J, Portilla-de Buen E, et al. Tumor necrosis factor haplotype diversity in mestizo and native populations of Mexico. *Tissue Antigens*. 2014;83(4):247–59.
55. Mendoza-Carrera F, Castro-Martínez XH, Leal C, Portilla-de Buen E, Sánchez-Corona J, Flores-Martínez SE, et al. Analysis of cytokine gene polymorphisms in mestizo and native populations from Mexico. *Am J Hum Biol*. 2017;29(1):1–10.
56. Fernandez-Real JM, Gutierrez C, Ricant W, Casamitjana R. The TNF-beta gene Nco I polymorphism is not associated with hypertriglyceridemia or insulin resistance in lean and obese subjects. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;236(3):829–32.
57. Etemadi N, Holien JK, Chau D, Dewson G, Murphy JM, Alexander WS, et al. Lymphotoxin α induces apoptosis, necroptosis and inflammatory signals with the same potency as tumour necrosis factor. *FEBS J*. 2013;280(21):5283–97.
58. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.
59. Phillips AJ, Simon C. Simple, efficient, and nondestructive DNA extraction protocol. *Ann Entomol Soc Am* [Internet]. 1995;88(3):281–3. Available from: <http://www.ingentaconnect.com/content/esa/aesa/1995/00000088/00000003/art00004>
60. Thermo Fisher Scientific. NanoDrop 1000 spectrophotometer V3.8 user's manual. Thermo Fish Sci Inc. 2010;1–51.
61. Valobra A, Martinelli G. Cuantificación de ADN y electroforesis en gel de agarosa. *Introd a la Biol Cel y Mol*. 2014;5–6.

62. Cortazar Martínez A, Silva Rincón EP. Métodos físico-químicos en biotecnología. PCR. Anal Chem. 2004;62(13):1202–14.
63. García Pérez HM. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. Univ Diag. 2000;1(2):31–41.
64. Carrillo Soto JG, Candia Plata M del C, Lugo Sepúlveda RE, Espinoza Ojeda E, Noriega Rodríguez JA. Evaluación de procedimientos de tinción para el análisis de proteínas por electroforesis (SDS-PAGE). Invurnus. 2013;8(1):19–26.

ANEXOS

ANEXO 1. DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES Y ESCALAS DE MEDICIÓN

Cuadro 5. Variable independiente

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INSTRUMENTO DE MEDICIÓN	TIPO DE VARIABLE / ESCALA DE MEDICIÓN	UNIDADES DE ESCALA
Polimorfismo de linfotoxina alfa +252 A/G	Variación en la secuencia del gen de la linfotoxina alfa que influye en el mecanismo de regulación de la expresión de dicha citocina.	Secuencia característica de nucleótidos dentro de una molécula de ADN.	Reacción en cadena de la polimerasa específica de alelo.	Cualitativa dicotómica	A / G

Cuadro 6. Variable dependiente

VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INSTRUMENTO DE MEDICIÓN	TIPO DE VARIABLE / ESCALA DE MEDICIÓN	UNIDADES DE ESCALA
Resistencia a la insulina	Alteración genética o adquirida de la respuesta tisular a la acción de la insulina.	Relación de la glucemia y la insulinemia en ayunas, con un índice HOMA2-IR >2.0.	HOMA-IR: $\frac{\text{Insulinemia} \times \text{Glucemia}}{405}$ Mediante la calculadora HOMA2-IR.	Cualitativa dicotómica	Si / No

Cuadro 7. Variable de ajuste

VARIABLE DE AJUSTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INSTRUMENTO DE MEDICIÓN	TIPO DE VARIABLE / ESCALA DE MEDICIÓN	UNIDADES DE ESCALA
Sobrepeso / Obesidad	Aumento del peso corporal por encima de un patrón dado en relación con la talla.	Relación entre el peso y la talla del individuo igual o superior a 25 kg/m ² .	Índice de masa corporal: $\frac{\text{peso (kg)}}{\text{talla}^2 \text{ (m)}}$	Cualitativa dicotómica	Si / No

