



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas**

**“Expresión diferencial en células sanguíneas de pacientes diabéticos asociada con pobre control glicémico”**

Tesis para obtener el grado de:

**Maestría en Ciencias Farmacobiológicas**

Presenta:

**Cisneros Méndez Ana Laura**

Director de Tesis:

**Dr. José Antonio Enciso Moreno**

Codirector de Tesis:

**Dra. Diana Patricia Portales Pérez**

---

---

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.

Enero 2024



REPOSITORIO INSTITUCIONAL



**UASLP-Sistema de Bibliotecas**

**Repositorio Institucional Tesis digitales Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS**

**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en este Trabajo Terminal está protegido por la Ley Federal de Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos.

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo, mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto o con fines de lucro, reproducción, edición o modificación será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Expresión diferencial en células sanguíneas de pacientes diabéticos asociada con pobre control glicémico por Ana Laura Cisneros Méndez se distribuye bajo una licencia CC BY-NC-ND 4.0. Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional  
Para ver una copia de esta licencia, visite <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/> © 2 por A.

Este proyecto se realizó en la Unidad de Investigación Biomédica de Zacatecas adscrita al Instituto Mexicano del Seguro Social, en el periodo comprendido entre Agosto 2020 y Enero 2024, bajo la dirección del Dr. José Antonio Enciso Moreno. El presente trabajo de tesis forma parte del proyecto “Exacerbación de Tuberculosis mediada por Diabetes: Un programa de Investigación clínica y experimental” con número de registro R-2018-785-118, el cual fue aprobado por el comité científico y de ética del IMSS.

El programa de Maestría en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 003382, en el Nivel maestría. Número de registro de la beca otorgada por CONACyT: 781935. Número de CVU: 937659

Los datos del trabajo titulado Expresión diferencial en células sanguíneas de pacientes diabéticos asociada con pobre control glicémico se encuentran bajo el resguardo de la Unidad de Investigación Biomédica de Zacatecas y pertenecen a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

**Aprobación de Tema de Terminal**

San Luis Potosí SLP a 29 / 01 /2024

**Comité Académico**

La presente es para que quede asentado que el tema de Tesis de maestría:

***"Expresión diferencial en células sanguíneas de pacientes diabéticos asociada con pobre control glicémico"***

De la estudiante: **Ana Laura Cisneros Méndez**, que se llevará a cabo en la Unidad de Investigación Biomédica de Zacatecas (IMSS), es **APROBADO**.

Sin más por el momento, quedo de Uds.

**ATENTAMENTE**



---

Dr. Sergio Zarazúa Guzmán  
Coordinador del Posgrado



**Dirección de Prestaciones Médicas**  
 Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud  
 Coordinación de Investigación en Salud



### Dictamen de Aprobación

Martes, 23 de octubre de 2018

Ref. 09-B5-61-2800/2018002660

Dr. José Antonio Enciso Moreno  
 Unidad de Investigación Médica Zacatecas (UNIDAD DE INVESTIGACION BIOMEDICA)  
 Zacatecas

Presente:

Informo a usted que el protocolo titulado: **Exacerbación de Tuberculosis mediada por Diabetes: Un programa de Investigación clínica y experimental enfocado a la identificación de las huellas moleculares que definen la susceptibilidad de los pacientes con diabetes a desarrollar esta comorbilidad**, fue sometido a la consideración de este Comité Nacional de Investigación Científica.

Los procedimientos propuestos en el protocolo cumplen con los requerimientos de las normas vigentes, con base en las opiniones de los vocales del Comité de Ética en Investigación y del Comité de Investigación del Comité Nacional de Investigación Científica del IMSS, se ha emitido el dictamen de **APROBADO**, con número de registro: R-2018-785-118.

De acuerdo a la normatividad vigente, deberá informar a esta Comité en los meses de enero y julio de cada año, acerca del desarrollo del proyecto a su cargo. Este dictamen sólo tiene vigencia de un año. Por lo que en caso de ser necesario requerirá solicitar una reaprobación al Comité de Ética en Investigación del Comité Nacional de Investigación Científica, al término de la vigencia del mismo.

Atentamente,

Dr. Fabio Salas  
 Presidente  
 Comité Nacional de Investigación Científica

Anexo comentarios:  
 Se anexa dictamen  
 SNN/ iah. F-CNIC-2018-150

**IMSS**

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

4º piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos Av. Constitución 330 Col. Doctores 06720 56276900 ext. 21210 corisa@cls.gob.mx



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas**

**“Expresión diferencial en células sanguíneas de pacientes diabéticos asociada con pobre control glicémico”**

Tesis para obtener el grado de:

**Maestría en Ciencias Farmacobiológicas**

Presenta:

**Cisneros Méndez Ana Laura**

**SINODALES:**

**Presidente:**

**Dr. José Antonio Enciso Moreno**

**Secretario:**

**Dra. Diana Patricia Portales Pérez**

**Vocal:**

**Dra. Perla Del Carmen Niño Moreno**

**Vocal:**

**Dra. Edith Elena Uresti Rivera**

---

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.

Enero 2024

## **INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORIAL ACADÉMICO**

Dr. José Antonio Enciso Moreno: Director de tesis. Adscrito a la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, Qro.

Dra. Diana Patricia Portales Pérez: Codirector de tesis. Adscrita al Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dra. Perla Del Carmen Niño Moreno: Sinodal de tesis. Adscrita al Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dra. Edith Elena Uresti Rivera: Codirector de tesis. Adscrita al Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

Facultad de Ciencias Químicas  
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado  
Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas  
Programa de Maestría

Formato M5

**Carta Cesión de Derechos**

San Luis Potosí SLP a 26 de Enero de 2024

En la ciudad de San Luis Potosí el día 26 del mes de enero del año 2024. La que suscribe **Ana Laura Cisneros Méndez** Alumna del programa de posgrado en Ciencias Farmacobiológicas adscrito a la **Facultad de Ciencias Químicas** manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo terminal, realizado bajo la dirección de: **Dr. José Antonio Enciso Moreno** y cede los derechos del trabajo titulado **Expresión diferencial en células sanguíneas de pacientes diabéticos asociada con pobre control glicémico** la **Universidad Autónoma de San Luis Potosí**, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir de forma total o parcial texto, gráficas, imágenes o cualquier contenido del trabajo si el permiso expreso del o los autores. Éste, puede ser obtenido directamente con el autor o autores escribiendo a la siguiente dirección [ana\\_laura\\_cisneros@outlook.com](mailto:ana_laura_cisneros@outlook.com). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

---

Ana Laura Cisneros Méndez

### Carta de Análisis de Similitud

San Luis Potosí SLP a 01/17/2024

**L.B. María Zita Acosta Nava**  
Biblioteca de Posgrado FCQ

**Asunto:** Reporte de porcentaje de similitud de tesis de grado

Por este medio me permito informarle el porcentaje de similitud obtenido mediante Ithenticate para la tesis titulada ***"Expresión diferencial en células sanguíneas de pacientes diabéticos asociada con pobre control glicémico"*** presentada por la autora **Ana Laura Cisneros Méndez**. La tesis es requisito para obtener el grado de Maestría en el Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas. El análisis reveló un porcentaje de similitud de **21 %** excluyendo referencias y metodología.

Agradezco sinceramente su valioso tiempo y dedicación para llevar a cabo una exhaustiva revisión de la tesis. Quedo a su disposición para cualquier consulta o inquietud que pueda surgir en el proceso.

Sin más por el momento, le envío un cordial saludo.



**Dr. Sergio Zarazúa Guzmán**

Coordinador Académico del Posgrado  
en Ciencias Farmacobiológicas

## **AGRADECIMIENTO.**

Quiero agradecer primeramente a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí por haberme brindado la oportunidad de llevar a cabo mis estudios de Maestría, así mismo al Posgrado de Ciencias Farmacobiológicas, a mi comité tutorial conformado por la Dra. Diana Patricia Portales Pérez, la Dra. Perla Del Carmen Niño Moreno y la Dra. Edith Elena Uresti Rivera por haberme apoyado y asesorado en todo momento durante mi trayecto en el posgrado y a los docentes en general que conforman el programa por haberme brindado los conocimientos necesarios para mi egreso.

Un agradecimiento especial a la Unidad de Investigación Biomédica de Zacatecas del IMSS por haberme brindado la valiosa oportunidad de formar parte de su proyecto, en lo particular al Dr. José Antonio Enciso Moreno del cual me llevo una gran admiración del valioso trabajo que realiza, agradezco su asesoría y todo su tiempo invertido en mí, llevándome un gran aprendizaje tanto experimental como cultural.

Al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT por la beca que me fue otorgada, la cual me ayudo a concluir con mis estudios de posgrado.

## **DEDICATORIA.**

Dedico el presente trabajo a mis padres José Manuel Cisneros Hernández y Elvia Méndez Portillo por todo su amor y apoyo incondicional depositando siempre su confianza en mí. Y les agradezco por formar en mi a la persona que siempre desee ser, siempre seguiré adelante implementando sus consejos llenos de sabiduría y amor.

A mis hermanos Víctor Manuel, Hugo Armando y Minerva por todos sus consejos y apoyo, por hacer que mis días siempre tengan un motivo para seguir adelante.

A mis amigos que siempre me han motivado para ser mejor cada día y concluir con mis metas.

A Claudia Paola Saucedo Mauricio quien es una persona muy especial para mí, que se convirtió en mi soporte y apoyo emocional del día a día.

## **RESUMEN.**

La diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) es una epidemia que tiene un gran impacto en la Salud Pública a nivel mundial. Nuestro grupo de trabajo identificó un transcriptoma específico que se asoció al grupo de pacientes con diabetes de pobre control glicémico (PDM2), el cual incluye la sobreexpresión de los genes NPRL3, GP9, DPM2, KLC3 y RGS10. Se evaluó por qPCR los niveles de expresión de dichos genes en sujetos sanos (CTRL), con pre-diabetes (PreDM2), con diabetes de adecuado control glicémico (DM2) y de pobre control glicémico (PDM2) en muestras de sangre total periférica. Se encontró una sobreexpresión de los genes GP9, KLC3 y DPM2. Un número mayor de muestras nos podría permitir un análisis con mayor poder estadístico para establecer o descartar diferencias significativas.

**PALABRAS CLAVE:** Diabetes *Mellitus* tipo 2, Pobre control glicémico, Sobreexpresión, Metabolismo, qPCR.

## **ABSTRACT.**

Type 2 diabetes *mellitus* (DM2) is a worldwide epidemic that has a great impact on Public Health. Our work group identified a specific transcriptome associated with the group of patients with diabetes with poor glycemic control (PDM2). Those findings shown that there was an overexpression of the NPRL3, GP9, DPM2, KLC3 and RGS10 genes. We evaluated the expression levels of these genes by qPCR in healthy (CTRL), pre-diabetes (PreDM2), adequate glycemic control diabetes (DM2) and poor glycemic control (PDM2) subjects, in peripheral whole blood samples. Our data revealed that there is an overexpression of the GP9, KLC3 and DPM2 genes. A larger sample size could allow us to perform an analysis with greater statistical power to establish or rule out significant differences.

**KEY WORDS:** Diabetes Mellitus type 2, Poor glycemic control, Overexpression, Metabolism, qPCR.

## **INDICE GENERAL.**

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2 .....	1
1.2 Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2 con pobre control glicémico. ....	22
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>23</b>
2.1 Transcriptoma.....	23
2.2 Perfil transcripcional.....	23
2.3 Antecedentes directos.....	24
2.4 Características de los genes seleccionados para los análisis de qPCR.....	30
2.4.1 Gen NPRL3. ....	30
2.4.2 Gen GP9.....	31
2.4.3 Gen DPM2.....	31
2.4.4 Gen KLC3.....	32
2.4.5 Gen RGS10. ....	32
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>33</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>34</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
6.1 Diseño de estudio. ....	35
6.2 Grupos de estudio.....	35
6.3 Criterios de selección de los individuos.....	36
6.3.1 Criterios de inclusión.....	36
6.3.2 Criterios de exclusión.....	37
6.4 Recolección, estabilización y conservación de las muestras sanguíneas.....	37
6.5 Extracción de RNA total. ....	37
6.6 Síntesis de cDNA.....	38
6.7 Diseño de oligonucleótidos. ....	39
6.8 Purificación de oligonucleótidos. ....	40
6.9 Electroforesis de oligos.....	41
6.10 Amplificación de genes por qPCR cuantitativo (SSoFast-EvaGreen). ....	41
6.11 Determinación de la expresión relativa.....	43
6.12 Pruebas estadísticas.....	44

<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	44
7.1 Grupos de estudio.....	44
7.2 Integridad y calidad de RNA y cDNA.....	45
7.3 Estandarización para la amplificación de cada Gen por qPCR.....	45
7.4 Expresión de los genes NPRL3, GP9, DPM2, KLC3 y RGS10 en los grupos CTRL, DM2, PreDM2 y PDM2. ....	47
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	56
<b>9. BIBLIOGRAFIAS.....</b>	57
<b>10. ANEXOS. ....</b>	66

## **1. INTRODUCCIÓN.**

### **1.1 Diabetes *Mellitus* tipo 2.**

La diabetes es una enfermedad compleja y debilitante que afecta aproximadamente a 463 millones de personas en el mundo y se estima que en 2035 esta cifra aumentará a 478 millones [1]. La Diabetes *Mellitus* tipo 2, es un tipo de diabetes que representa del 90 al 95% de los casos nuevos de esta enfermedad. Es un grave problema de Salud Pública que en 2019 se colocó en el noveno lugar de las principales causas de muerte en el mundo [2].

México es uno de los países que tiene una de las mayores tasas de mortalidad por la diabetes *mellitus* tipo 2, que ha ido en aumento desde el año 1980 [3,4]. Así la diabetes es la segunda causa de muerte a nivel nacional y la tasa de mortalidad por diabetes para 2020 es de 11.95 personas por cada 10 mil habitantes [5].

La diabetes *mellitus* tipo 2 afecta en gran medida la calidad de vida de los pacientes y la de sus familiares, ya que el costo en los servicios del sector salud impacta de manera importante en la economía de los pacientes y su familia, tanto en los países desarrollados como en los que se encuentran en desarrollo [1, 6, 7]

Las causas que desencadenan la diabetes *mellitus* tipo 2 se desconocen; sin embargo, influyen diversos factores de riesgo como: herencia poligénica (en la que participa un número indeterminado de genes), la obesidad, dislipidemia, hipertensión arterial, historia familiar de diabetes, dieta rica en carbohidratos, factores hormonales y una vida sedentaria [8]. Es relevante mencionar que el sobrepeso y la obesidad son los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de diabetes de tipo 2 [2, 6].

La fisiopatología de la diabetes *mellitus* tipo 2 involucra al menos siete órganos y tejidos, incluidos el páncreas, el hígado, el músculo esquelético, el tejido adiposo, el cerebro, el tracto gastrointestinal y el riñón [3]. Por lo que la diabetes *mellitus* tipo 2 tiene un carácter crónico-degenerativo a nivel orgánico.

Cuando existe un aumento en la concentración plasmática de carbohidratos, se activan los mecanismos moleculares que conducen a la despolarización de las células  $\beta$  pancreáticas y la posterior liberación de insulina por las mismas. El mecanismo es el siguiente: Los azúcares ingresan a las la célula  $\beta$  a través de GLUT2. El GLUT2 es un transportador de glucosa con baja afinidad, se expresa en el hígado, riñón, células  $\beta$  del páncreas y en la membrana basolateral de las células epiteliales del intestino delgado. GLUT2 sólo permite el transporte de glucosa cuando la concentración plasmática alcanza el umbral de afinidad como sustrato de GLUT2 ( $>70\text{mg/dL}$ ), y en respuesta, conduce a la liberación de la cantidad requerida de insulina para mantener la concentración de glucosa. Después de la ingesta de alimento, el hígado incorpora la glucosa a través de GLUT2 para generar glucógeno. De forma inversa, durante el período postprandial tardío (6 y 8 horas de ayuno), el glucógeno se degrada para generar glucosa, que se liberan de la célula hepática a la circulación sistémica, preservando la glucemia en valores fisiológicos [9, 10].

Los pacientes presentan niveles elevados de glucosa y resistencia a la acción de la insulina en los tejidos periféricos. Del 80 al 90% de las personas tienen células  $\beta$  sanas con capacidad de adaptarse a altas demandas de insulina (obesidad, embarazo y cortisol) mediante el incremento en su función secretora y en la masa celular. Sin embargo, en el 10 al 20% de las personas se presenta una deficiencia de las células  $\beta$ , lo cual produce un agotamiento celular que conduce a una, reducción en la liberación y almacenamiento de insulina [11]. Por lo tanto, la diabetes *mellitus* tipo 2 se asocia con una falta de adaptación en la demanda de insulina, además de pérdida de la masa celular por la glucotoxicidad. De manera fisiológica, cuando la insulina se une a su receptor en células del músculo, inicia las vías de señalización que permiten la translocación del transportador GLUT4 localizado en vesículas hacia la membrana plasmática para llevar a cabo su función. Se ha reportado que el receptor de la insulina de pacientes con diabetes *mellitus* tipo 2 presenta alteraciones en la activación, número y funcionalidad [8]. Entre las más

comunes se encuentran la disminución en el número de receptores de insulina y de su actividad catalítica. Se ha observado un incremento en el estado de fosforilación en residuos de Ser/Thr del receptor de insulina y del IRS (sustrato del receptor de insulina), así como en la actividad de fosfatasas de residuos de Tyr, principalmente PTP1B, que es necesario para la desfosforilación del receptor y del IRS. De igual manera existe una disminución de la actividad de las cinasas PI3K y Akt, y se presentan defectos en la expresión y función del GLUT-4. Estas alteraciones disminuyen la incorporación de glucosa en el tejido muscular y adiposo promoviendo un desbalance a nivel metabólico [12].