Cuadro 8. Variables demográficas

VARIABLES DEMOGRÁFICAS	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INSTRUMENTO DE MEDICIÓN	TIPO DE VARIABLE / ESCALA DE MEDICIÓN	UNIDADES DE ESCALA
Edad	Tiempo que una persona ha vivido desde su nacimiento.	Años de vida cumplidos al momento de la realización de la historia clínica.	Expediente clínico: ficha de identificación.	Cuantitativa discreta	Años
Sexo	Condición orgánica masculina o femenina de plantas o animales.	Femenino / Masculino.	Expediente clínico: ficha de identificación.	Cualitativa dicotómica	Masculino / Femenino

Cuadro 9. Variables antropométricas

VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INSTRUMENTO DE MEDICIÓN	TIPO DE VARIABLE / ESCALA DE MEDICIÓN	UNIDADES DE ESCALA
Peso	Magnitud física que expresa la cantidad de materia que contiene un cuerpo.	Kilogramos de peso en el momento de la entrevista, con la cantidad mínima de ropa, después de evacuar y miccionar.	Báscula electrónica marca DETECTO de sensibilidad 0.1 kg.	Cuantitativa continua	kilogramos
Talla (estatura)	Estatura o altura de las personas desde los pies hasta la cabeza.	Metros de altura en el momento de la entrevista, con el individuo de pie, descalzo, con la mirada en el horizonte y en inspiración.	Cinta antropométrica marca SECA de fibra de vidrio con precisión de 0.1 cm.	Cuantitativa continua	metros
Índice de Masa Corporal	Razón matemática que asocia el peso y la talla de un individuo y que los clasifica en bajo peso, normopeso, sobrepeso y obesidad.	Relación entre el peso en kg y la talla al cuadrado en m del individuo.	Índice de masa corporal: $\frac{\text{peso (kg)}}{\text{talla}^2 \text{ (m)}}$	Cuantitativa continua	kg/m ²

Cuadro 10. Variables bioquímicas

VARIABLES BIOQUÍMICAS	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INSTRUMENTO DE MEDICIÓN	TIPO DE VARIABLE / ESCALA DE MEDICIÓN	UNIDADES DE ESCALA
Glucosa de ayuno	Monosacárido con fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$.	Cantidad de glucemia en ayuno medida en mg/dL.	VITROS Chemistry GLU Slide.	Cuantitativa continua	mg/dL
Insulina de ayuno	Hormona polipeptídica producida y secretada por las células beta del páncreas.	Cantidad de insulinemia en ayuno medida en μ U/mL.	IMMULITE / IMMULITE 1000 Insulin Assay.	Cuantitativa continua	μ U/mL
Prueba de tolerancia oral a la glucosa	Prueba médica que determina la glucosa plasmática posterior a una carga oral de glucosa.	Cantidad de glucemia medida en mg/dL después de una carga oral con 75 g de glucosa a las 2 horas de una medición basal.	VITROS Chemistry GLU Slide.	Cuantitativa continua	mg/dL
Hemoglobina glucosilada	Proteína de la sangre que resulta de la unión de la hemoglobina con glúcidos a cadenas carbonadas con funciones ácidas.	Cantidad de glucemia media medida en % de los últimos 3 meses previos a la toma de la muestra.	Test inmuno-turbidimétrico de Gernon.	Cuantitativa continua	%

ANEXO 2. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

OBJETIVO GENERAL:

Determinar si el asesoramiento preventivo (médico, nutricional, de actividad física y de higiene oral) dentro del centro de trabajo disminuyen el riesgo a desarrollar enfermedades crónico degenerativas (diabetes tipo 2 y enfermedad cardiovascular) en personal académico y administrativo de la BUAP.

PARTICIPACIÓN:

Se me ha explicado que mi participación, para poder evaluar mi estado nutricional, de actividad física, higiene oral y determinar si poseo algún factor de riesgo para enfermedades crónico degenerativas, implicará el responder a varias encuestas, seré sometido a toma de signos vitales, mediciones antropométricas, toma de electrocardiograma, prueba de esfuerzo, revisión bucal 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. Que para el asesoramiento nutricio y/o de actividad física y/o de higiene oral, acudiré puntualmente a todas y cada una de las pláticas individuales o grupales y seguiré las indicaciones de dichas pláticas. Además de lo anterior, estoy consciente de que una cantidad de las muestras de suero, plasma y saliva que me serán tomadas se almacenarán en congelación para su uso futuro y determinación de algún metabolito importante o sus genes.

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, electrocardiograma, para punción de vena de brazo para la toma de muestra sanguínea, toma de muestra de saliva y revisión de estado de salud dental.

Me comprometo a contestar con veracidad todas y cada una de las preguntas relacionadas 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.

CONFIDENCIALIDAD

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.

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.

Irma del Carmen Zamora Ginez

Investigador responsable

Teléfono: 2224142265

ANEXO 3. FORMATO DE CAPTURA DE DATOS

HISTORIA CLÍNICA

1. FICHA DE IDENTIFICACIÓN

NOMBRE:

FECHA:

NO. DE FOLIO:

FECHA DE NACIMIENTO:

EDAD:

SEXO:

ESTADO CIVIL:

TELÉFONO FIJO:

TELÉFONO MÓVIL:

E-MAIL:

2. ANTECEDENTES HEREDO-FAMILIARES

Padecimiento	Mamá	Papá	Hermanos	Hijos	Otros
Diabetes Tipo 2					

3. SIGNOS DE RESISTENCIA A LA INSULINA

HOMBRES Y MUJERES

Acné () Hirsutismo () Alopecia () Acantosis nigricans ()

4. ANTECEDENTES PERSONALES PATOLÓGICOS

Patologías	SI/NO	Eliminación (Si/No)
Hipertensión arterial		
Diabetes		
Cáncer		
IAM		
EVC		
Obesidad		
Resistencia a la insulina		
Artritis		
Prediabetes		
Dislipidemia		
Enfermedad autoinmune		
Otras		

5. PADECIMIENTO ACTUAL

6. EXPLORACIÓN FÍSICA

FC: _____ lpm Peso: _____ kg
 FR: _____ rpm Talla: _____ m
 TA: _____ mmHg IMC: _____ kg/m²
 Temp.: _____ °C

ANEXO 4. ASPECTOS ÉTICOS

Este proyecto fue revisado y autorizado por parte del Comité de Investigación y Ética de Investigación en Salud del Hospital Universitario de Puebla, con número de registro institucional CIEHUP 2016/008. Además se obtuvo la constancia de registro de autorización del proyecto de investigación por parte del Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina de la BUAP, con fecha de registro de 20/mayo/2016; libro 2; hoja 22; no. de registro 411.

Esta tesis ha sido realizada considerando los principios de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, el Código de Núremberg, la Norma Oficial Mexicana (PROY-NOM-012-SSA3-2007) y la Declaración de Helsinki, ajustándose a dichos principios científicos y éticos.

Este estudio de investigación fue redactado conforme a lo establecido en el Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-012-SSA3-2007, que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos. Se solicitó la autorización para la realización del proyecto de investigación. En cuanto al sujeto de estudio, se garantizó su seguridad física y jurídica, la información se clasificó como confidencial.

De acuerdo al artículo 3 de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud se contribuyó al conocimiento de los vínculos entre la enfermedad y el polimorfismo, y al estudio de las técnicas y métodos que se emplearon para la realización del mismo. Acorde al artículo 13 de esta misma ley, prevaleció el criterio del respeto a la dignidad y la protección de los derechos y bienestar de los sujetos de estudio. Con respecto al artículo 14 se contó con el consentimiento informado y por escrito del sujeto de investigación, el estudio se llevó a cabo por profesionales de la salud con conocimiento y experiencia, bajo la responsabilidad del Hospital Universitario de la BUAP que garantizó el bienestar del sujeto de investigación; la investigación se llevó a cabo previa autorización de dicho

protocolo. Conforme al artículo 16 se protegió la privacidad del individuo sujeto de investigación, así como la confidencialidad de los datos proporcionados. Establecido por el artículo 17 esta investigación se clasifica como de **riesgo mínimo**. De acuerdo al artículo 18 el sujeto de investigación tuvo el derecho de suspender su participación si así lo deseaba. Conforme al artículo 19 se otorgó atención médica al sujeto que sufrió algún daño si se relacionó directamente con la investigación, sin perjuicio de la indemnización que legalmente correspondió. Acorde al artículo 20, el sujeto de investigación autorizó su participación en el estudio con pleno conocimiento de la naturaleza de los procedimientos y riesgos a los que se sometió, con la capacidad de libre elección y sin coacción alguna. Con respecto al artículo 21, el sujeto de investigación tuvo la garantía de recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación; así mismo, tuvo la libertad de retirar su consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en el estudio si así lo deseó.