La diabetes mellitus tipo 2 es uno de los trastornos metabólicos más comunes en todo el mundo y su desarrollo se debe principalmente a una combinación de dos factores principales que son la secreción defectuosa de insulina por las células  $\beta$  pancreáticas y la incapacidad de los tejidos sensibles a la insulina para responder a la insulina. La liberación y acción de la insulina deben satisfacer con precisión la demanda metabólica; los mecanismos moleculares implicados en la síntesis y liberación de insulina, así como la respuesta a la insulina en los tejidos, deben estar estrictamente regulados. Por tanto, defectos en cualquiera de los mecanismos implicados pueden provocar un desequilibrio metabólico que conduzca a la patogénesis de la DM2 [13].

La causa de la resistencia a la insulina en la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2 no se limita a la alteración de la señalización de la insulina, sino que también implica la compleja interacción de múltiples vías metabólicas. El análisis de grandes conjuntos de datos generados por la metabolómica y la lipidómica ha arrojado nueva luz sobre el papel de metabolitos como los lípidos, los aminoácidos y los ácidos biliares en la modulación de la sensibilidad a la insulina [14].

La curación de las heridas cutáneas depende de la progresión a través de fases distintas, aunque superpuestas, de la curación de la herida, que incluyen hemostasia, inflamación, proliferación y resolución/remodelación. El hecho de que

estas fases no ocurran de manera oportuna y progresiva promueve la curación de heridas patológicas [15].

El conocimiento de los registros de inflamación se remonta al siglo I d.C. Inicialmente descubierto con características de rubor, tumor, calor y dolor, las investigaciones científicas han revelado componentes químicos, células y vías involucradas en el proceso de inflamación [16].

La diabetes mellitus tipo 2 es una enfermedad endocrina y metabólica crónica que a menudo se asocia con sobrepeso u obesidad. Afecta a millones de personas en todo el mundo, con una incidencia y prevalencia en rápido aumento. La última estimación de la Federación Internacional de Diabetes equivale a una tasa de prevalencia global del 8,4% de la población adulta, mientras que los casos de diabetes en todo el mundo alcanzaron un nuevo récord con 382 millones en 2013 [17]. La Diabetes Mellitus (DM) es un trastorno metabólico caracterizado por hiperglucemia como consecuencia de defectos en la secreción de insulina, en el mecanismo de acción de la insulina o tanto en la secreción como en la acción de la insulina [18].

Según la Organización Mundial de la Salud la diabetes mellitus es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por niveles elevados de glucosa en sangre, lo que con el tiempo provoca daños en el corazón, la vasculatura, los ojos, los riñones y los nervios [13].

Los metabolitos pueden regular la sensibilidad a la insulina directamente modulando componentes de la vía de señalización de la insulina, como los sustratos del receptor de insulina (IRS) y AKT, e indirectamente alterando el flujo de sustratos a través de múltiples vías metabólicas, incluida la lipogénesis, la oxidación de lípidos, la síntesis y degradación de proteínas y gluconeogénesis hepática. Además, la modificación postraduccional de proteínas por metabolitos y lípidos, incluidas la acetilación y la palmitoilación, puede alterar la función de las proteínas [14].

Los determinantes de esta tendencia en constante aumento es la combinación de

factores genéticos y ambientales responsables de un equilibrio energético positivo que resulta en acumulación de grasa corporal y aumento de peso y/o un gasto energético reducido debido a una reducción de la actividad física y un estilo de vida sedentario [17].

La aparición de la enfermedad está asociada a factores de riesgo genético, ambientales y/o comportamentales. La DM frecuentemente ocurre en sinergia o concomitante con otros desequilibrios sistémicos, como la dislipidemia, una disfunción metabólica que resulta de un aumento del nivel de lipoproteínas en la sangre. Sin embargo, incluso cuando los niveles de glucosa en sangre están bien controlados, los pacientes diabéticos tienen propensión a niveles elevados de lipoproteínas/triglicéridos de baja densidad (LDL/TRG) [18].

La DM2 es una afección caracterizada por una secreción deficiente de insulina por las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos, resistencia tisular a la insulina (RI) y una respuesta secretora de insulina compensatoria inadecuada. La progresión de la enfermedad hace que la secreción de insulina sea incapaz de mantener la homeostasis de la glucosa, produciendo hiperglucemia [13].

A pesar de los amplios intentos de tratamiento clínico de la DM2, muchos pacientes diabéticos desarrollarán una amplia variedad de complicaciones a largo plazo, incluidas retinopatía, nefropatía y enfermedades cardiovasculares que se encuentran entre las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad en las personas afectadas, cuya prevención y tratamiento eficaces requieren enormes esfuerzos y financiación [17].

Por lo general, la DM2 se presenta como una enfermedad común, heterogénea y compleja en la que tanto los factores genéticos predisponentes como los factores ambientales precipitantes interactúan entre sí y causan hiperglucemia, que constituye la característica principal de la DM2. Esto está respaldado por una serie de evidencias, incluida la fuerte agregación familiar de la enfermedad, en la que el riesgo de desarrollar DM2 es del 40% para quienes tienen un progenitor afectado

(mayor si es la madre que el padre) y del 70% si ambos padres son diabéticos. El mayor riesgo en los familiares de primer grado, en comparación con la población general, persiste incluso después de la separación de la familia de origen, por ejemplo, como resultado de una adopción. Además, en gemelos monocigóticos idénticos (con composición genética idéntica), la tasa de concordancia para la enfermedad se acerca al 100%, mucho más alta que la observada en gemelos no idénticos (dicigóticos) o entre hermano [17].

Otro factor de riesgo bien conocido para la DM es la periodontitis, una enfermedad inflamatoria compleja que conduce a la pérdida del soporte dental a través de la pérdida de hueso periodontal y alveolar [18].

Los pacientes con DM2 se caracterizan en su mayoría por ser obesos o tener un mayor porcentaje de grasa corporal, distribuida predominantemente en la región abdominal. En esta afección, el tejido adiposo promueve la RI a través de varios mecanismos inflamatorios, incluido el aumento de la liberación de ácidos grasos libres (AGL) y la desregulación de adipocinas [13].

El metabolismo de los nutrientes es fundamental para la supervivencia, el crecimiento y el desarrollo de todos los organismos y requiere la regulación coordinada de muchas vías metabólicas. La insulina regula el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas a través de la cascada de señalización de la insulina canónica, que involucra al receptor de insulina (IR), las proteínas sustrato del receptor de insulina (IRS), PI3K y AKT [14].

La predisposición genética a la DM2 también está respaldada por la observación de que existen diferencias en las tasas de prevalencia de la enfermedad entre las poblaciones, incluso después de la migración de grupos étnicos enteros a otro país, por lo que son independientes de las influencias ambientales [17].

Los principales impulsores de la epidemia de DM2 son el aumento mundial de la obesidad, los estilos de vida sedentarios, las dietas altas en calorías y el

envejecimiento, que han cuadruplicado la incidencia y prevalencia de la DM2 [13].

Por otro lado, es igualmente bien conocido el papel de los factores ambientales a la hora de influir en la susceptibilidad a la DM2. Entre estos factores se encuentran el aumento de la ingesta calórica y el sedentarismo, dos condiciones comunes en poblaciones con un nivel de vida más alto y un estilo de vida más occidentalizado, responsables de la mayor parte del exceso de peso y la obesidad en la vida del adulto moderno. La difusión del modo de vida occidental en los países en desarrollo también explica la explosión epidémica de la enfermedad, mientras que los datos epidemiológicos existentes muestran que la distribución espacial y temporal de la DM2 en las zonas geográficas examinadas es comparable a la tendencia de tener sobrepeso y obesidad. El exceso de peso provoca resistencia a la insulina, que representa el paso inicial en la historia natural de la DM2 [17].

Los órganos implicados en el desarrollo de DM2 incluyen el páncreas (células  $\beta$  y  $\alpha$ ), hígado, músculo esquelético, riñones, cerebro, intestino delgado y tejido adiposo. Los datos en evolución sugieren un papel de la desregulación de las adipocinas, la inflamación y las anomalías en la microbiota intestinal, la desregulación inmune y la inflamación han surgido como factores fisiopatológicos importantes [13].

Inicialmente, en individuos destinados a convertirse en diabéticos, las células  $\beta$  pancreáticas compensan la resistencia a la insulina secretando niveles elevados de insulina, asegurando así la glucemia posprandial. La hiperglucemia en sujetos resistentes a la insulina se desarrolla más tarde, cuando las células  $\beta$  no logran compensar. Por tanto, desde un punto de vista fisiopatológico, la DM2 se caracteriza por una combinación de resistencia periférica a la insulina y una secreción inadecuada de insulina por parte de las células  $\beta$  pancreáticas. Como lo respaldan numerosos estudios en la literatura, ambos defectos son el resultado de una interacción compleja entre factores genéticos y ambientales, incluidos agentes químicos (iones de calcio y zinc) y sustancias orgánicas contaminantes que se sospecha que desempeñan un papel en la formación de fibras amiloides en las

células  $\beta$  pancreáticas, contribuyendo así a la patología de la DM2 [17].

Es probable que la carga de enfermedad de la DM2 esté subrepresentada, ya que 1 de cada 3 personas diabéticas estaba infradiagnosticada, lo que equivale a 232 millones de personas. El mayor número de personas que padecen diabetes tiene entre 40 y 59 años [13].

La incidencia y prevalencia de la DM2 varían según la región geográfica, y más del 80% de los pacientes viven en países de ingresos bajos a medianos, lo que plantea desafíos adicionales para un tratamiento eficaz. Los pacientes con DM2 tienen un riesgo 15% mayor de mortalidad por todas las causas en comparación con las personas sin diabetes con enfermedad cardiovascular (ECV) como la mayor causa de morbilidad y mortalidad asociada con la DM2 [13].

La epidemiología de la DM2 se ve afectada tanto por la genética como por el medio ambiente. Los factores genéticos ejercen su efecto tras la exposición a un entorno caracterizado por un comportamiento sedentario y una ingesta elevada de calorías. Se han identificado variantes genéticas glucémicas comunes para la DM2 mediante estudios de asociación de todo el genoma, pero éstas sólo representan el 10% de la varianza total del rasgo, lo que sugiere que las variantes raras son importantes [13].

La resistencia a la insulina, definida como una alteración de la transducción de señales y de las acciones biológicas en respuesta a la estimulación de la insulina, es un mecanismo fundamental que causa la DM2. Cuando la secreción de insulina ya no puede compensar la resistencia a la insulina, se produce DM2. A pesar del creciente conocimiento sobre la cascada de señalización de la insulina, hay pocos agentes sensibilizantes a la insulina disponibles para tratar la DM2 en la clínica. Es difícil apuntar directamente a la vía de señalización de la insulina para mejorar la sensibilidad a la insulina en pacientes con DM2, y existe la preocupación de que la activación de PI3K y AKT pueda aumentar el riesgo de cáncer o exacerbarlo [14].

En cuanto a la fisiopatología de la enfermedad, un mal funcionamiento de los circuitos de retroalimentación entre la acción y la secreción de insulina da como

resultado niveles anormalmente altos de glucosa en sangre [13].

En el caso de disfunción de las células  $\beta$ , la secreción de insulina se reduce, lo que limita la capacidad del cuerpo para mantener niveles fisiológicos de glucosa. Por otro lado, la IR contribuye a una mayor producción de glucosa en el hígado y a una disminución de la captación de glucosa tanto en el músculo, como en el hígado y el tejido adiposo. Incluso si ambos procesos tienen lugar temprano en la patogénesis y contribuyen al desarrollo de la enfermedad, la disfunción de las células  $\beta$  suele ser más grave que la RI. Sin embargo, cuando están presentes tanto la disfunción de las células  $\beta$  como la IR, la hiperglucemia se amplifica y conduce a la progresión de la DM2 [13].

Las células  $\beta$  son responsables de la producción de insulina, que se sintetiza como preproinsulina. En el proceso de maduración, la preproinsulina sufre una modificación conformacional llevada a cabo con la ayuda de varias proteínas en el retículo endoplásmico (RE) para producir proinsulina. Posteriormente, la proinsulina se traslada desde el RE al aparato de Golgi (GA), entra en vesículas secretoras inmaduras y se escinde en péptido C e insulina [13].

Desde 2007 en adelante, la lista de genes candidatos ha crecido considerablemente, en gran parte debido a los estudios de asociación de todo el genoma (GWAS), una técnica comúnmente utilizada para encontrar vínculos entre genes y enfermedades en una población sustancial. Esta estrategia utiliza una base de datos de más de un millón de variantes genéticas conocidas, que representan la mayoría de todas las variantes comunes (frecuencia de alelos menores > 5%-10%), ofreciendo así la posibilidad de analizar simultáneamente miles de variaciones en un gran número de pacientes y realizar un metanálisis de datos de múltiples estudios. Esta metodología ha ayudado a identificar decenas de nuevas asociaciones entre DM2 y genes con funciones conocidas o desconocidas, lo que confirma algunos de los resultados de estudios anteriores [17].

Una vez madura, la insulina se almacena en gránulos hasta que se desencadena la

liberación de insulina. La liberación de insulina se desencadena principalmente por una respuesta a altas concentraciones de glucosa. Vale la pena señalar que algunos otros factores también pueden inducir la liberación de insulina, como aminoácidos, ácidos grasos y hormonas. Cuando aumentan los niveles de glucosa circulante, las células  $\beta$  absorben glucosa principalmente a través del transportador de glucosa 2 (GLUT2), una proteína transportadora de solutos que también funciona como sensor de glucosa para las células  $\beta$ . Una vez que la glucosa ingresa, se activa el catabolismo de la glucosa, aumentando la relación ATP/ADP intracelular, lo que induce el cierre de los canales de potasio dependientes de ATP en la membrana plasmática. Esto conduce a la despolarización de la membrana y la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes del voltaje, lo que permite que  $\text{Ca}^{2+}$  ingrese a la célula. El aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular desencadena el cebado y la fusión de los gránulos secretores que contienen insulina con la membrana plasmática, lo que da como resultado la exocitosis de insulina [13].

Sin embargo, otras señales celulares también pueden ayudar o mejorar la liberación de insulina de las células  $\beta$ . Entre ellos, el AMPc podría ser el mensajero más importante que potencia la liberación de insulina. La evidencia acumulada sugiere que el AMPc induce la movilización de vesículas secretoras que contienen insulina al agotar los reservorios de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Aumentando así las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. También hay pruebas convincentes de que el ATP extracelular es otro regulador importante de la función de las células  $\beta$ . Está bien documentado que las células  $\beta$  liberan ATP mediante exocitosis de gránulos de insulina tras la estimulación con glucosa. La señalización purinérgica a través de los receptores purinérgicos P2Y y P2X estimula la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  y regula la exocitosis de insulina también independientemente de la glucosa. Se ha informado que los purinorreceptores P2Y están acoplados a proteínas G, mientras que los receptores de tipo P2X son canales iónicos activados por ligando activados por ATP no selectivos para cationes. En el caso de los receptores P2Y, se ha propuesto que la liberación de insulina podría estar mediada por la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular

en respuesta a la formación de inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) que desencadena la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde las reservas del RE, que amplifica la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  que desencadena la exocitosis [13]. La disfunción de las células  $\beta$  se ha asociado tradicionalmente con la muerte de las células  $\beta$ . Sin embargo, evidencia reciente sugiere que la disfunción de las células  $\beta$  en la DM2 podría deberse a una red más compleja de interacciones entre el medio ambiente y diferentes vías moleculares implicadas en la biología celular. En un estado nutricional excesivo, similar al que se encuentra en la obesidad, suele presentarse hiperglucemia e hiperlipidemia, favoreciendo la RI y la inflamación crónica. En estas circunstancias, las células  $\beta$ , debido a diferencias en su susceptibilidad genética, están sujetas a presiones tóxicas que incluyen inflamación, estrés inflamatorio, estrés del RE, estrés metabólico/oxidativo, estrés amiloide, con el potencial de conducir en última instancia a una pérdida de la integridad de los islotes [13].