El proyecto de investigación también fue redactado conforme a los principios de la declaración de Helsinki, los resultados se publicarán tal y como lo marca esta declaración; así como también se basa en los principios básicos a fin de satisfacer los requisitos de la moral, la ética y el derecho que establece el Código de Núremberg.

Este estudio de investigación tomó en cuenta los principios de beneficencia, no maleficencia y justicia; se procuró que los resultados de la investigación fueran válidos y benéficos para la sociedad.

ANEXO 5. REGISTRO DEL COMITÉ DE ÉTICA E INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE PUEBLA



"60 Aniversario de la Autonomía Universitaria"

COMITÉ DE ÉTICA E INVESTIGACION DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE PUEBLA

H. Puebla de Z., Pue., 03 de mayo de 2016

D.C. Blanca Guadalupe Báez Duarte
Irma del Carmen Zamora Ginez
PRESENTE

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título **Asociación del polimorfismo de linfotoxina a +252 G/A con resistencia a la insulina en sujetos con historia familiar de diabetes tipo 2** que fue sometido a evaluación de este Comité de Investigación y Ética de Investigación en Salud, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación, por lo que el dictamen es **AUTORIZADO**, con el número de registro institucional:

No. de Registro

CEIHUP	2016/008
--------	----------

Atentamente
"Pensar bien, para vivir mejor"

Dr. Arturo Arcega Domínguez
Coordinador de Investigación



C.c.p. Dr. Christopherson Gengny Caballero López, Subdirector de Enseñanza, Investigación y Capacitación en Salud - p.s.c.
C.c.p. Archiberto AAD/garc



Hospital
Universitario
de Puebla

25 poniente 1301, Col. Volcanes,
Puebla, Pue. C.P. 72410
01 (222) 229 55 00 Ext. 6200 y 6162

ANEXO 6. REGISTRO DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN Y ÉTICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA BUAP



Oficio No SIEP / C.I. / 069/2016
Asunto: Constancia de Registro

D.C. IRMA DEL CARMEN ZAMORA GINEZ
D.C. BLANCA GUADALUPE BAEZ DUARTE
D.C. FRANCISCO MENDOZA CARRERA
RUBICELI HERNÁNDEZ PEÑA
PRESENTE:

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 **C O N S T A R** que el Proyecto de Investigación presentado en autoría Colectiva por:

- > D.C. IRMA DEL CARMEN ZAMORA GINEZ
- > D.C. BLANCA GUADALUPE BAEZ DUARTE
- > D.C. FRANCISCO MENDOZA CARRERA
- > RUBICELI HERNÁNDEZ PEÑA

Titulado:

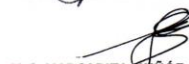
"Asociación del polimorfismo de linfotoxina α 252 G/A con resistencia a la insulina en sujetos con historia familiar de Diabetes tipo2"

Ha sido registrado en esta Secretaría con los siguientes datos:

Fecha de registro: 20 de mayo de 2016.
Número de Libro: 2
Número de Hoja: 22
Número de Registro: 411

ATENTAMENTE
"PENSAR BIEN, PARA VIVIR MEJOR"
H. Puebla de Z., a 20 de mayo de 2016.


DR. JAIME MÉNDEZ GUERRA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN


M.C. MARGARITA MUÑOZ GUARNEROS
SECRETARÍA DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

c.c.p. archivo
c.c.p. minutarío
M "MCG"seaf



Facultad
de Medicina

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

ANEXO 7. LOGÍSTICA

RECURSOS HUMANOS

✧ Directores de tesis

- D.C. Irma Zamora Ginez, Facultad de Medicina BUAP.
- D.C. Blanca Baez Duarte, Facultad de Medicina BUAP.
- D.C. Francisco Mendoza Carrera, División de Medicina Molecular del CIBO-IMSS de Guadalajara, Jalisco, México.

✧ Alumna de la Maestría en Ciencias Médicas e Investigación de la Facultad de Medicina de la BUAP, Rubiceli Hernández Peña.

✧ Colaboradores

Dr. Rosendo Briones Rojas, Director del HUP; Dr. Arturo Árcega Domínguez, Coordinador de Investigación del HUP; M.C. María Susana Pérez Fernández, Jefa del Laboratorio de Análisis Clínicos del HUP; Q.F.B. Julia González Ortega; Q.F.B. Gisela Ariza Gallardo; así como al personal que labora en el Laboratorio de Análisis Clínicos del HUP, todos pertenecientes a la BUAP.

RECURSOS FINANCIEROS Y MATERIALES

Se contó con los recursos financieros, materiales y de infraestructura de las facultades participantes (Medicina, Contaduría, Arquitectura, Ciencias Sociales), del HUP de la BUAP y de la División de Medicina Molecular del CIBO-IMSS de Guadalajara, que fueron aportados a través del protocolo de investigación titulado: “Asesoramiento para disminuir el riesgo de desarrollar enfermedades crónico degenerativas en personal académico y administrativo de la BUAP”, con número de registro 342 en la Facultad de Medicina de la BUAP. Además de recursos otorgados por la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP) de la BUAP. La estudiante contó con beca CONACyT No. 581730.

ANEXO 8. DETERMINACIÓN DE GLUCOSA SANGUÍNEA

La concentración de glucosa fue cuantificada a través de VITROS Chemistry Products GLU Slides, que mide cuantitativamente la concentración de glucosa en suero, plasma, orina y líquido cefalorraquídeo. El VITROS Chemistry GLU Slide es un elemento analítico multicapa revestido con un soporte de poliéster.

Una gota de la muestra sanguínea del sujeto de estudio se deposita en la corredera y se distribuye uniformemente por la capa de dispersión a las capas subyacentes. La oxidación de la muestra de glucosa es catalizada por la glucosa oxidasa para formar peróxido de hidrógeno y gluconato. Esta reacción es seguida de un acoplamiento oxidativo catalizado por la peroxidasa en presencia de precursores de colorantes para producir un colorante. La intensidad de éste se mide por la luz reflejada.

- ↪ Rango analítico: 20 – 625 mg/dL.
- ↪ Volumen de la muestra: 10 µL.
- ↪ Longitud de onda: 540 nm.
- ↪ Valores esperados: 80 – 105 mg/dL.

ANEXO 9. DETERMINACIÓN DE INSULINA SANGUÍNEA

La insulinemia de ayuno se determinó mediante el método IMMULITE/IMMULITE 1000 Insulin Assay, que es un ensayo inmunométrico con dos sitios de unión quimioluminiscente en fase sólida. 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 “sándwich” entre los dos anticuerpos. Después de la formación del complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo-enzima conjugada, la enzima conjugada-anticuerpo sin consolidar se elimina por lavado. La actividad de la peroxidasa de rábano unida en los pozos es analizada con las reacciones de quimioluminiscencia. La unidad de la luz obtenida de la reacción es proporcional a la concentración de insulina de la muestra.

- ↪ Rango analítico: 3 – 29 $\mu\text{U/mL}$.
- ↪ Volumen de la muestra: 10 μL .
- ↪ Valores esperados: <20 $\mu\text{U/mL}$.

ANEXO 10. DETERMINACIÓN DE PRUEBA DE TOLERANCIA ORAL A LA GLUCOSA

La concentración de glucosa fue cuantificada a través de VITROS Chemistry Products GLU Slides, que mide cuantitativamente la concentración de glucosa en suero, plasma, orina y líquido cefalorraquídeo. El VITROS Chemistry GLU Slide es un elemento analítico multicapa revestido con un soporte de poliéster.

Una gota de la muestra sanguínea del sujeto de estudio se deposita en la corredera y se distribuye uniformemente por la capa de dispersión a las capas subyacentes. La oxidación de la muestra de glucosa es catalizada por la glucosa oxidasa para formar peróxido de hidrógeno y gluconato. Esta reacción es seguida de un acoplamiento oxidativo catalizado por la peroxidasa en presencia de precursores de colorantes para producir un colorante. La intensidad de éste se mide por la luz reflejada.

Dicho procedimiento se llevó a cabo después de dos horas de una carga oral con 75 g de glucosa. Éste método se fundamenta en la respuesta fisiológica cuando se administra glucosa, la cual estimula la liberación de insulina y por lo tanto la disminución de las concentraciones séricas de glucosa por su ingreso a las células. En condiciones normales, los niveles de glucosa deben volver a las concentraciones de ayuno después de 2 horas.

- ↪ Rango analítico: 20 – 625 mg/dL.
- ↪ Volumen de la muestra: 10 µL.
- ↪ Longitud de onda: 540 nm.
- ↪ Valores esperados: <140 mg/dL.