Un exceso de ácidos grasos libres y la hiperglucemia conducen a la disfunción de las células  $\beta$  al inducir estrés en el RE mediante la activación de las vías de respuesta apoptótica de la proteína desplegada (UPR). De hecho, la lipotoxicidad, la glucotoxicidad y la glucolipotoxicidad que ocurren en la obesidad inducen estrés metabólico y oxidativo que conduce al daño de las células  $\beta$ . El estrés derivado de altos niveles de ácidos grasos libres saturados puede activar la vía UPR mediante varios mecanismos, incluida la inhibición de la ATPasa  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarco/endoplasmático (SERCA), responsable de la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE; activación de los receptores IP3 o deterioro directo de la homeostasis del RE. Además, los niveles elevados sostenidos de glucosa aumentan la biosíntesis de proinsulina y los polipéptidos amiloideos de los islotes (IAAP) en las células  $\beta$ , lo que lleva a la acumulación de insulina e IAAP mal plegadas y aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediadas por el plegamiento de proteínas oxidativas. Estos efectos alteran la movilización fisiológica de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE y favorecen las señales proapoptóticas, la degradación del ARNm de proinsulina e inducen la liberación de interleucina (IL) -1  $\beta$  que recluta macrófagos y mejora la

inflamación local de los islotes [13].

Como se mencionó anteriormente, la secreción de insulina debe regularse con precisión para satisfacer con precisión la demanda metabólica. Por esa razón, se debe conservar la integridad adecuada de los islotes para permitir que las células  $\beta$  respondan a las necesidades metabólicas. En condiciones patogénicas, el mecanismo descrito anteriormente puede conducir en última instancia a la alteración de la integridad/organización de los islotes, perjudicando la comunicación óptima entre células dentro de los islotes pancreáticos, contribuyendo a una regulación deficiente de la liberación de insulina y glucagón y, en última instancia, exacerbando la hiperglucemia. Los defectos en la síntesis de cualquier precursor de insulina, o de la insulina misma, así como la alteración del mecanismo de secreción, pueden conducir a una disfunción secretora de insulina, el principal impulsor de la insuficiencia de las células  $\beta$  y una base de la DM2. Por ejemplo, la expresión reducida en el transportador de glucosa GLUT2 afectaría la vía de señalización posterior, mientras que la falla en el plegamiento de la proinsulina es otro hallazgo comúnmente relacionado con la producción deficiente de insulina y la diabetes [13].

En la era posgenómica, la integración de la genómica funcional, la transcriptómica, la proteómica, la metabolómica y la lipidómica ha ampliado nuestra comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes a la resistencia a la insulina y la DM2. La tecnología para analizar conjuntos de datos metabolómicos y lipidómicos está evolucionando rápidamente y nos ha permitido identificar nuevos metabolitos que regulan la sensibilidad a la insulina y/o nuevas funciones para metabolitos conocidos en este proceso [14].

Los lípidos tienen diversas funciones como moléculas de señalización, sustratos metabólicos y componentes de la membrana celular. Los lípidos también pueden modificar las proteínas que influyen en la sensibilidad a la insulina. La longitud de la cadena y el grado de desaturación de los restos de ácidos grasos en las moléculas de lípidos aumentan la complejidad de asignar funciones biológicas a las clases de

lípidos [14].

Además, el hecho de que los lípidos se sinteticen endógenamente o se obtengan a través de la dieta influye en su acumulación y/o metabolismo y en sus funciones biológicas posteriores. Por lo tanto, no es sorprendente que exista controversia sobre el papel causal y los mecanismos de los efectos de clases específicas de lípidos en el desarrollo de la resistencia a la insulina [14].

Los eicosanoides derivados de ácidos grasos, como las prostaglandinas, los tromboxanos y los leucotrienos, envían señales a través de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) para ejercer un amplio espectro de funciones biológicas. Desde entonces, se han identificado otros lípidos de señalización (como ácidos grasos, diacilglicerol (DAG), esfingolípidos y ésteres de ácidos grasos de hidroxiácidos grasos) que regulan las vías intracelulares para impactar la acción y el metabolismo de la insulina [14].

Los fosfolípidos son componentes principales de las membranas celulares y comprenden dos ácidos grasos en las posiciones de numeración estereoquímica (sn) -1 y sn-2 y un grupo fosfato modificado con alcohol en la posición sn-3. La fosfatidilcolina (PC) es el fosfolípido más abundante y representa entre el 40 y el 50% del total de fosfolípidos celulares; La fosfatidiletanolamina (PE), que se localiza en las membranas internas mitocondriales, es el segundo fosfolípido más abundante. La síntesis de PC y PE está controlada por diferentes enzimas, pero la PE se puede convertir enzimáticamente en PC. Las especies específicas de PC, en lugar de las concentraciones totales de PC, regulan la sensibilidad a la insulina [14].

Las modificaciones postraduccionales (PTM) de las proteínas aumentan la diversidad funcional del proteoma sin alterar la secuencia de aminoácidos. Los PTM regulan la actividad, localización e interacción de las proteínas con otros componentes celulares. Aunque la fosforilación y desfosforilación de proteínas son PTM comunes que regulan ampliamente la función de las proteínas, los lípidos y otros metabolitos no lipídicos pueden servir como sustratos para PTM adicionales,

entre los cuales se ha estudiado ampliamente la acetilación de proteínas mediada por acetil-CoA [14].

La acetil-CoA vincula el metabolismo de los nutrientes con muchas funciones biológicas, incluida la PTM de las proteínas en los residuos de lisina mediante acetilación. La acetilación, que regula la función de las proteínas, es un proceso reversible mediado por lisina acetiltransferasas (KAT) y desacetilasas (DAC). En levaduras, células madre y células cancerosas, la actividad de KAT y DAC está regulada por la disponibilidad de acetil-CoA, y los niveles elevados de acetil-CoA aumentan la acetilación de proteínas. Sin embargo, el acetil-CoA no modifica las proteínas de forma "inespecífica" porque las KAT tienen una K d variable para el acetil-CoA. Desafortunadamente, dilucidar si los niveles de acetil-CoA regulan la acetilación de proteínas en tejidos y órganos metabólicos es un desafío. Los niveles intracelulares de acetil-CoA *in vivo* están regulados por la disponibilidad de múltiples sustratos (glucosa, lípidos y aminoácidos), el flujo metabólico (determinado por el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), la lipogénesis de novo, la cetogénesis y la síntesis de esteroides) 149 e inter -diafonía de órganos (por ejemplo, la elevación de acetil-CoA en el hígado mediada por lipólisis adiposa). La dinámica de acetil-CoA puede explicar las discrepancias en los niveles de acetil-CoA tisular registrados en ratones obesos en un HFD con estudios que informan niveles elevados de 119 o reducidos de 149 de acetil-CoA hepático. Medir los niveles subcelulares de acetil-CoA también es un desafío técnico. Por lo tanto, se ha centrado la atención en estudiar la regulación de KAT y DAC por hormonas y señales ambientales y cómo esto afecta la función de las proteínas diana [14].

Los KAT y DAC pueden regular la sensibilidad a la insulina modulando la acetilación de proteínas en la cascada de señalización de la insulina y de otras proteínas involucradas en el metabolismo de la glucosa y los lípidos. La histona acetiltransferasa GCN5 (también conocida como KAT2A) puede desempeñar un doble papel en la regulación de la gluconeogénesis hepática. En estado de alimentación, GCN5 acetila el coactivador-1 $\alpha$  de PPAR $\gamma$  (PGC-1 $\alpha$ ) para inhibir su

actividad, lo que da como resultado una expresión reducida de enzimas gluconeogénicas y una producción reducida de glucosa. En estados diabéticos en ayunas y obesos, GCN5 es fosforilado por la proteína quinasa A (PKA), lo que aumenta su actividad acetiltransferasa para las histonas y atenúa la de PGC-1α. El aumento de la acetilación de histonas recluta factores de transcripción como la proteína de la caja forkhead O1 (FOXO1) y el factor nuclear de hepatocitos 4α (HNF-4α)) para genes gluconeogénicos para promover la gluconeogénesis. La gluconeogénesis hepática también está regulada por p300, que acetila y estabiliza el coactivador 2 de la transcripción regulado por CREB (CRTC2), un cofactor transcripcional de la proteína de unión a elementos sensible al AMPc (CREB). Este mecanismo parece ser importante para la activación de genes gluconeogénicos tempranos porque CRTC2 es desacetilado por la sirtuina 1 (SIRT1) y se degrada posteriormente durante el ayuno. p300 también acetila la proteína reguladora de la glucoquinasa (GCK) (GKRP), lo que aumenta su estabilidad, secuestra GCK en el núcleo e inhibe la participación de GCK en la glucólisis. Finalmente, en el hígado de ratones obesos, p300 promueve la hiperacetilación del receptor farnesoide activado por X (FXR) del receptor de ácidos biliares para alterar su actividad. La deficiencia de FXR provoca depósito ectópico de lípidos en el hígado y los músculos, lo que provoca resistencia a la insulina. Por tanto, la acetilación de proteínas regula el metabolismo de la glucosa y los lípidos [14].

Se ha demostrado que el macrófago desempeña un papel fundamental en la fase inflamatoria de la reparación del tejido, donde su plasticidad dinámica permite a esta célula mediar en funciones tanto destructivas como reparadoras del tejido. La capacidad de comprender y controlar tanto el inicio como la resolución de la inflamación es fundamental para el tratamiento de la cicatrización de heridas patológicas [15].

El mantenimiento de la integridad de la piel es crucial para la supervivencia y la reparación de los tejidos es un proceso complicado que debe regularse estrictamente. Aunque muchos tipos de células participan en la reparación de

tejidos, se ha demostrado que los macrófagos desempeñan un papel regulador crítico en el proceso de curación, particularmente durante la fase inflamatoria de la curación [15].

Los macrófagos representan un conjunto fenotípicamente heterogéneo de células inmunes innatas, que demuestran una amplia gama de funciones tanto en la salud como en la enfermedad. Cabe destacar que el macrófago está activo tanto en el inicio como en la resolución de procesos inflamatorios. Al principio de la reparación de la herida, los cambios transcripcionales en macrófagos conducen a la producción de citoquinas inflamatorias y a la eliminación de patógenos y desechos. Durante las últimas etapas de la fase inflamatoria de la cicatrización de heridas, los macrófagos contribuyen a la resolución de la inflamación y promueven la reparación de los tejidos [15]. La plasticidad del macrófago es crucial para la reparación de heridas.

La defensa inicial del cuerpo en respuesta a una infección, un trauma o una inflamación se produce a través de la respuesta de fase aguda (APR). La APR es un conjunto multifacético de reacciones sistémicas que se observan poco después de la experiencia de un evento desencadenante. Uno de los muchos aspectos de una APR es el aumento de la síntesis hepática de proteínas positivas de fase aguda (APP), que conduce a un aumento de la concentración sérica de estas proteínas. El nivel sérico de estas APP vuelve a la concentración básica cuando el factor estimulante ya no está presente [16].

Todos los actores clave y mediadores de la inflamación cambian su papel con el cambio en la configuración de la enfermedad y los pacientes. Los biomarcadores de inflamación y los mediadores inflamatorios también se utilizan como dianas terapéuticas en modelos animales en fase de prueba. Incluso en el diagnóstico clínico de un paciente inflamatorio, se analizaron algunos marcadores de amplio espectro sin disección individual de cada mediador o biomarcador [16].

La inflamación iniciada por infección, traumatismo o lesión se produce por la cascada de interacción de varios leucocitos y citoquinas. Para mediar en la

inflamación local, las citocinas proinflamatorias como la interleucina-1, el factor de necrosis tumoral y la interleucina-6 desempeñan funciones importantes en la activación de células inflamatorias como neutrófilos, macrófagos y monocitos. Los leucocitos activados secretan al menos 15 citoquinas diferentes de bajo peso molecular y también desencadenan una respuesta de fase aguda mediante la manifestación de fiebre y leucocitosis, aumento de la síntesis de hormonas adrenocorticotrópicas y producción de diversas proteínas de fase aguda [16].

Las proteínas de fase aguda son sintetizadas por el hígado bajo la influencia de algunas citocinas, que fluyen a través del torrente sanguíneo, llegan al lugar de la inflamación y eliminan los patógenos mediante la opsonización y la activación de las vías del complemento [16].

La proteína C reactiva activa las vías del complemento y tiene un papel importante en algunas formas de alteración tisular como en el infarto cardíaco [16].

La inflamación es una respuesta protectora dinámica compleja a la lesión celular, la infección a través de microbios, traumatismos o toxinas en los tejidos vascularizados. El agente causal se diluye, destruye o aísla y se establece una cascada secuencial de eventos moleculares que conduce a la reparación, curación y reconstitución del tejido dañado. Se caracteriza completamente por la reacción en los tejidos y su microcirculación, como se refleja clínicamente en enrojecimiento (eritema), calor (hiperemia), hinchazón (exudación), dolor (a través de nervios y mediadores químicos) y pérdida de función (dolor). Patológicamente ocurre por vasoconstricción seguida de vasodilatación, hiperemia, estasis, acumulación de leucocitos, exudación de líquido y finalmente depósito de fibrina. Las respuestas inflamatorias vasculares y celulares combinadas son desencadenadas por un estímulo inflamatorio y mediadas por factores químicos derivados de algunas células o plasma sanguíneo. Incluso los tejidos lesionados o muertos liberan mediadores [16].

Las etiologías de la inflamación son variadas, desde infecciones microbianas (infecciones por bacterias, virus, hongos), agentes físicos (como quemaduras, estrés, traumatismos por cortes, radiación) y productos químicos (drogas, toxinas, alcohol) hasta reacciones inmunológicas. La inflamación implica la entrada de varias células del sistema inmunológico del huésped y la liberación de numerosos mediadores en el lugar del ataque. Reunir y regular las respuestas inflamatorias sería imposible sin la combinación de una migración controlada de la población de leucocitos, diversos mediadores inflamatorios, biomarcadores inflamatorios (marcadores inflamatorios agudos o sistémicos) y cambios fisiológicos posteriores que conllevan respuestas inflamatorias [16].

Los genes identificados por GWAS hasta ahora son sólo la punta del iceberg y la DM2, lejos de ser una condición limitada a unas pocas formas genéticas y fenotípicamente prevalentes, en realidad abarca un grupo heterogéneo de trastornos genéticamente distintos [17].

Mediante el análisis de genes candidatos funcionales o posicionales, se han identificado varias variantes, incluidos polimorfismos del gen sustrato-1 del receptor de insulina ( IRS-1 ). La variante Gly972Arg de IRS-1 determina un defecto en la unión de la subunidad p85 de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) que en las células  $\beta$  pancreáticas provoca una marcada disminución en la secreción de insulina en respuesta a la glucosa y las sulfonilureas. Otros polimorfismos implicados en la DM2 se han identificado en los genes ABCC8 (también conocidos como SUR1 ) y KCNJ11 , cuyos productos proteicos tienen lugar en la formación del receptor de sulfonilurea/canal de potasio sensible al trifosfato de adenosina (ATP) de la célula  $\beta$  pancreática [17].

La respuesta terapéutica a las sulfonilureas está comprometida en pacientes con mutaciones en estos genes. Otros genes cuyas mutaciones se consideraron inicialmente responsables de las formas menos comunes de diabetes mellitus se han asociado posteriormente con un mayor riesgo de DM2. Entre ellos se encuentra el

gen homeobox A del factor nuclear 1 de los hepatocitos (A HNF1A), cuyas mutaciones son responsables de la forma monogénica más común de MODY (MODY3), una forma de diabetes de inicio en la madurez de los jóvenes (también conocida como HNF1A-MODY). , y el gen homeobox B del factor nuclear 1 de los hepatocitos (HNF1B), que determina una forma monogénica menos frecuente pero más grave de diabetes, la MODY5. Ambos genes codifican factores de transcripción nucleares implicados en el desarrollo y función de los islotes pancreáticos [17].

El primer paso en el mecanismo de acción de la insulina es la interacción de la hormona con su receptor específico, el receptor de insulina (INSR), en la superficie celular de las células y tejidos sensibles a la insulina [17].

La activación funcional de INSR es un momento clave en la fisiopatología de la acción de la insulina, seguida de la activación selectiva de vías de señalización intracelular específicas que son necesarias para la adecuada transducción de señales hormonales. Aunque se han informado defectos en INSR en una gran cantidad de pacientes con DM2, se han encontrado mutaciones en el gen INSR solo en un pequeño porcentaje (3% a 4%) de estos pacientes en quienes se identificaron defectos genéticos que conducen a anomalías de las proteínas receptoras, como causa de enfermedad. Sin embargo, ciertos pacientes con genes INSR aparentemente normales tienen una expresión reducida tanto de la proteína INSR como de los niveles de ARNm de INSR [17].

Entre los genes implicados en la resistencia a la insulina se encuentran los que codifican la proteína reguladora de la glucocinasa, GKRP, y el factor de crecimiento similar a la insulina I, IGF-I. GWAS ha identificado recientemente variantes genéticas de estos genes que predisponen a una persona a desarrollar resistencia a la insulina [17].

Los alelos de riesgo de DM2 en tres loci (en FTO, KLF14 y PPARG) se han asociado con una mayor insulina en ayunas (lo que es consistente con un defecto primario en la acción de la insulina) y una sensibilidad reducida a la insulina [17].