ANEXO 11. DETERMINACIÓN DE HEMOGLOBINA GLUCOSILADA

La hemoglobina glucosilada se determinó mediante el test inmunturbidimétrico de Gernon en muestras de sangre entera.

La técnica se fundamenta en que la hemoglobina total y la HbA1c se unen con la misma afinidad a las partículas de látex del reactivo 1 en sangre hemolizada. El anticuerpo monoclonal HbA1c antihumano (ratón) se une a la HbA1c ligada a las partículas de látex. El anticuerpo policlonal IgG anti-ratón (cabra) reacciona con el anticuerpo monoclonal HbA1c anti-humano, produciéndose una aglutinación. La absorción medida es proporcional a la HbA1c unida a las partículas que, a su vez, es proporcional al porcentaje de HbA1c en la muestra.

Existe una correlación lineal entre la HbA1c y las concentraciones medias de glucosa, de modo que se pueden convertir en valores estimados de concentraciones medias de glucosa por medio de ecuaciones.

- ↻ Rango analítico: 1 – -%.
- ↻ Volumen de la muestra: 20 µL.
- ↻ Longitud de onda: 660 nm.
- ↻ Valores esperados: <7 %.

ANEXO 12. EVALUACIÓN DE RESISTENCIA A LA INSULINA

Índice HOMA2-IR. Modelo homeostático de evaluación de resistencia a la insulina. Estima el grado de resistencia a la insulina.

Definición operacional: $[\text{Glucemia de ayuno (mg/dL)} \times \text{Insulinemia de ayuno } (\mu\text{U/mL})] / 405$, obtenido con la calculadora HOMA2-IR. Rango normal: ≤ 2.0

ANEXO 13. DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO DE LINFOTOXINA ALFA +252 A/G

13.1 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN

Esta primera etapa consistió en la extracción de leucocitos y la extracción de ADN de cada una de las muestras de sangre. Se utilizaron detergentes y solventes orgánicos para lisar el núcleo de las células y remover las proteínas adheridas al ADN, seguido por la precipitación de éste con etanol.

Técnica: Método de Miller y col. Extracción de leucocitos.(58)

1. Se extraen 5 mL de sangre completa (con EDTA) y se colocan en un macrotubo. 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. Se agita y se refrigera por 20 minutos a 4°C. Se centrifuga a 4°C por 20 minutos a 4000 rpm.
2. Se decanta el sobrenadante cuidadosamente para no desprender el botón de leucocitos que se forma en el fondo del tubo. Se realizan lavados con buffer de extracción de leucocitos hasta la eliminación total del detritus celular. Se transfiere el botón de leucocitos a un vial de 1.5 mL (almacenar hasta su uso, puede almacenarse 6 meses o más a -20°C).

Técnica: Método DTAB-CTAB. Extracción de ADN.(59)

3. Se agregan 600 µL de buffer de lisis DTAB 8.0% (NaCl 1.5 M, Trisma base 10 mM, EDTA 50 mM), se revuelve con movimiento manual por inversión.
4. Se incuba a 68°C y se agita cada 5 minutos hasta desvanecer el botón de leucocitos, 20 minutos en total aproximadamente.
5. Se agregan 900 µL de cloroformo al 100%, se agita vigorosamente mediante agitador mecánico durante 5 minutos. Se centrifuga a 10,000 rpm por 10 minutos.
6. Se recupera la fase acuosa del ADN en 2 viales de 1.5 mL estériles.
7. Se adiciona a cada vial 150 µL de solución CTAB (hexadecil-trimetilamonio al 5% y NaCl 0.4 M) y 900 µL de agua bidestilada, se agita

mediante inversión durante 2 minutos y se centrifuga a 10,000 rpm por 10 minutos.

8. Se decanta el sobrenadante y se adicionan 750 μ L de etanol frío al 100% y 150 μ L de NaCl_2 1.2 M y se centrifuga a 10,000 rpm por 10 minutos.
9. Se decanta el sobrenadante y se transfiere el ADN de un vial a otro (previamente etiquetados) por medio de una pipeta.
10. Se agrega 1 mL de etanol al 70% y se centrifuga a 10,000 rpm por 5 minutos, se decanta el sobrenadante.
11. Se repite el paso 10.
12. Se evapora el etanol colocando los viales en un Thermobloc a 78°C por 40 minutos, tapando los viales con una gasa.
13. Se resuspende el botón de ADN colocando 100-300 μ L de buffer TE (Tris 100 mM, EDTA 1 mM) según sea el tamaño del botón de ADN.
14. Se agita y se incuba a 37°C por 1 día.
15. Se cuantifica su concentración y pureza.
16. Finalmente, se almacena un stock a -80°C y se hace una dilución 50/50 para la utilización del ADN, se almacena ésta dilución a -20°C.