En particular, las variaciones en el gen de masa grasa y asociado a la obesidad (FTO) parecen influir en la predisposición a la DM2 a través de un efecto positivo sobre el índice de masa corporal y la obesidad. En cambio, el gen del factor 14 similar a Krüppel (KLF14) se considera un supergen con la capacidad de controlar otros genes relacionados con la grasa corporal. Los alelos de riesgo en KLF14, junto con los del receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas (PPARG), parecen tener un efecto primario sobre la acción de la insulina que, a diferencia de los alelos en FTO, no está impulsado por la obesidad [17].

Un gen descubierto recientemente implicado en la DM2 es el gen 14 unido al receptor del factor de crecimiento (GRB14), que codifica la proteína adaptadora Grb14. Grb14 contiene un dominio SH2 C-terminal implicado en la interacción con varios receptores de tirosina quinasa y proteínas de señalización, y un dominio llamado BPS (homología entre pleckstrina), también necesario para la unión al INSR. Se ha demostrado que esta proteína atenúa específicamente la acción de la insulina al inhibir la actividad catalítica del INSR en los tejidos diana de la insulina [17].

Aunque la biopelícula dental es el principal factor etiológico de la periodontitis, la activación de mediadores inflamatorios por parte del huésped en respuesta a las endotoxinas bacterianas es esencial para la progresión de la enfermedad. En respuesta a este desafío microbiano, la inflamación periodontal promueve elevaciones locales y sistémicas de citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), la interleucina (IL)-1 beta (IL-1 $\beta$ ) y la IL-6, así como enzimas proteolíticas y especies reactivas de oxígeno, que como resultado producen alteraciones en el metabolismo de los lípidos conduciendo a dislipidemia [18].

Los niveles elevados de citoquinas a su vez conducen a una mayor movilización de lípidos del hígado y del tejido adiposo, aumentando la unión de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) al endotelio y al músculo liso, así como la transcripción del gen del receptor de LDL [18].

Debido a la naturaleza bidireccional de la enfermedad periodontal y la diabetes mellitus, y a la relación entre la periodontitis y el metabolismo lipídico alterado, es común encontrar individuos afectados por una combinación de DM2, dislipidemia y periodontitis. En las vías IL-10, interferón-alfa y gamma en pacientes clínicamente seleccionados en función de dichas condiciones patológicas, la dislipidemia podría ser la principal enfermedad asociada con la expresión de genes relacionados con el sistema inmunológico [18].

Corbi y colaboradores encontraron que un control glucémico deficiente influyó en una exacerbación sistémica de la expresión genética relacionada con la respuesta inmune, así como de genes asociados con el metabolismo de los lípidos y la replicación /reparación del ADN en células mononucleares de sangre periférica [18]. Nuestros hallazgos llevaron a investigar más a fondo a los pacientes (i) sin DM2 y dislipidemia (sistémicamente sanos) pero afectados solo por periodontitis en comparación con (ii) individuos sin ninguna de estas enfermedades (grupo de control sano) y planteamos la hipótesis de que encontraríamos una firma transcriptómica. Específico para pacientes sistémicos sanos con periodontitis [18].

En muchos estudios genéticos realizados hasta la fecha, a menudo no se comprenden bien los mecanismos funcionales mediante los cuales el gen asociado puede aumentar la susceptibilidad a la DM2.

Las pruebas diagnósticas de rutina a veces son invasivas. Para el cuidado de los pacientes es necesario el empleo de biomarcadores no invasivos. Los nuevos marcadores biológicos son a partir de entonces los marcadores serológicos y las proteínas de fase aguda.

## **1.2 La Diabetes Mellitus tipo 2 y el pobre control glicémico.**

Los niveles de la hemoglobina glicada (Hb1Ac), es el parámetro de excelencia para monitorear los niveles de hiperglucemia en pacientes con diabetes *mellitus* tipo 2, y se le ha asociado el término de control glicémico y la elevación de los porcentajes sanguíneos de esta molécula en sangre se asocia con las complicaciones provocadas por la hiperglicemia. La ADA define una diabetes *mellitus* tipo 2 con pobre control glicémico cuando se detectan valores elevados en la medición de HbA1c. Se considera un mal control glicémico cuando los porcentajes de HbAc1 presentan un valor mayor al 9% [19]. Análisis retrospectivos sugieren que existen correlaciones entre el grado de hiperglucemia y la frecuencia, gravedad y progresión de la retinopatía diabética, nefropatía y neuropatía [20]. No obstante, se ha observado que el control de la glucemia debe realizarse mediante un monitoreo constante de la medición de glucosa en sangre para detectar complicaciones cardiovasculares que no son detectables con los monitores espaciados de la Hb1Ac [21]. El control intensivo de la glucemia reduce significativamente las complicaciones microvasculares, como lo son la retinopatía, nefropatía y enfermedad arterial periférica [22]. El control glucémico continúa siendo un desafío para los médicos; por lo tanto, se necesitan más estudios para investigar el impacto que tiene el control glucémico deficiente en diversos procesos biológicos en pacientes con diabetes *mellitus* tipo 2. Si bien, la comprensión de la fisiopatología de la DM2 va en aumento, no se conocen todavía a profundidad los mecanismos moleculares que conllevan al desarrollo, progresión y a la aparición de las complicaciones de la enfermedad específicamente en pacientes con pobre control glicémico.

Nuestro grupo de investigación previamente identificó mediante microarreglos que existe aumento en los niveles de expresión de los genes NPRL3, GP9, DPM2, KLC3 y RGS10 en sujetos con DM2 con pobre control glicémico, en comparación con sujetos con buen control y sujetos sin DM2. En el presente estudio se pretende validar la expresión relativa de los genes antes mencionados mediante qPCR, comparando entre grupos con mayor número de sujetos (*test set*) en sujetos sanos

(CTRL), en prediabéticos (PreDM2) y en pacientes con DM2 de buen (BDM2) o de pobre control glucémico (PDM2). Lo que nos permitirá saber si estos genes asociados al pobre control glucémico pueden posteriormente ser candidatos a biomarcadores de falla de control glucémico para apoyar el monitoreo con Hb1Ac.

## **2. ANTECEDENTES.**

### **2.1 Transcriptoma.**

El transcriptoma es el conjunto de todas las moléculas de ARN presentes en una célula o grupo de células en un momento determinado. El término transcriptoma engloba tanto al ARN mensajero (mRNA), que puede traducirse en una proteína, como al ARN no codificante (ncRNA) que no se traduce. Dado que diferentes células expresan diferentes genes, cada tejido o tipo celular posee un transcriptoma único y distinto. Uno de los objetivos más importantes de la transcriptómica es identificar qué porción del genoma es transcrita en cada tipo celular y bajo qué condiciones. Con la aparición de los microarreglos de expresión (“expression microarrays”) se logró la caracterización de niveles de expresión de miles de transcritos simultáneamente y de esta forma se pudo estudiar los transcriptomas de la colección de todas las lecturas de genes presentes en una célula y cómo pueden ser modificados por cualquier estímulo interno o externo, generando una huella transcriptómica particular asociada a ese estímulo o condición particular [23].

### **2.2 Perfil transcripcional.**

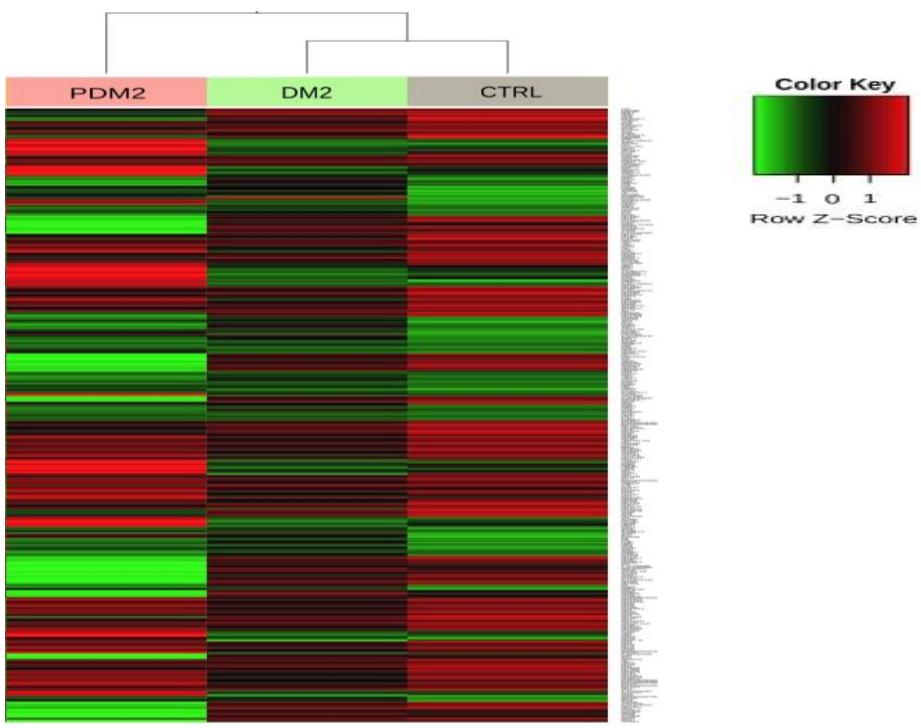
El perfil de expresión génica es la huella que representa la actividad (de la expresión génica) de miles de genes simultáneamente, generando una imagen global de la función celular. Estos perfiles pueden distinguir entre las células que se están dividiendo activamente, o mostrar cómo las células reaccionan a un tratamiento o estímulo. El análisis transcriptómico analiza la respuesta simultánea de un genoma completo, es decir, los cambios que ocurren en la expresión de cada gen presente

en una célula en particular frente a un estímulo [24].

La metodología más usada para analizar transcriptomas, es la tecnología de microarreglos. El análisis transcriptómico es descriptivo pero permite generar nuevas hipótesis o probar las ya existentes. Sin embargo, los resultados obtenidos requieren de otros métodos moleculares para su confirmación [25].

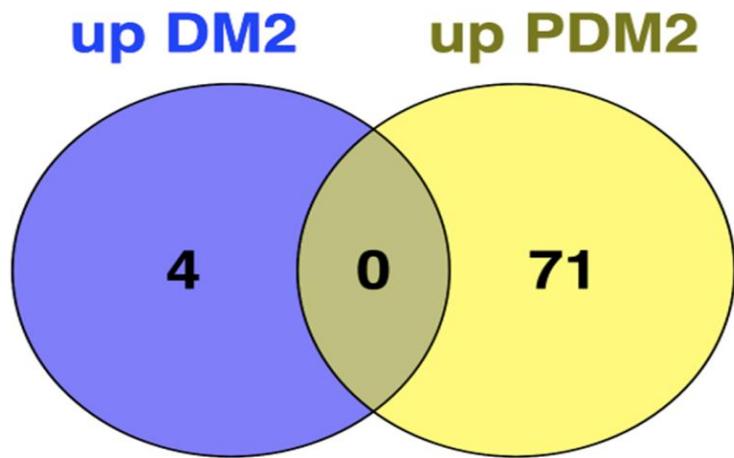
### **2.3 Antecedentes directos.**

Con el objetivo de identificar un transcriptoma asociado a pacientes con pobre control glicémico, nuestro grupo realizó un análisis transcripcional en un microarreglo contenido cerca de 30 mil secuencias de genes humanos (Agilent Gene Chip 4X 44k, Version 2.3, Agilent Technologies, USA). Mediante este procedimiento de análisis y tras un minado de datos exhaustivo, se identificó un transcriptoma de genes sobreexpresados en sangre de pacientes con pobre control glicémico (PDM2), que no fueron identificados en los grupos con DM2 de adecuado control glicémico (DM2) o de sujetos sanos (CTRL) [26].



**Figura 1. Mapa de calor mostrando los transcriptomas asociados a pacientes con DM2** con diferentes condiciones de control glucémico y sujetos sin DM2. Se muestra un análisis jerárquico de expresión de genes agrupados de acuerdo a su nivel de expresión para los grupos de pacientes con DM2 de buen control glucémico (DM2), con DM2 de pobre control glucémico (PDM2) y sujetos sin DM2 (CTRL). Se muestra en este mapa de calor en gradiente de color los genes inducidos (rojo), genes reprimidos (verde) y genes sin variación (negro) [26].

Para identificar los genes compartidos y diferencialmente expresados se realizaron diagramas de Venn. En la figura 2 podemos apreciar el diagrama comparativo obtenido en los diferentes grupos de pacientes con respecto al grupo control. Se consideraron como genes inducidos aquellos que presentaron una tasa de cambio mayor a 2.0 (FoldChange>2) y con diferencias significativas ( $p<0.05$ ).



**Figura 2. Diagrama de Venn de genes expresados diferencialmente al comparar los genes expresados en los grupos DM2 y PDM2.** Se muestra un diagrama comparativo de genes inducidos (up), ( $\text{FoldChange} > 2$  y  $p < 0.05$ ) con respecto al grupo controles sanos. (Lucidchart Software Inc.) [26].

Considerando la categoría funcional de los 71 genes inducidos en el grupo de PDM2, en la tabla 1 se describe el nombre del gen, su categoría funcional y los valores de p y Fold Change de cada uno.

**Tabla 1**

Lista de los genes sobreexpresados en PDM2 con un Fold Change>2 y el valor de p<0.05 [20].

<b>Gen</b>	<b>Descripción</b>	<b>p</b>	<b>FC</b>
C16orf35	UPF0171 protein C16orf35 (Alpha-globin regulatory element-containing gene protein) (Protein CGTHBA)(-14 gene protein)	0.00018	4.53
ECSIT	ECSIT homolog (Drosophila)	0.00029	2.77
RILP	Rab interacting lysosomal protein	0.00055	3.05
KIAA0040	Homo sapiens KIAA0040 (KIAA0040), transcript variant 1, mRNA [NM_001162893]	0.00072	3.59
MRGPRG	MAS-related GPR, member G	0.00157	2.86
FAM100A	family with sequence similarity 100, member A	0.00175	3.02
C1orf229	Putative uncharacterized protein C1orf229	0.00212	3.12
DPM2	dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 2, regulatory subunit	0.00243	3.15
UBXN6	UBX domain protein 6	0.00254	3.19
GATA1	GATA binding protein 1 (globin transcription factor 1)	0.00275	2.77
GP9	glycoprotein IX (platelet)	0.00304	3.55
KIAA0427	KIAA0427	0.00313	2.82
RBM38	RNA binding motif protein 38	0.00336	3.42
NFE2	nuclear factor (erythroid-derived 2), 45kDa	0.00384	2.83
UNCX	UNC homeobox	0.00386	5.44
ELOF1	elongation factor 1 homolog (S. cerevisiae)	0.00496	3.13
SLC25A37	solute carrier family 25, member 37	0.00564	3.18
STK11	serine/threonine kinase 11	0.00609	2.91
NDUFAF3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, assembly factor 3	0.00632	2.74
TREML1	triggering receptor expressed on myeloid cells-like 1	0.00706	2.75
RGS10	regulator of G-protein signaling 10	0.00732	2.96
CMTM5	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 5	0.00827	3.17
ANKRD9	ankyrin repeat domain 9	0.00834	3.01
PRDX5	peroxiredoxin 5	0.00946	2.81
CISD3	CDGSH iron sulfur domain 3	0.0104	3.21
FIS1	fission 1 (mitochondrial outer membrane) homolog (S. cerevisiae)	0.01043	3.01

TMEM149	transmembrane protein 149	0.01045	3.25
KIAA1841	KIAA1841	0.01089	3.13
DNAJB2	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 2	0.0112	2.78
KLC3	kinesin light chain 3	0.0113	3.1
PLK3	polo-like kinase 3 ( <i>Drosophila</i> )	0.01145	3.27
CDC34	cell division cycle 34 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	0.0136	2.96
SCARF2	scavenger receptor class F, member 2	0.01397	3.13
TGM2	transglutaminase 2 (C polypeptide, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase)	0.01667	3.59
THEM5	thioesterase superfamily member 5	0.02044	3.58

Los genes expresados diferencialmente se sometieron a GO-Analysis, usando la prueba de sobrerepresentación dentro del sistema de clasificación PANTHER (Panther versión 16) para identificar la ontología génica de todos los genes sobreexpresados. Con un análisis de correlación realizado con GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) se verificó la sobreexpresión de algunos de los genes descritos en la tabla 1. Bajo estos criterios, para corroborar la expresión por qPCR en los grupos de estudio antes mencionados, se seleccionaron 5 genes considerando su participación en los procesos metabólicos y de respuesta inmune de las células, esto último considerando el carácter inflamatorio crónico de bajo grado que se presenta en la DM2. Los genes seleccionados se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2**

Genes sobreexpresados en el grupo PDM2 y seleccionados por su participación en procesos metabólicos y participación en la respuesta inmune [27].

GEN	NOMBRE	FC	p	FUNCIÓN
<b>NPRL3</b>	NPR3 Like, subunidad compleja GATOR1	<b>4.53</b>	<b>0.0002</b>	Forma parte del represor de la vía de mTOR GATOR1. La inhibición de mTOR provoca hiperglicemia y resistencia a la insulina. La vía mTOR desempeña un importante papel en los mecanismos que intervienen en la progresión de la enfermedad renal crónica (ERC), causada por la diabetes o por otras causas.
<b>GP9</b>	Plaquetas de glicoproteína IX	<b>3.55</b>	<b>0.003</b>	Codifica una pequeña glucoproteína de membrana que se encuentra en la superficie de las plaquetas humanas. Los defectos en este gen son una causa del síndrome de Bernard-Soulier, también conocido como enfermedad plaquetaria gigante. Estos pacientes tienen plaquetas inusualmente grandes y tienen una tendencia clínica al sangrado.
<b>DPM2</b>	Subunidad 2 de la manosiltransferasa de fosfato de dolilíolo, reguladora	<b>3.15</b>	<b>0.0024</b>	Dolichol-fosfato manosa (Dol-P-Man) sirve como donante de residuos de manosilo en el lado luminal del retículo endoplásmico (ER). Entre sus vías relacionadas se encuentran la síntesis de sustratos en la biosíntesis de N-glucano, el transporte al Golgi y su posterior modificación.
<b>KLC3</b>	Cadena ligera de kinesina 3	<b>3.1</b>	<b>0.011</b>	Las kinesinas son motores moleculares involucrados en el transporte de carga a lo largo de los microtúbulos. Las enfermedades asociadas con KLC3 incluyen paraplejia espástica, atrofia óptica y neuropatía. Entre sus vías relacionadas se encuentran el transporte mediado por vesículas y la señalización por Rho GTPasas.
<b>RGS10</b>	Regulador De Señalización De Proteína G 10	<b>2.96</b>	<b>0.0073</b>	Modula la activación de macrófagos M1/M2. También modula la adhesión celular de células T. Y mejora la activación de plaquetas.

## **2.4 Descripción de los genes seleccionados para validación mediante qPCR.**

### **2.4.1 Gen NPRL3.**

El gen NPRL3 codifica para una proteína similar al regulador de permeasa de nitrógeno 3, una subunidad del complejo GATOR, que regula la vía de señalización de mTOR [28]. El complejo GATOR1 está compuesto por Nprl2, Nprl3 e Iml1/DEPDC5. Su actividad es de GAP que hidroliza el GTP unido a RagA/B a GDP y libera TORC1 del lisosoma para inhibir su actividad [29]. El TORC1 (Objetivo del Complejo Rapamicina 1) es un regulador maestro que coordina el estado de los nutrientes con el metabolismo celular. Al inhibir la actividad de TORC1, GATOR1 protege a las células del daño durante los períodos de estrés. La estabilidad de Nprl3 se ve afectada por la vía de degradación de proteínas complejas solubles no ensambladas (USPD). La degradación proteolítica dependiente de la proteína FKBP39 mantiene Nprl3 en niveles bajos en condiciones de plenitud de nutrientes, mientras que en la falta de nutrientes anula la degradación de la proteína Nprl3 y promueve rápidamente la acumulación de Nprl3. De acuerdo con un papel en la promoción de la estabilidad de un inhibidor de TORC1, las mutaciones en fkbp39 disminuyen la actividad de TORC1 y aumenta la autofagia [30].

Por otro lado, Nprl3 media las funciones de las β-arrestinas (ARRB) en las respuestas inflamatorias de la microglía. La expresión transitoria de Nprl3 mejoró la expresión de genes marcadores proinflamatorios (Il6, Il1b, Tnf, y Nos2), así como la activación de p65 y STAT1 en la microglía knockout para ARRB1, en comparación con las células transfectadas con vectores de control. La eliminación de Nprl3 mediada por ARNip inhibió la expresión de genes marcadores proinflamatorios y la activación de p65 y STAT1 en la microglía con eliminación de ARRB2. Estos resultados sugieren que Nprl3 es un efecto novedoso que actúa río abajo de ambos ARRB y media sus funciones en las respuestas inflamatorias de la microglía y la activación de las vías NF-κB y STAT1 [31].

#### **2.4.2 Gen GP9.**

El gen GP9 (glicoproteína IX) que codifica una subunidad de un complejo glicoproteico de la membrana de la superficie de las plaquetas funciona como un receptor para el factor de von Willebrand, que inicia el control de la hemostasia después de una lesión. Las variantes en la GP9 humana están asociadas con el síndrome de Bernard-Soulier, tipo C [32].

Datos del International Mouse Phenotyping Consortium indican que la desactivación de Gp9 en ratones causó trombocitopenia con aumento del volumen de plaquetas [33]. Por otro lado, tres derivados de glicanos replicados, incluyendo GP9, aumentan significativamente en individuos que desarrollaron hipertensión. La incidencia de GP9, GlcNAc, GP4 y GP21 se ha asociado previamente con fenotipos de alteraciones metabólicas, que incluyen dislipidemia, IMC, inflamación, obesidad y envejecimiento [34]. La molécula de GP9 también se ha identificado como un biomarcador de diagnóstico potencial para la osteoartritis y el síndrome metabólico, basados en métodos bioinformáticos integrales, que pueden proporcionar nuevos conocimientos sobre el diagnóstico y el tratamiento [35].

#### **2.4.3 Gen DPM2.**

La sintasa de dolicol-fosfato-manosa (DPM) en mamíferos consta de tres subunidades, DPM1, DPM2 y DPM3 [36]. La DPM2 es una proteína de membrana de 84 aminoácidos expresada en el retículo endoplásmico (RE), forma un complejo con DPM1 que es esencial para la localización en el RE y la expresión estable de DPM1. La DPM2 mejora la unión de fosfato de dolicol, un sustrato de la DPM sintasa, y la biosíntesis de DPM en células de mamíferos que también es regulada por DPM2 [37]. Además, la DPM2 participa en la formación de anclajes GPI mediante la regulación del complejo enzimático glicosilfosfatidilinositol-N acetilglucosaminil-transferasa (GPI-GnT) [38]. Las alteraciones patogénicas en el gen DPM2 se han descrito previamente en pacientes con hipotonía, debilidad

muscular progresiva, desarrollo psicomotor ausente, convulsiones intratables y muerte prematura [39].

#### **2.4.4 Gen KLC3.**

La cadena ligera de cinesina 3 (KLC3), contiene un motivo HR conservado que media la unión a las cinesinas de cadena pesada (KHC), que se conforman como moléculas de cinco repeticiones. En asociación con KHC, KLC3 se une a los microtúbulos de manera dependiente de ATP. La KLC3 se expresa en varios tejidos, incluidos los testículos y el cerebro; siendo las espermátidas el sitio principal de expresión de KLC3 [40]. La KLC3 es la única cadena ligera de cinesina conocida expresada en células germinales masculinas posmeióticas. En las espermátidas de rata, KLC3 se asocia con fibras densas externas y vaina mitocondrial. Esta molécula es capaz de unirse a las mitocondrias *in vitro* e *in vivo* empleando el motivo de cadena ligera de cinesina de repetición tetraetílico-péptido conservado [41].

Por otra parte, la expresión de KLC3 en el cerebelo está específicamente restringida a neuronas grandes en los núcleos del cerebelo. Es probable que KLC3 se exprese en todas las neuronas nucleares, tanto grandes (principalmente neuronas de proyección glutamatérgicas), como pequeñas (principalmente interneuronas inhibitorias GABAérgicas). Esto sugiere que KLC3 no desempeña un papel destacado en el transporte axonal, sino que está asociado con el tráfico de organelos dentro de los somas [42].

#### **2.4.5 Gen RGS10.**

El regulador de señalización de proteína G 10 (RGS10) es un modulador negativo de la respuesta inflamatoria en macrófagos y microglía [43]. Pertenece a la familia de proteínas RGS que actúan como proteínas activadoras de GTPasa para proteínas G heterotriméricas para apagar las vías de señalización *rio abajo* de los receptores acoplados a proteína G [44]. La RGS10 es una proteína antiinflamatoria que inhibe la activación de NF-κB mediada por LPS y la expresión de citocinas

inflamatorias, en particular TNF- $\alpha$  [45]. La deficiencia de Rgs10 aumenta los niveles de varias citocinas y quimiocinas proinflamatorias y aumenta la acumulación de leucocitos mieloides en pulmones infectados por patógenos diversos [44]. Además, en ratones knockout (KO) RGS10 que fueron alimentados con dieta rica en grasas (HFD), ganaron significativamente más peso y desarrollaron una resistencia severa a la insulina en comparación con los ratones de tipo silvestre (WT) alimentados con la misma dieta HFD. Al revisar los de sus macrófagos, estos mostraron fenotipos inflamatorios, con una disminución de la expresión en tejido adiposo de los marcadores M1y M2 anti-inflamatorios [43]. Por otra parte, RGS10 en conjunto con RGS18 regulan la respuesta hemostática a una lesión, mejoran la producción de plaquetas, prolongan la supervivencia de las plaquetas y previenen la activación plaquetaria injustificada en ausencia de lesión [46].

### **3. JUSTIFICACIÓN.**

Estudios recientes indican que el control glucémico define la evolución de la diabetes hacia sus complicaciones clínicas, por lo que se ha considerado la medición de Hb1Ac como el estándar de oro para la identificación de las complicaciones asociadas al control glucémico. Desafortunadamente, algunos datos indican que al ser muy espaciada la medición de Hb1Ac, no se detectan de manera oportuna los riesgos cardiovasculares. El análisis de la expresión génica es una de las estrategias más efectivas para la identificación global de biomarcadores relevantes asociados a las alteraciones ligadas a la DM2. En este sentido, la sangre periférica es el biomaterial de mayor utilidad clínica que puede brindar información sobre la expresión génica asociada al pobre control glicémico de la DM2. A la fecha no existen estudios que muestren el perfil transcriptómico de pacientes con diabetes tipo 2 de buen y pobre control glucémico. Esto es esencial ya que son los pacientes con pobre control glucémico los sujetos que clínicamente presentan todos los rasgos clínicos de la enfermedad. En particular, nuestro grupo de trabajo ha utilizado en los últimos años los análisis transcriptómicos para identificar biomarcadores que podrían

estar asociados al pobre control glicémico en pacientes con DM2. Esto es relevante porque se ha observado clínicamente una directa asociación de complicaciones con el aumento del porcentaje de hemoglobina glicada. En este estudio se busca validar por qPCR si un grupo de genes seleccionados que se identificaron por microarreglos de expresión, específicamente aquellos que aumentaron su expresión, se inducen exclusivamente en un grupo de prueba (*test set*) de pacientes mexicanos con diabetes *mellitus* tipo 2 con pobre control glucémico con respecto a pacientes con buen control glucémico o en sujetos sin DM2. De ser así, estos genes podrían ser candidatos útiles como biomarcadores para establecer métodos de identificación pronostica/diagnóstica temprana en sujetos con riesgo de desarrollar complicaciones de diabetes desde las etapas preclínicas. Además, el análisis ontológico de la categoría funcional de estos nuevos biomarcadores ayudaría a entender mejor los mecanismos implicados en el desarrollo y las complicaciones de la DM2.

#### **4. HIPÓTESIS.**

La sobreexpresión de NPRL3, GP9, DPM2, KLC3 y RGS10 se presenta en pacientes diabéticos con pobre control glucémico (PDM2) pero no en pacientes diabéticos de buen control glucémico (DM2) ni en sujetos sin DM2 (CTRL).

#### **5. OBJETIVOS.**

1. Determinar la implicación que tienen los genes NPRL3, GP9, DPM2, KLC3 y RGS10 en pacientes con DM2 con pobre control glucémico respecto a pacientes DM2 y sujetos control sin DM2 (CTRL).
2. Llevar acabo las metodologías necesarias para evaluar los niveles de expresión relativa de los genes NPRL3, GP9, DPM2, KLC3 y RGS10 en pacientes del grupo PDM2 respecto a los grupos CTRL y DM2.
3. Establecer el estado de expresión de los genes NPRL3, GP9, DPM2, KLC3 y RGS10 entre los grupos antes mencionados.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **6.1 Diseño de estudio.**

Estudio prospectivo transversal analítico para evaluar los niveles de expresión relativa de los genes NPRL3, GP9, DPM2, KLC3 y RGS10 en sangre total de sujetos con y sin DM2 para corroborar si la sobreexpresión de estos genes está asociada a pacientes con DM2 de pobre control glucémico.

### **6.2 Grupos de estudio.**

El universo de trabajo está integrado por un total de 80 individuos clasificados en 4 grupos de estudio, que son: controles sanos (CTRL), diabetes *mellitus* tipo 2 con adecuado control glicémico (DM2), diabetes *mellitus* tipo 2 con pobre control glicémico (PDM2) y el grupo de sujetos con pre-diabetes *mellitus* tipo 2 (Pre-DM2), 20 individuos en cada grupo. El presente trabajo de tesis forma parte del proyecto “Exacerbación de Tuberculosis mediada por Diabetes: Un programa de Investigación clínica y experimental enfocado a la identificación de las huellas moleculares que definen la susceptibilidad de los pacientes con diabetes a desarrollar esta comorbilidad” con número de registro R-2018-785-118, el cual fue aprobado por el comité científico y de ética del IMSS. Todos los procedimientos de obtención de muestras se realizaron apegados al reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación y se considera un estudio de categoría B, con riesgo mínimo para el paciente. No incluirá población vulnerable. Los procedimientos se apegan a las normas éticas y reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud 2021 [47] y de la declaración de Helsinki [48]. Para la toma de muestras de humanos se solicitó el consentimiento informado de los sujetos de estudio en el cual se describen riesgos y beneficios para los participantes y sociedad, así como para garantizar la confidencialidad de los datos que proporcionen para realizar la investigación del perfil socioeconómico de la población estudiada. Se solicitó consentimiento para la conservación de material biológico el cual se almacenó en condiciones adecuadas para estudios futuros. Toda la

información generada en reportes de laboratorio, presentaciones en congresos y publicaciones se realizará manteniendo la confidencialidad de los sujetos de estudio (anexo 1). La recolección se llevó a cabo en pacientes que radican en el Estado de Zacatecas.

### **6.3 Criterios de selección de los individuos.**

#### **6.3.1 Criterios de inclusión.**

Se seleccionaron aquellos individuos que firmaron la carta de consentimiento informado (anexo 1), mayores de 18 años y menores de 65 años y de sexo indistinto, que cumplieran con los criterios que se describen en la tabla 3.

**Tabla 3**

Criterios para la inclusión de sujetos al estudio.

CARACTERÍSTICA	GRUPO DE ESTUDIO			
	CTRL	PreDM2	DM2	PDM2
Diagnóstico de DM2	-	-	+	+
Glucosa en Ayuno (mg/dL)	70 - 99	100 - 125	> 126	> 126
% HbA1c	< 5.6	5.7 - 6.4	6.5 - 9	> 10

Nota: El diagnóstico de DM2 se realizó por un médico certificado y la clasificación para los pacientes con DM2 se hizo de acuerdo a la Asociación Americana de Diabetes (ADA). Los grupos fueron: CTRL: Sujetos control; PreDM2: Pacientes con pre-diabetes mellitus tipo 2; DM2: Pacientes con diabetes mellitus tipo 2; PDM2: Pacientes con diabetes mellitus tipo 2 con pobre control glucémico; HbAc1: Hemoglobina glicosilada.

### **6.3.2 Criterios de exclusión.**

Se excluyeron del presente estudio a aquellos sujetos que no quieran continuar en el estudio, además, se excluyeron muestras de sujetos que presentaron hemólisis o cuya cantidad de material era insuficiente para obtener los resultados mínimos requeridos.

### **6.4 Recolección, estabilización y conservación de las muestras sanguíneas.**

A cada sujeto se le tomaron muestras de sangre periférica en 2 tubos BD Vacutainer® con EDTA, las cuales fueron mezcladas por inversión con 1 mL de RNAlater para estabilizar el RNA y protegerlo de degradación; las muestras colectadas fueron etiquetadas y se almacenaron en tubos cónicos de 50 mL Corning™ Falcon™ como contenedores secundarios a una temperatura de -70 °C hasta su uso.