13.2 CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA PUREZA DEL ADN (60)

Se debe estimar la pureza del ADN mediante espectrofotometría, debido a que el ADN se encuentra asociado a proteínas. Se deben utilizar longitudes de onda de 260 nm y 280 nm, ya que en estas longitudes de onda 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.

NanoDrop. Funcionamiento y técnica.

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. Tan sólo 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 seguir los siguientes pasos:

1. Levantar el pedestal superior.
2. Depositar 1 μL en el pedestal inferior empleando una micropipeta.
3. Cerrar el pedestal superior e iniciar la medida espectral empleando el software asociado al equipo.
4. Tomar la lectura que se muestra en la pantalla de la computadora.

13.3 DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ADN (61)

El análisis de los productos de la extracción del ADN se realiza mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8% teñidos con SYBR Green^{MR}.

La agarosa es un polisacárido altamente purificado derivado del agar. Se utiliza para separar macromoléculas tales como ácidos nucleicos y grandes complejos proteicos. Tienen un menor poder de resolución que la poliacrilamida pero una gran rango de separación, tal que pueden ser separadas moléculas de ADN desde 100 pb hasta aproximadamente 50.000 pb (variando las concentraciones de agarosa). El tamaño del poro del gel puede ser predeterminado ajustando su concentración en el gel; entonces a mayor concentración menor tamaño de poro.

Técnica.

1. Se prepara el gel de agarosa al 0.8% (se adicionan 100 mL de buffer TE a 0.8 g de agarosa, se tapa y calienta hasta que hierva; dejar enfriar).
2. Se adicionan 1.5 µL de colorante SYBR Green (Invitrogen).
3. Previamente se colocan los vidrios con sus separadores en la cámara para gelificar, se agrega la solución de agarosa al 0.8% y por último se coloca el peine y se deja que el gel polimerice, aproximadamente 30 minutos.
4. Una vez que el gel ha polimerizado se retira el peine.
5. Se coloca el gel en la cámara de electroforesis y se agrega buffer TBE1x (Buffer Tris-base 242 g, Borato, EDTA 100 mL), procurando cubrir bien la superficie del gel.
6. Se prepara una mezcla de 5 µL de ADN y 2 µL de jugo azul (azul de bromofenol 0.25%, glicerol 30%, xilencianol 0.25%).
7. Se agrega 7 µL de la mezcla anterior a cada pozo, así como 4 µL de marcador de peso molecular.
8. Se conectan los cables a la fuente de poder y se corre a 80 volts por 45 minutos aproximadamente.
9. Finalmente, se visualizan los fragmentos de ADN sobre una cámara de luz ultravioleta.

13.4 AMPLIFICACIÓN DE REGIONES GÉNICAS ESPECÍFICAS MEDIANTE PCR (48,62)

La metodología para genotipificar el polimorfismo de *LTA* +252 A/G se llevó a cabo mediante PCR específica de alelo. La PCR es un método de síntesis in vitro de ácidos nucleicos, por medio de la cual un segmento de ADN o ácido ribonucleico (ARN) específico, es amplificado. Esta metodología involucra iniciadores que flanquean el fragmento de ADN por ser amplificado, así como los ciclos repetidos de desnaturalización para separar la doble hebra de ADN, seguido del alineamiento o apareamiento de los iniciadores a sus secuencias complementarias en las hebras de ADN blanco, y la extensión o polimerización de los iniciadores alineados mediante la ADN polimerasa termoestable en

dirección 5' – 3', lo que permite el análisis de secuencias cortas de cantidades muy pequeñas de ADN o ARN. De esta forma se amplificó un fragmento de la región promotora del gen de *LTA*.