### **6.5 Extracción de RNA total.**

Para la extracción de RNA total, las muestras sanguíneas almacenadas a -70°C se descongelaron a temperatura ambiente y se transfirieron a un tubo Falcon de 50 mL conteniendo 5 mL de TRIzol (Thermo Tech. USA). Una vez descongeladas, se realizó el protocolo recomendado por el fabricante y la fase acuosa se transfirió a columnas QIAamp (Quiagen, USA), para purificar el RNA total. Brevemente, las muestras se homogenizaron vigorosamente, y se dejaron reposar a T° Ambiente durante 3 min. Posteriormente se agregó 1 mL de cloroformo (Sigma Chemical, USA) y se homogenizó vigorosamente por inversión. El contenido se transfirió a tubos eppendorf de 1.5 mL y se centrifugaron por 15 min a 13,000 rpm a 4 °C en una centrifuga eppendorf (Eppendorf, USA). Las fases acuosas se transfirieron a un tubo falcon nuevo de 15 mL, evitando tomar la fase orgánica y la interfase. La fase acuosa obtenida fue mezclada con 1 volumen de etanol al 70%, y la solución se eluyó a través de la columna de retención de QIAamp (BLANCA), por centrifugación

a 10,000 rpm por 15 seg en la microcentrífuga eppendorf asegurándose de que todo el líquido pasara al tubo de colección. Posteriormente, se agregaron 350 µL de buffer RW1 a la columna de centrifugación QIAamp y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones. Para la eliminación del DNA contaminante, los ácidos nucleicos (RNA y trazas de DNA) retenidos en la columna se incubaron por 10 min a temperatura ambiente con 80 µL de una solución de DNAsas libre de RNAsas incluida en el kit. Posteriormente, la columna se transfirió a un tubo colector nuevo de 2 mL y se lavó por centrifugación con 350 µL de buffer RW1 como se describió anteriormente. La columna se lavó 2 veces por centrifugación con 500 µL de buffer RPE-Etanol bajo las mismas condiciones. Para eluir el RNA purificado, la columna se transfirió dentro de un tubo de recolección nuevo y se aplicaron 35 µL de agua libre de RNAsas directamente en la membrana de QIAamp, centrifugando a 10,000 rpm a 4 °C de igual forma a lo mencionado, este proceso se hizo por duplicado para obtener 70 µL totales. El RNA eluido se cuantificó con 2µL por duplicado en el espectrofotómetro (nanodrop ND-1000, Thermo Fisher scientific, U.S.A.), y los 66 µL de RNA restantes se ajustaron a una concentración de 50 ng/µL preparando alícuotas de 50 µL que fueron almacenadas a -70 °C hasta su uso para la evaluación de integridad y síntesis de cDNA.

## 6.6 Síntesis de cDNA.

Para la síntesis de DNA copia (cDNA) se deshidrataron alícuotas de 50 uL con 2.5 µg de RNA en un speed-vac (Savant, USA). El RNA se resuspendió con 9 µL de agua DEPC para obtener una concentración de 278 ng/µL de cada muestra y este volumen se transfirió a tubos eppendorf de 200 µL. Se prepararon por separado mezclas maestras conteniendo los siguientes componentes: 1 µL de dNTP's 10 mM, 1 µL de random primers 50 ng/µL y 1 oligo DT 500 µg/L por muestra (mezcla 1). Una segunda mezcla contenía 4 µL de buffer 5X, 2 µL de DTT 0.1 M y 1 µL RNaseOUT 40U/µL por cada muestra procesada. En los dos casos se prepararon excedentes adicionales de 0.5 µL de cada mezcla para compensar los errores de pipeteo. El contenido de las mezclas se bajó con un pulso y se colocaron en hielo

hasta su uso. A cada muestra de RNA se le adicionaron 3  $\mu$ L de la “mezcla maestra 1”, agitando suavemente, y centrifugando con un pulso para bajar contenidos y los tubos se colocaron en el termociclador (PCR System 9700, GeneAmp). Las muestras se incubaron a 65°C por 5 min y se colocaron en hielo para mantener el RNA desnaturizado. Posteriormente, se adicionaron 7  $\mu$ L de la “mezcla maestra 2”. Las muestras se incubaron nuevamente a 25°C por 2 min en el termociclador. A cada muestra se le adicionó 1  $\mu$ L de la enzima SuperScript II (Thermo Scientific, USA) a 200 U/ $\mu$ L. Para la síntesis de cDNA de las muestras se usaron las siguientes condiciones de incubación: 25°C por 10 min, 42°C por 50 min, 70°C por 5 min. Posteriormente, a cada muestra se le añadió 1  $\mu$ L de RNaseH 20 U/ $\mu$ L, incubando los tubos en el termociclador a 37°C por 20 min. Se tomó una alícuota de cada stock del cDNA para la cuantificación en diluciones 1:10. Posterior a la cuantificación, se prepararon alícuotas de trabajo a una concentración de 25 ng/ $\mu$ L y se almacenaron en congelación hasta su uso.

## 6.7 Diseño de oligonucleótidos.

El diseño de los oligonucleótidos para la amplificación por qPCR de NPRL3, GP9, DPM2, KLC3 y RGS10 se hizo utilizando la herramienta “*Primer Design*” de NCBI [37]. Primero, se realizaron alineamientos entre la secuencia del RNA mensajero maduro de cada gen con la sonda del microarreglo. Luego, se estableció una región que incluyera aproximadamente 100 pb del RNA mensajero a cada lado del sitio donde hibrido el mensajero problema con la sonda del microarreglo. Con ese molde de 260 pb se hicieron 20 diseños en “*Primer Design*” de NCBI, para amplificar cada gen y se seleccionaron los pares de oligonucleótidos sentido y antisentido con las mejores características para las reacciones de qPCR. Las secuencias de los oligonucleótidos seleccionados se mandaron sintetizar en IDT (Uniparts, Mexico). En la tabla 4 se muestran los datos generales de los oligonucleótidos.

**Tabla 4**

Características de los oligonucleótidos para amplificación de genes seleccionados.

Gen	Oligo (5'->3')	Templado	Largo	Inicio	Fin	Tm	GC%	Autocomple- mentariedad	Autocomple- mentariedad 3'	Longitud del Producto
NPRL3	F	CCAGACATGGGTTGATCACCTAGA	24	109	132	61.67	50	6.00	2.00	109
	R	GGGCCTGCCAGACAAGATT	21	217	197	62.97	57.14	6.00	2.00	
GP9	F	GCCAAACACAGCCTTCAGTC	20	187	206	59.69	55	3.00	2.00	86
	R	CAGGGGTTCTGCGTCACAT	19	272	254	60	57.89	3.00	2.00	
DPM2	F	TATGTGGCCTTCTGGTCTGTG	22	46	67	60.29	50	4.00	0.00	86
	R	CTGAGCCTTCTGGTCACTCT	21	131	111	59.38	52.38	3.00	0.00	
KLC3	F	GCCCTCTTGCAAGATGAAGA	21	85	105	58.56	47.62	4.00	2.00	120
	R	CCCACATGGCCTCCTATTT	21	204	184	59.5	52.38	4.00	0.00	
RGS10	F	ACATGAGCCCCAAAAAGCC	20	53	72	61.19	55	4.00	1.00	80
	R	ATGATAAACCGGCACGGTC	20	132	113	60.46	55	4.00	2.00	

Nota: Se muestran las características obtenidas de los diseños de oligonucleótidos para la amplificación de los genes NPRL3, GP9, DPM2, KLC3 y RGS10.

## 6.8 Purificación de oligonucleótidos.

Antes de abrir los tubos que contenían los oligonucleótidos liofilizados, estos fueron centrifugados un minuto a 5000 rpm en una biofuga Sorvall-Heraeus (Sorvall-Heraeus, Germany). Los tubos fueron trasladados a una campana de flujo laminar (Nuaire Mod. 126 400, USA) estéril sin flujo de aire, y los oligonucleótidos fueron disueltos por mezclado en vórtex en 200 µL de H<sub>2</sub>O DEPC estéril. Para la purificación se tomaron 100 µL en un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL y el restante se almacenó a -70 °C. Para la precipitación y lavado de la pastilla de ácidos nucleicos, se agregaron 20 µL de acetato de sodio 3 M y 700 µL de etanol absoluto frío (ambos de Sigma Chemicals, USA). Las muestras de oligos se congelaron a -70°C durante 1 hora y posteriormente se centrifugaron, descartando el sobrenadante por pipeteo sin tocar el botón. La pastilla se lavó con 100 µL de etanol frío al 70%

(agregando en la pared del tubo). Posteriormente, los tubos se centrifugaron descartando al final el sobrenadante. Las pastillas se secaron a temperatura ambiente y finalmente se resuspendieron en 30 o 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O DEPC, según el tamaño de la pastilla, ajustando al final a 20  $\mu$ M con agua. Para descartar la formación de estructuras entre los oligonucleótidos (dímeros, trímeros, etc), se les realizó electroforesis en geles de agarosa al 2 %, usando amortiguador TBE 1x. Los detalles se describen en la siguiente sección. Al final se prepararon alícuotas de trabajo en tubos eppendorf de 0.5 mL debidamente rotulados y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

### **6.9 Electroforesis de oligos.**

Se prepararon geles pequeños (25 mL) de agarosa al 2% con buffer TBE 5x y agua, preteñidos con 1.5  $\mu$ L del colorante SYBR Green. Una vez preparado el gel se depositaron 8  $\mu$ L de cada oligo a 20  $\mu$ M en cada pozo. La separación electroforética se realizó con un pulso inicial de 5 minutos a 80v, un pulso de 50 minutos a 100v y un pulso final por 5 minutos a 80v. El gel se retiró de la cámara de electroforesis y se lavó con H<sub>2</sub>O bidestilda. Un registro fotográfico del gel se realizó en un equipo de fotodocumentación Gene-Genius (Gene Genius, UK), utilizando el programa GeneSnap (GeneGenius, UK). Todos los oligos purificados presentaron una sola banda indicando una pureza apropiada para las amplificaciones por qPCR.

### **6.10 Amplificación de genes por qPCR cuantitativo (SSoFast-EvaGreen).**

Previo al inicio del ensayo, en el tunel de PCR se realizó la limpieza de las campanas de flujo laminar y de mezcla de ácidos nucleicos, usando una solución de Dodecil Sulfato de Sodio (SDS, Sigma Chemicals, USA) al 0.05 % y etanol al 70 %. Posteriormente, las campanas se irradiaron con luz UV durante 15 min. Las mezclas maestras fueron preparadas en la campana de flujo laminar (cuarto blanco). Para la primera se mezclaron la solución stock de SSoFast-EvaGreen, las soluciones de oligos 20  $\mu$ M (sentido y antisentido) y H<sub>2</sub>O DEPC, de acuerdo a los cálculos para el

número de reacciones necesarias. Para cada ensayo se agregaron 8 µL de esta mezcla maestra en cada pozo de la microplaca; se cargaron 2 µL de H<sub>2</sub>O DEPC en los pozos destinados al blanco del ensayo; enseguida, la placa se transfirió a la campana del cuarto gris, donde se adicionaron 2 µL (25 ng/µL) de cada una de las muestras de cDNA por separado. Dando un volumen final de 10 µL por cada reacción de qPCR. Un ejemplo se muestra en la tabla 5.

**Tabla 5**

Componentes de reacción para los ensayos de qPCR.

Componente	Concentración	1 Rx	n Rx's
		Volumen	Volumen
SsoFastEvaGree n	2x	0.5 µL	5 µL x n
Oligo F	20µM	0.25 µL	0.25 µL x n
Oligo R	20µM	0.25 µL	0.25 µL x n
H <sub>2</sub> O	-----	2.5 µL	2.5 µL x n
<b>Volumen total</b>		<b>8 µL</b>	<b>8 µL x n</b>

Nota: Se muestran las cantidades de reactivos utilizados por reacción a partir de las mezclas maestras. Para todos los ensayos se calculó un excedente del 20% considerando el número total de reacciones a realizar, esto para garantizar que todas muestras tuvieran las mismas mezclas maestras de reacción.

Una vez depositadas todas las muestras, la microplaca fue cubierta con el adhesivo y se centrifugó durante 20 s en una centrífuga (Labnet, MPS 1000, Korea) a 1000rpm. Finalmente, la placa se llevó al cuarto de termocicladores para la amplificación de los genes antes mencionados en un termociclador LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Francia), siguiendo los ciclos de amplificación mostrados en la tabla 6.

**Tabla 6**

Valores de la planilla para la amplificación con SSoFast-EvaGreen.

Nombre del programa	Ciclos	Objetivo (°C)	Modo de Adquisición	Sostener (hh:mm:ss)	Tasa de Rampa (°C/s)	Adquisición (per °C)
Activación de la enzima	1	95	None	00:00:30	4.4	N.A
Amplificación	45	95	None	00:00:05	4.4	N.A
		60	Single	00:00:10	2.2	N.A
Curva melting	1	60	None	00:00:15	2.2	N.A
		95	Continuous	N.A	0.03	20
Enfriado	1	40	None	00:00:30	2.2	N.A

Nota: Se muestran los valores a los cuales se llevaron a cabo las amplificaciones de los 5 genes.

N.A: No Aplica.

Los resultados de Cp y las temperaturas de disociación fueron obtenidos para verificar la especificidad de la reacción, y los datos de expresión relativa fueron analizados posteriormente.

### 6.11 Determinación de la expresión relativa.

La expresión relativa (ER) de cada gen medido se calculó para cada muestra por separado y para cada una de las muestras de los 4 grupos de estudio utilizando la fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_p}$  [49], con ayuda del programa Microsoft Excel 2010. La expresión de cada gen se normalizó contra el nivel de expresión del gen constitutivo HPRT.

## **6.12 Pruebas estadísticas.**

Se realizó la prueba de Shapiro-Wilk para evaluar la distribución de los datos de expresión relativa en los diferentes grupos mediante la plataforma GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Los datos no se ajustaron a una distribución normal por lo que se utilizó un análisis de Kruskal-Wallis con post test de Dunn para comparar los niveles de expresión del grupo PDM2 con respecto a DM2, PreDM2 y CTRL. También a cada grupo se le realizó una prueba de *outliers* para excluir del análisis aquellos datos que tuvieran valores estadísticamente diferentes (atípicos) al del conjunto de datos de cada grupo, con valores excepcionalmente separados del promedio del grupo. La prueba se realizó a través de la plataforma GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Considerando que en la mayoría de los casos, los *outliers* tienen influencia en la media, pero no en la mediana, o la moda. Por lo tanto, dado que no hay una regla para identificar a los outliers, se tomó un valor como un outlier si este es mayor que 1.5 veces el valor del rango intercuartil más allá de los cuartiles [50].

## **7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

### **7.1 Grupos de estudio.**

El análisis de los datos clínicos y demográficos de los 80 sujetos de población mestiza mexicana reclutados en este estudio y que fueron clasificados en los grupos CTRL, DM2, PreDM2 y PDM2 de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión descritos en la metodología. Se muestran en la tabla 7.

**Tabla 7**

Datos demográficos de la población de estudio.

CARACTERÍSTICA	GRUPO DE ESTUDIO				p
	CTRL	PreDM2	DM2	PDM2	
n	20	20	20	20	NA
Edad (años)	44 ( $\pm$ 11)	51 ( $\pm$ 9)	49 ( $\pm$ 7)	51 ( $\pm$ 6)	0.0705
Sexo (M:F)	10: 10	4: 16	11: 9	7: 13	0.1001
Glucosa (mg/dl)	87.4 ( $\pm$ 9.8)	102.1 ( $\pm$ 16.7)	128.3 ( $\pm$ 28.3)	221.9 ( $\pm$ 89.3)	< 0.0001
HbA1c (%)	5.3 ( $\pm$ 0.2)	6.0 ( $\pm$ 0.2)	7.4 ( $\pm$ 0.8)	11.1 ( $\pm$ 1)	< 0.0001

Nota: Se muestra los promedios y desviaciones estándar de cada grupo para las variables de edad, sexo, glucosa y hemoglobina glicosilada. Así como los valores de p de las comparaciones entre grupos respecto a las variables edad, sexo, glucosa y hemoglobina glicosilada siendo analizadas con ANOVA de una vía para datos paramétricos y para datos no paramétricos la prueba de Kruskal-Wallis con un post test de Dunn para comparaciones entre los diferentes grupos y para la variable de sexo se analizó con una prueba de Chi-cuadrada. El valor de p<0.05 se consideró significativo.

## 7.2 Integridad y calidad del RNA y cDNA.

Todas las muestras de RNA mostraron una integridad aceptable, evaluada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.2%; las muestras mostraban integridad en las bandas 18s y 28s. Para la síntesis de cDNA todas las muestras presentaron un índice de pureza  $260/280 \geq 1.8$ .

## 7.3 Estandarización para la amplificación de cada Gen por qPCR.

Como control interno se utilizó una mezcla del cDNA de 10 muestras pertenecientes a los grupos CTRL, DM2, PreDM2 y PDM2 y se aplicó a las placas realizadas durante todas las amplificaciones. Se estableció un valor promedio de Cp para la

amplificación de cada gen, para poder utilizar esta mezcla como control positivo para la amplificación de cada gen en las 80 muestras del estudio. Además, esta mezcla de cDNAs se usó como control interno para controlar la variación interensayo de cada gen en las diferentes placas de qPCR que se corrieron de forma independiente, asegurando la reproducibilidad entre los diferentes ensayos. Los resultados de los valores de Cp y Tm son mostrados en la tabla 8.

**Tabla 8**

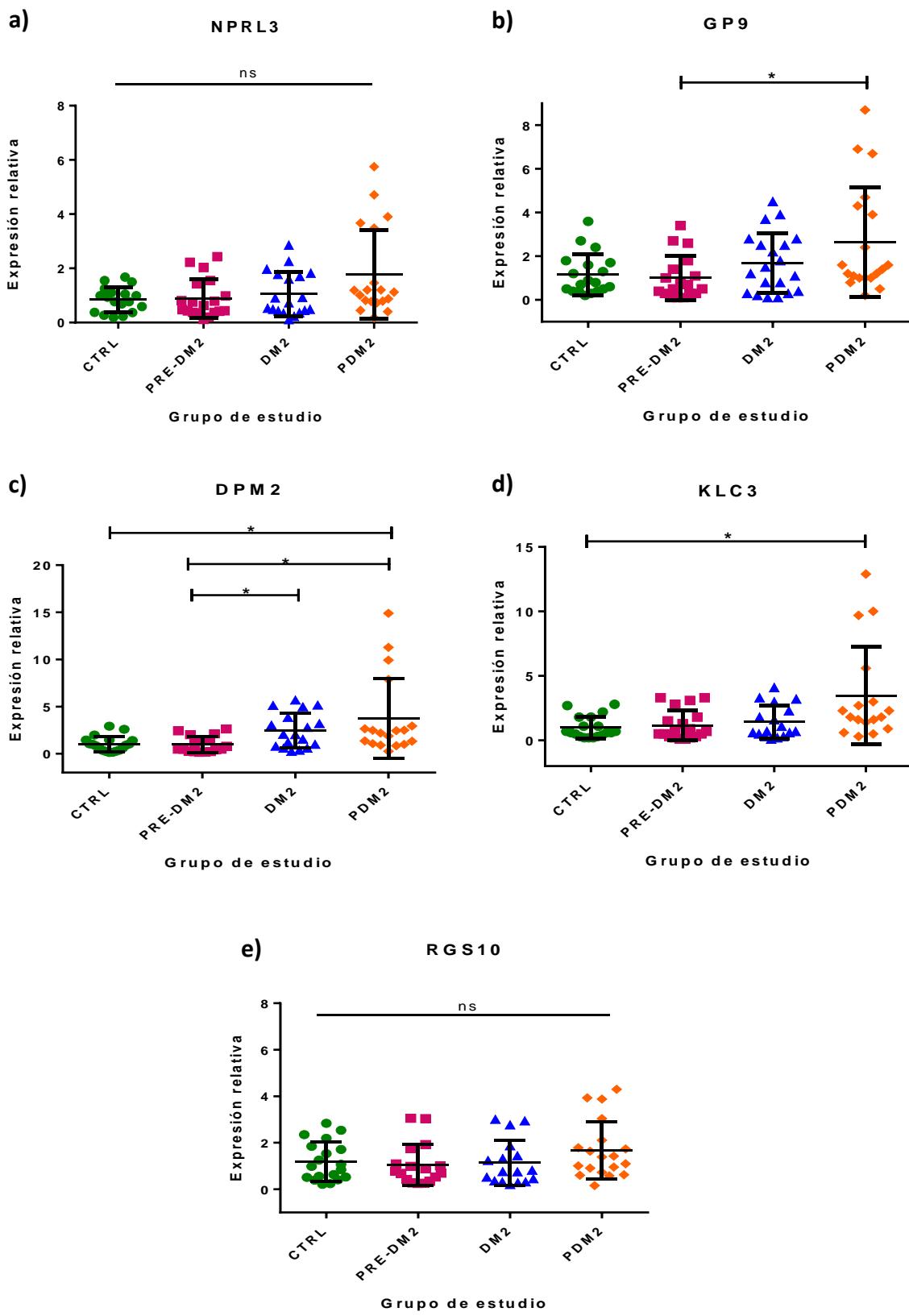
Valores de Cp y Tm en los diferentes ensayos de estandarización y establecidos como control interno/control positivo para la amplificación de cada gen utilizando una mezcla de cDNAs.

<b>Gen</b>	<b>Cp promedio</b>	<b>Tm promedio</b>
HPRT	31.37	77.05
NPRL3	32.08	77.62
GP9	29.24	85.94
DPM2	36.24	80.09
KLC3	35.77	82.98
RGS10	24.48	81.40

Nota: se muestran el valor promedio de cada triplicado.

## **7.4 Expresión de los genes NPRL3, GP9, DPM2, KLC3 y RGS10 en los grupos CTRL, DM2, PreDM2 y PDM2.**

Se realizó análisis de expresión relativa de cada gen en todos los grupos usando los valores de Cp obtenidos en los ensayos de amplificación por qPCR en tiempo real. Cada dato fue validado mediante el control positivo, control negativo y el control interno. La expresión relativa de cada gen evaluada mediante el método de Livack [49], utilizó los valores de Cp promedio del grupo de controles sanos y HPRT (normalización). En la figura 3 se muestran las comparaciones de expresión relativa para los genes NPRL3, GP9, DPM2, KLC3 y RGS10 en los diferentes grupos de estudio. Nuestros experimentos demuestran que la expresión del gen GP9 (figura 3b) presentó un aumento en el grupo PDM2 respecto al grupo PreDM2 ( $p^* = 0.0373$ ), con una diferencia de expresión cercana a 1.5, de igual manera existió un ligero aumento de expresión respecto a los grupos CTRL y DM2, pero sin presentar diferencias significativas ( $p = 0.2661$ ). De manera interesante se observó un incremento en la expresión del gen DPM2 (figura 3c) en el grupo PDM2 respecto a los grupos CTRL y PreDM2 ( $p^* = 0.0165$  y  $0.0125$  respectivamente), con una diferencia de expresión cercana a 2.5 veces, de igual manera se observó una diferencia significativa entre los grupos DM2 y PreDM2 ( $p^* = 0.0469$ ). El gen KLC3 (figura 3d) presentó un aumento significativo entre el grupo PDM2 respecto al grupo CTRL ( $p^* = 0.0365$ ), con un aumento de expresión cercana a 2.5 veces. Finalmente, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el análisis de los genes NPRL3 y RGS10 (figuras 3a y 3e, respectivamente), aunque detectó un ligero aumento entre la expresión de estos genes en el grupo PDM2 respecto a los grupos CTRL, PreDM2 y DM2.



**Figura 3. Expresión relativa (ER) de los genes NPRL3, GP9, DPM2, KLC3 y RGS10.** La expresión relativa de los genes para cada muestra se calculó con la ecuación  $2^{-\Delta\Delta C_p}$  [49], utilizando HPRT como gen constitutivo para la normalización del ensayo. Las diferencias de expresiones relativas entre los 4 grupos de estudio se analizaron mediante la fórmula de Kruskal-Wallis y un post test de Dunn. Cada grupo incluyó 20 sujetos seleccionados de acuerdo a los criterios de inclusión. Los outliers presentados en cada grupo fueron descartados para su análisis. \* $p < 0.05$  con 95 % de intervalo de confianza.

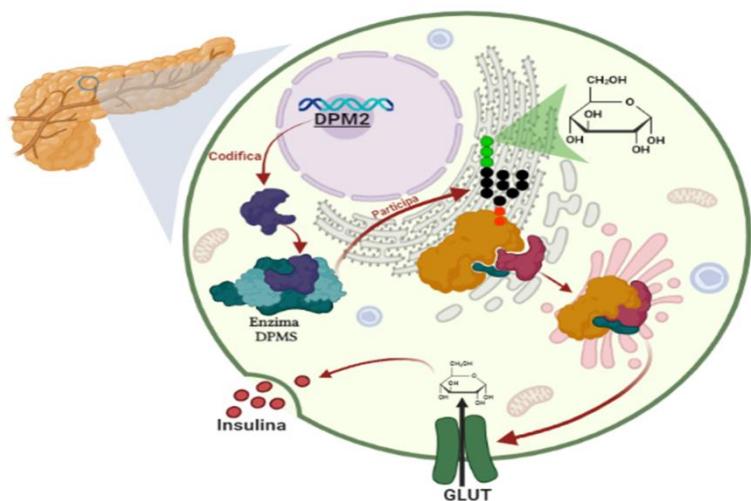
En la actualidad, existe poca información respecto a las huellas transcriptómicas que presentan los pacientes con DM2 con pobre control glucémico. En un estudio previo utilizando microarreglos de expresión contenido 44 mil secuencias humanas [26], se obtuvó un transcriptoma diferencial de 71 genes sobreexpresados en pacientes con DM2 de pobre control glucémico. En este trabajo se amplió el tamaño de muestra, creando un grupo de prueba (“*test set*”) con un mayor número de pacientes de los grupos PDM2, DM2 y controles sin DM2, para evaluar y corroborar por qPCR, los resultados previamente obtenidos por microarreglos, para los genes NPRL3, GP9, DPM2, KLC3 y RGS10.

Por principio, para la selección de los sujetos de este estudio se consideró parear la edad y sexo de los sujetos. Esto es importante porque se ha demostrado que la edad y el sexo influyen en los resultados de expresión génica, como se ha demostrado para la inmunosenescencia, en donde se han observado alteraciones relacionadas con la edad que ocurren en el sistema inmunitario [51], y pudieran tener un sesgo en términos de la expresión génica asociados a DM2. Así, nuestros grupos de PDM2, DM2, PREDM2 y CTRL no mostraron diferencias significativas en las edades de los sujetos reclutados al realizar la prueba de Kruskal Wallis con post test de Dunn ( $p=0.075$ ). En este sentido, se analizaron las diferencias en la variable del género mediante la prueba de Chi-cuadrada, demostrando que no existió ninguna diferencia significativa ( $p=0.1001$ ) entre los grupos de pacientes reclutados.

Como era de esperarse, en el caso de las variables de glucosa y hemoglobina glicosilada, hubo diferencias significativas (con una  $p < 0.0001$ ) entre los grupos, lo cual confirmo que nuestros criterios de inclusión fueron correctos para todos los grupos de pacientes seleccionados (tabla 3).

Al realizar los análisis de expresión relativa, encontramos que la expresión del gen DPM2 mostró diferencias entre el grupo de PDM2 respecto a los grupos CTRL y PREDM2. Estos resultados confirman nuestra hipótesis de que este gen se sobreexpresa exclusivamente en pacientes PDM2, lo que implica que puede ser un buen candidato a biomarcador para mal control de la diabetes. Desde el punto de vista funcional, Radencovik y colaboradores [39], describen que DPM2 es un gen que codifica para una subunidad reguladora que forma parte del complejo heterotrimérico dolicol-fosfato-manosa sintasa (DPMS) enzima clave en la glicosilación ligada a nitrógeno (N). Otros autores [52, 53] han descrito que DPM2 está relacionado con la biosíntesis de N-glucano, el transporte al Golgi y su posterior modificación [27, 53]. Desde el punto de vista funcional, esto resulta relevante porque se ha establecido que los perfiles de N-glicosilación están emergiendo como biomarcadores y efectores funcionales en varios tipos de diabetes, y la expresión alterada de DPM2 en pacientes pudiera implicar una desregulación en la síntesis de estos compuestos. Por ejemplo, los N-glucanos juegan un papel importante en la prevención del deterioro de la secreción de insulina estimulada por la glucosa al mantener el transportador de glucosa en la orientación adecuada, este proceso se muestra en la figura 4. Si este es el caso, la expresión del gen DPM2 podría tener impacto en la variación interindividual en la N-glicosilación de proteínas, lo cual podría sugerir que la sobreexpresión de genes como DPM2 representaría un nuevo factor de riesgo que contribuye al desarrollo de diabetes [54]. Nuestros datos sugieren que la sobreexpresión del gen DPM2 podría ser un indicador temprano en el desarrollo de la diabetes *mellitus* tipo 2 y sus posteriores complicaciones por un mal control glucémico al desregular la vía de los N-glucanos. Además, los resultados sugieren que la medición de la expresión de este gen puede ser de utilidad para la

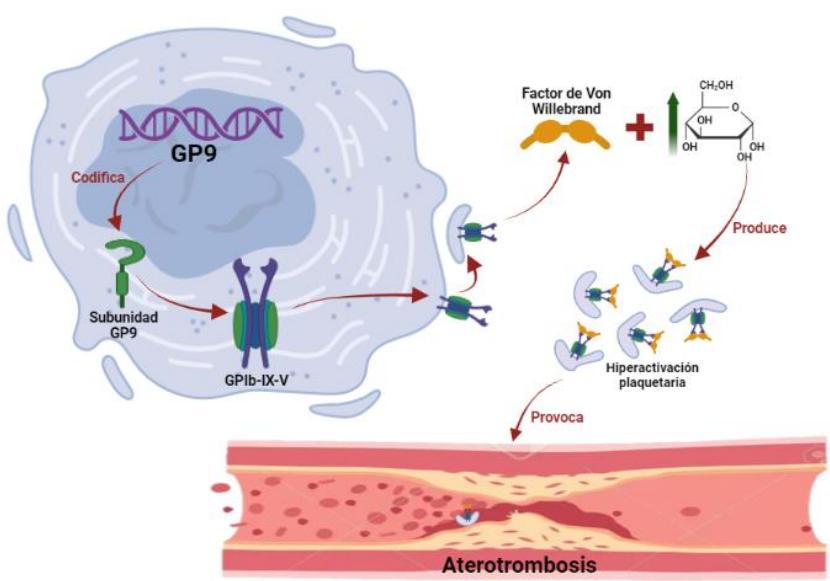
identificación de pacientes con pobre control glicémico respecto a sujetos con diabetes de buen control, sujetos prediabéticos o sujetos sanos, al igual que lo hace la medición de hemoglobina glicada (Hb1Ac).



**Figura 4. Esquema representativo de la participación del gen DPM2 en el desarrollo de DM2.** Muestra como el gen DPM2 podría participar en el desarrollo de DM2 mediante los perfiles de N-glicosilación.

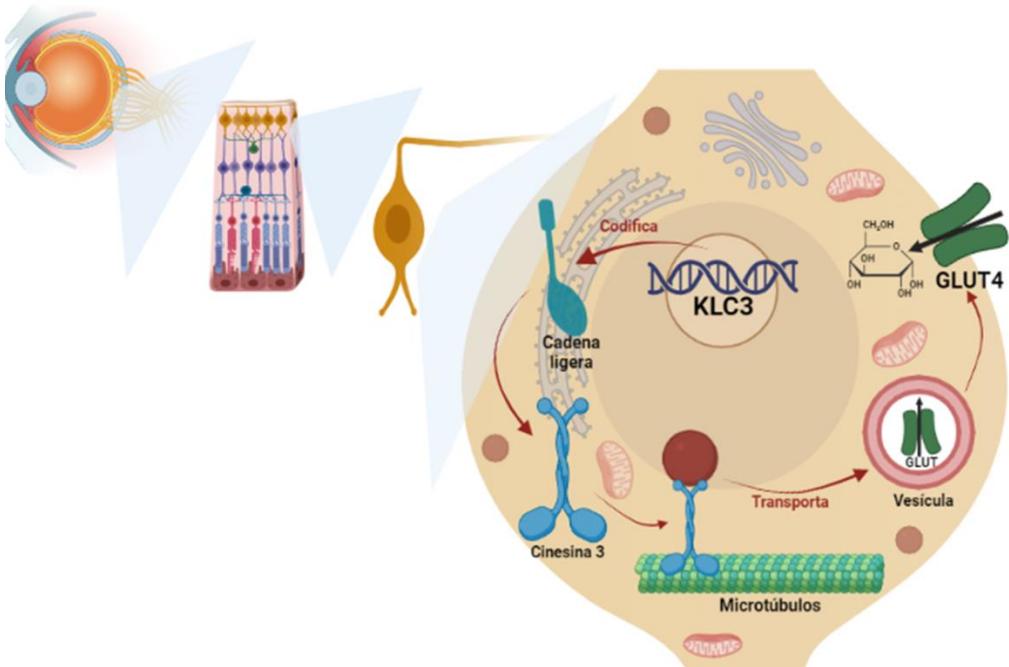
Si bien se ha confirmado que el gen GP9 codifica para una subunidad de un complejo glicoproteico de la membrana plaquetaria [27, 32]; también se ha identificado su función como un receptor para el factor de von Willebrand, que inicia el control de la hemostasia después de una lesión [55]. Resulta interesante que en la activación de la vía del factor de von Willebrand puede ocurrir hiperactivación plaquetaria asociada a hiperglicemia [58], con hiperactividad plaquetaria con altos niveles de glucosa en pacientes diabéticos [59, 60]. Se ha reportado que variantes en este gen están asociadas con el síndrome de Bernard-Soulier, el cual se caracteriza por presentar macrotrombocitopenia y tendencia al sangrado [56, 57]. En particular, las plaquetas de sujetos diabéticos se caracterizan por la desregulación

de varias vías de señalización que conducen a una mayor adhesión [61]. Gómez y colaboradores describen que las glicoproteínas como GP9 participan de forma crítica en la adhesión de las plaquetas al subendotelio expuesto [62]. Nuestros resultados de expresión elevada de GP9 en pacientes con PDM2 confirman que puede estar participando en procesos como los son la aterotrombosis y otras complicaciones en pacientes con DM2, sobre todo cuando los pacientes presentan un aumento de la activación plaquetaria como se muestra en la figura 5; y esta información resulta ser de gran utilidad para futuros estudios en los que se pueda evaluar la inhibición de este gen [63].



**Figura 5. Esquema representativo de la participación del gen GP9 en DM2.** Muestra como el gen GP9 podría estar participando en el desarrollo de aterotrombosis en pacientes con DM2 mediante la hiperactivación plaquetaria.