La secuencia del promotor de la proteína LTA se tomó del banco de promotores. Para la amplificación del segmento deseado se diseñaron iniciadores con el programa FastPCR. Las condiciones y secuencias de los primers son las siguientes:

Linfotoxina alfa Intrón 1+252	Primer genérico (antisentido)	5'-agatcgacagagaaggggaca-3'
Linfotoxina alfa Intrón 1+252	Primer G (sentido)	5'-cattctctgttctgcatgg-3' (alelo linfotoxina alfa 1)
Linfotoxina alfa Intrón 1+252	Primer A (sentido)	5'-cattctctgttctgcatga-3' (alelo linfotoxina alfa 2)
Tamaño del producto obtenido por PCR= 112 pb		

Los requerimientos para preparar la mezcla de reacción para cada tubo de muestra por separado es la que se presenta en el siguiente cuadro:

Cuadro 11. Concentraciones de reactivos para linfotoxina alfa +252 A/G para su amplificación por reacción en cadena de la polimerasa

Reactivo	Concentración
Solución amortiguadora 10X	1.0 X
MgCl ₂	1.5 mM
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP)	200.0 mM
Oligos HGH (sentido y antisentido)	0.1 µM
Oligos específicos (sentido y antisentido)	0.7 µM
Taq ADN polimerasa	0.1 U/µL
ADN molde	100.0 ng/10 µL
Agua bidestilada c.b.p.	10.0 µL

Se amplificó conjuntamente, en cada mezcla de reacción, un fragmento conservado del gen de la hormona de crecimiento humana (HGH, por sus siglas en inglés), como control positivo de reacción. De esta manera se evita la asignación falsa de individuos homocigotos para un determinado polimorfismo.

Una vez preparada la mezcla de reacción de cada muestra, se colocan los tubos en el termociclador (GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems) con el siguiente programa:

Cuadro 12. Ciclos de temperatura para la reacción en cadena de la polimerasa de linfotóxina alfa +252 A/G

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	5 min
2	95	30 seg
3	67	40 seg
4	72	40 seg
5 10 ciclos		
6	95	30 seg
7	60	50 seg
8	72	50 seg
9 25 ciclos		
10	72	7 min
11	4	∞

13.5 ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR (63)

Los productos de PCR se someten a electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% y se tiñen con nitrato de plata al 0.2%. Las bandas con peso aproximado de 112 pb se cortan y se observan en el gel teñido.

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 finalmente 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 agregan 2 μ L de jugo azul a cada uno de los tubos con los productos de PCR.
2. Se vortexean y se centrifugan a 8000 rpm por 10 segundos.
3. En cada pozo se depositan 6.5 μ L de la mezcla anterior y 4 μ L de un marcador para determinar el peso molecular.
4. Se conectan los cables a una fuente de poder y se corre a 180 volts por 45 minutos aproximadamente.

13.6 TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA (64)

El uso de nitrato de plata tiene la característica de producir 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 preciso 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.

La tinción con nitrato de plata se desglosa en varias fases:

1. La primera consiste en la fijación con solución fijadora, donde las proteínas son inmovilizadas en el gel y se remueven compuestos que podrían causar alguna interferencia, por 10 minutos.
2. La segunda es la impregnación con plata, por 5 minutos.
3. Se sigue de una fase de lavado con agua destilada, por 3 minutos.
4. La última fase es el revelado de la imagen con solución reveladora, se agrega formaldehído y se deja el tiempo suficiente hasta que aparezcan las bandas, una vez que aparecen con la intensidad deseada se debe retirar de la solución.

13.7 IDENTIFICACIÓN ALÉLICA EN LOS GELES DE POLIACRILAMIDA

Para cada uno de los sujetos de estudio se utilizaron 2 carriles adyacentes en los geles de poliacrilamida. El primer carril correspondió al alelo A y el segundo al alelo G, del gen de *LTA* +252. Las bandas con peso aproximado de 112 pb se cortaron y se observaron en el gel teñido; el tamaño de los productos obtenidos por PCR fue corroborado con el uso de un marcador de pares de bases.

Las lecturas se realizaron como se describe a continuación:

1. Homocigoto AA. Cuando se observó una banda en el primer carril y ninguna en el segundo.
2. Heterocigoto AG. Cuando se observó una banda en ambos carriles.
3. Homocigoto GG. Cuando se observó una banda en el segundo carril y ninguna en el primero.

Además, se utilizó una muestra de alelos ya conocidos previamente como control positivo y un control negativo sin ADN, con el fin de corroborar la lectura correcta de los alelos.