Si observamos en este sentido, consideramos que es necesario aumentar el tamaño de la muestra con la finalidad de establecer de manera estadísticamente significativa si existe este incremento. De acuerdo a su función, el gen KLC3 codifica para la cadena ligera de cinesina 3 y se expresa en varios tejidos, incluidos testículos y cerebro [27, 40]. Las cinesinas-3 son motores moleculares involucrados en el transporte de carga (vesículas) a lo largo de los microtúbulos. Se sabe que el transporte intracelular de GLUT4 y de la insulina se lleva a cabo mediante vesículas transportadas por cinesinas [70, 71, 72]. Además, las cinesinas realizan funciones en la regularización de p38 para la mielinización del sistema nervioso [64, 65, 66, 67, 68]. Se ha descrito que mutaciones en KLC3 se asocian con atrofia óptica y neuropatía [27, 69], y que un gran porcentaje de personas con DM2 desarrolla daños en sistema nervioso. En conjunto, los datos publicados sugieren un papel de las cinesinas en DM2, por lo que nuestros resultados observados en pacientes con PDM2 sugieren que esta sobreexpresión de KLC3 podría estar involucrada en el desarrollo de complicaciones como las neuropatías en pacientes con PDM2, lo cual se intenta representar en la figura 6. Sin embargo, es necesario ampliar el tamaño de la muestra para poder comprobar estos resultados.



**Figura 6. Esquema representativo de la participación del gen KLC3 en células de pacientes con DM2.** Muestra como el gen KLC3 podría estar participando en el desarrollo de complicaciones neuropáticas en pacientes con DM2 mediante el transporte de GLUT4 a través de cinesinas.

El gen RGS10 participa en la regulación de la inflamación pero no se ha descrito que participe en el desarrollo de DM2, sin embargo, se ha descrito que la DM2 provoca un estado de inflamación en los pacientes [73]. Kyung Lee y colaboradores sugieren que RGS10 juega un papel importante en la determinación de las respuestas de activación de los macrófagos [74], pero no describe si se trata de macrófagos inflamatorios. Cabe mencionar que la población de monocitos es mayoritaria (del 5 - 8%) en las muestras de sangre con respecto a la población de macrófagos que es más escasa (3.7% de todos los leucocitos). En segundo lugar, transcripcionalmente los macrófagos son clásicamente una población celular dominante involucrada en el establecimiento del perfil inflamatorio en los sitios de respuesta. Durante el desarrollo de la resistencia a la insulina y de la activación de señales inflamatorias

en la progresión de la diabetes *mellitus* tipo 2 estas células podrían acumularse en tejido adiposo, donde su sobreexpresión sería más acentuada [75]. Para el gen NPRL3 que es un regulador de la activación de mTOR [76], se sabe que en los pacientes con diabetes *mellitus* exhiben una señalización desregulada de mTOR [77, 78, 79].

Finalmente, es necesario validar la expresión de los genes descritos en este estudio en ensayos *in vitro* y corroborar su sobreexpresión se encuentre asociada a la hiperglicemia en los pacientes, y sobre todo requerimos profundizar nuestros experimentos en una población más representativa de pacientes y controles.

Continuar con este estudio representaría ventajas significativas en la búsqueda de biomarcadores para detección de diabetes y sus complicaciones en etapas tempranas.

El presente estudio aporta información novedosa y relevante sobre genes que no se habían reportado previamente en asociación con el desarrollo de DM2 y, por lo tanto, nuestros datos sientan las bases para estudios posteriores dirigidos a la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos para la prevención de las complicaciones de la diabetes. Sería muy interesante evaluar si estos genes se asocian a la elevación de los niveles de HbAc1, la cual aumenta también en sujetos con mal control glucémico como ocurre con DPM2, GP9 y KLC3.

## **8. CONCLUSIONES.**

De acuerdo a la metodología implementada y descrita anteriormente para este estudio, se logró establecer el estado de expresión de los genes NPRL3, GP9, DPM2, KLC3 y RGS10 entre los grupos de pacientes con DM2, con pobre control glucémico respecto a pacientes DM2 y sujetos control sin DM2 (CTRL). Y de esta manera determinar la implicación que podrían llegar a tener dichos genes en el desarrollo y diagnóstico de complicaciones comúnmente presentadas en pacientes con DM2.

DPM2 y GP9 son candidatos a biomarcadores asociados a pacientes PDM2, mientras que KLC3 resulta buen candidato pero requiere ensayos en una población más grande de pacientes para su confirmación. Este no es el caso para los genes RGS10 y NPRL3, que no demuestran diferencias significativas de expresión entre los grupos.

## **9. BIBLIOGRAFIAS.**

1. Russo, M. et al. (2023). Prevalencia de diabetes, características epidemiológicas y complicaciones vasculares. *Arch Cardiol Mex*, 93(1), 30–36. <https://doi.org/10.24875/ACM.21000410>
2. World Health Organization. (9 December 2020). The top 10 causes of death. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
3. Hernández, M. et al. (2016). Alimentary and lifestyle changes as a strategy in the prevention of metabolic syndrome and diabetes mellitus type 2: milestones and perspectives. *An. Sist. Sanit. Navar*, 39(2), 269-289. <https://doi.org/10.23938/ASSN.0267>
4. Barquera, S. et al. (2018). Collaborative research and actions on both sides of the US-Mexico border to counteract type 2 diabetes in people of Mexican origin. *BMC Part of Springer Nature*, 14(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12992-018-0390-5>
5. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (10 de Noviembre de 2022). Estadísticas a propósito del día mundial de la Diabetes. <https://www.inegi.org.mx/app/saladeprensa/noticia.html?id=7746>
6. Gasteiz, V. (2008). Epidemiología y repercusiones sanitarias de la diabetes mellitus tipo 2. En E. J. A. Zerbitzu Nagusia (Ed.), *Guía de Práctica Clínica sobre Diabetes tipo 2* (1<sup>a</sup> ed., pp. 35-37). Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco. [https://portal.guiasalud.es/wp-content/uploads/2019/01/GPC\\_429\\_Diabetes\\_2\\_Osteba\\_compl.pdf](https://portal.guiasalud.es/wp-content/uploads/2019/01/GPC_429_Diabetes_2_Osteba_compl.pdf)
7. Velasco, B. y Brena, V. (2014). Diabetes Mellitus Tipo 2: Epidemiología y Emergencia en Salud. *Salud y Administración*, 1(2), 11-16. <https://revista.unsis.edu.mx/index.php/saludyadmon/article/view/85>
8. Cervantes, R. y Presno, J. (2013). Fisiopatología de la diabetes y los mecanismos de muerte de las células β pancreáticas. *Endocrinología y Nutrición*, 21(3), 98-106. <https://www.medigraphic.com/pdfs/endoc/er-2013/er133a.pdf>
9. Scherer, P. (2019). The many secret lives of adipocytes: implications for diabetes. *Diabetologia*, 62(2), 223-232. <https://doi.org/10.1007/s00125-018-4777-x>

10. Takahashi, M. et al. (2018). Fatty pancreas: A possible risk factor for pancreatic cancer in animals and humans. *Cancer Sci*, 109(10), 3013-3023. .  
<https://doi.org/10.1111/cas.13766>
11. Carulli, L. et al. (2005). Review article: diabetes, genetics and ethnicity. *Aliment Pharmacol Ther*, 22(2), 16-19. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2005.02588.x>
12. Gutiérrez, C., Roura, A. y Olivares, J. (2017). Molecular Mechanisms of Insulin Resistance: An Update. *Gac Med Mex*, 153(2), 214-228.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28474708/>
13. Galicia, U. et al. (2020). Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int. J. Mol. Sci*, 21(17), 6275. <https://doi.org/10.3390/ijms21176275>
14. Yang, Q., Vijayakumar, A. y Khan, B. (2018). Metabolites as regulators of insulin sensitivity and metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19(10), 654–672.  
<https://doi.org/10.1038/s41580-018-0044-8>
15. Boniakowski, A. et al. (2017). Macrophage - Mediated Inflammation in Normal and Diabetic Wound Healing. *J Immunol*, 199(1), 17–24.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700223>
16. Ansar, W. y Ghosh, S. (2016). Inflammation and Inflammatory Diseases, Markers, and Mediators: Role of CRP in Some Inflammatory Diseases. En *Biology of C Reactive Protein in Health and Disease* (pp. 67-107). Springer  
[https://doi.org/10.1007/978-81-322-2680-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2680-2_4)
17. Brunetti, A., Chiefari, E. y Foti, D. (2014). Recent advances in the molecular genetics of type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes*, 5(2), 128-140.  
<https://doi.org/10.4239/wjd.v5.i2.128>
18. Corbi, S. et al. (2020). Circulating lymphocytes and monocytes transcriptomic analysis of patients with type 2 diabetes mellitus, dyslipidemia and periodontitis. *Sci Rep*, 10(1), 8145. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65042-9>
19. González, A. et al. (2010). Control glucémico en pacientes ambulatorios con diabetes en la consulta externa del Hospital General de México. *Revista Médica del Hospital General de México*, 73(3), 161-165. <https://www.elsevier.es/en>

revista-revista-medica-del-hospital-general-325-articulo-control-glucemico-pacientes-ambulatorios-con-X0185106310902788

20. Skyler, J. (1996). Diabetic complications. The importance of glucose control. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 25(2), 243-254. [https://doi.org/10.1016/s0889-8529\(05\)70323-6](https://doi.org/10.1016/s0889-8529(05)70323-6)
21. Kirkman, M. et al. (2018). Intensive Blood Glucose Control and Vascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 47(1), 81-96. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2017.10.002>
22. Cruz, S. et al. (2017). Expression Profile of Genes Potentially Associated with Adequate Glycemic Control in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res*, 2017(2180819), 1-9. <https://doi.org/10.1155/2017/2180819>
23. Machiyama, T. et al. (2018). TNF receptor associated factor 5 controls oncostatin M-mediated lung inflammation. *Biochem Biophys Res Commun*, 499(3), 544-550. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.186>
24. Farahi, N. et al. (2017). Neutrophil-mediated IL-6 receptor trans-signaling and the risk of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Hum Mol Genet*, 26(8), 1584-1596. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx053>
25. Carvalho, P. et al. (2019). Apoptosis Transcriptional Profile Induced by Porphyromonas gingivalis HmuY. *Mediators Inflamm*, 2019(6758159), 1-8. <https://doi.org/10.1155/2019/6758159>
26. Jaime, E. et al. (2018). Datos de microarreglos. Datos no publicados. UIBMZ.
27. GeneCards. (01 de abril de 2022). GeneCards: The Human Gene Database. LifeMap sciences. Recuperado el 15 de Mayo de 2022 de <https://www.genecards.org/>
28. Chandrasekar, I. et al. (2021). Hemimegalencephaly and intractable seizures associated with the NPRL3 gene variant in a newborn: A case report. *Am J Med Genet A*, 185(7), 2126-2130. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.62185>
29. Ishida, S. et al. (2022). Dorsal telencephalon-specific Nprl2-andNprl3 knockout mice:novel mous emodels for GATORopathy. *Hum Mol Genet*, 31(9), 1519-1530. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddab337>

30. Zhou, Y. et al. (2021). FKBP39 controls nutrient dependent Nprl3 expression and TORC1 activity in Drosophila. *Cell Death Dis*, 12(6), 571. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03860-z>
31. Fang, Y. et al. (2021). Opposing functions of β-arrestin 1 and 2 in Parkinson's disease via microglia inflammation and Nprl3. *Cell Death Differ*, 28(6), 1822-1836. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-00704-9>
32. Gentilini, F. et al (2019). A large deletion in the GP9 gene in Cocker Spaniel dogs with Bernard-Soulier syndrome. *PLoS One*, 14(9), 1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220625>
33. Meehan, T. et al. (2017). Disease Model Discovery from 3,328 Gene Knockouts by The International Mouse Phenotyping Consortium. *Nat Genet*; 49(8), 1231–1238. <https://doi.org/10.1038/ng.3901>.
34. Kifer, D. et al. (2021). N-glycosylation of immunoglobulin G predicts incident hypertension. *J Hypertens*, 39(12), 2527-2533. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000002963>
35. Jiang, X. et al. (2021). Exploring Diagnostic Biomarkers and Comorbid Pathogenesis for Osteoarthritis and Metabolic Syndrome via Bioinformatics Approach. *Int J Gen Med*, 2021(14), 6201-6213. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S325561>
36. Pu, L. et al. (2003). A single point mutation resulting in an adversely reduced expression of DPM2 in the Lec15.1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 312(3), 555-561. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.10.152>
37. Maeda, Y. et al. (1998). DPM2 regulates biosynthesis of dolichol phosphate-mannose in mammalian cells: correct subcellular localization and stabilization of DPM1, and binding of dolichol phosphate. *EMBO J*, 17(17), 4920-4929. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.17.4920>
38. Barone, R. et al. (2012). DPM2-CDG: A Muscular Dystrophy–Dystroglycanopathy Syndrome with Severe Epilepsy. *Ann Neurol*, 72(4), 550-558. <https://doi.org/10.1002/ana.23632>

39. Radenkovic, S. et al. (2021). Expanding the Clinical and Metabolic Phenotype of DPM2 deficient Congenital Disorders of Glycosylation. *Mol Genet Metab*, 132(1), 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2020.10.007>
40. Bhullar, B. et al. (2003). Association of Kinesin Light Chain with Outer Dense Fibers in a Microtubule-independent Fashion. *J Biol Chem*, 278(18), 16159–16168. <https://doi.org/10.1074/jbc.M213126200>
41. Zhang, Y. et al. (2012). KLC3 is involved in sperm tail midpiece formation and sperm function. *Dev Biol*, 366(2), 101-110. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.04.026>
42. Cgung, S. et al. (2007). The anatomy of the cerebellar nuclei in the normal and scrambler mouse as revealed by the expression of the microtubule-associated protein kinesin light chain 3. *Brain Res*, 1140(2007), 120-131. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.01.100>
43. Fang, X. et al. (2018). Depletion of Regulator-of-G-protein signaling-10 in mice exaggerates high-fat diet-induced insulin resistance and inflammation, and this effect is mitigated by dietary green tea extract. *Nutr Res*, 70, 50-59. <http://doi.org/10.1016/j.nutres.2018.06.004>
44. Almutairi, F. et al. (2021). RGS10 Reduces Lethal Influenza Infection and Associated Lung Inflammation in Mice. *Front Immunol*, 12(772288), 1-14. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2021.772288>
45. Almutari, F. et al. (2021). PI3K/ NF-κB-dependent TNF-α and HDAC activities facilitate LPS-inducedcRGS10 suppression in pulmonary macrophages. *Cell Signal*, 86(110099), 1-14. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110099>
46. Dehelian, D. et al. (2020). RGS10 and RGS18 differentially limit platelet activation, promote platelet production, and prolong platelet survival. *Blood*, 136(15), 1773-1782. <http://doi.org/10.1182/blood.2019003251>
47. Secretaría General. (02 de Abril de 2014). Reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud. Última reforma DOF 02-04-2014. [https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/regley/Reg\\_LGS\\_MIS.pdf](https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/regley/Reg_LGS_MIS.pdf)

48. Secretaría de Salud. (21 de Marzo de 2017). Declaración de Helsinki. Antecedentes y posición de la Comisión Nacional de Bioética. <http://www.conbioetica-mexico.salud.gob.mx/descargas/pdf/helsinki.pdf>
49. Livak, K. y Schmittgen, T. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the 2<sup>DDCT</sup> Method. *Methods*, 25(4), 402-408. <http://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
50. Varsity tutors (s.f.). Valores más extremos (Outliers). All Rights Reserved. Recuperado el 08 de Junio de 2022 de [https://www.varsitytutors.com/hotmath/hotmath\\_help/spanish/topics/outliers](https://www.varsitytutors.com/hotmath/hotmath_help/spanish/topics/outliers)
51. Oztolaza, A. et al. (2020). Immunosenescence: the role of age in multiple sclerosis. *Neurologia* (Engl Ed), 38(4), 284-290. <http://doi.org/10.1016/j.nrl.2020.05.016>.
52. Manrique, S. et al. (2021). Los desórdenes congénitos de la glicosilación. Serie La glicobiología: avances en temas de salud prioritarios. <https://libros.uaem.mx/archivos/epub/desordenes-congenitos/desordenes-congenitos.pdf>
53. Lorenz, V. (11 de Marzo de 2016). Mecanismos de regulación enzimática en la biosíntesis de glicanos de tipo O-GalNAc. Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/106924?show=full>
54. Rudman, N. et al. (2019). Altered N-glycosylation profiles as potential biomarkers and drug targets in diabetes. *FEBS Lett.*, 593(13), 1598-1615. <http://doi.org/10.1002/1873-3468.13495>
55. Turba, M. et al. (2019). A large deletion in the GP9 gene in Cocker Spaniel dogs with Bernard-Soulier syndrome. *PLoS One*, 14(9), 1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220625>
56. Ghalloussi, D. et al. (2020). Bernard–Soulier syndrome: first human case due to a homozygous deletion of GP9 gene. *Revista Br J Haematol*, 188(6), 87-90. <https://doi.org/10.1111/bjh.16374>

57. Lin, Q. et al. (2022). Establishment of a Bernard-Soulier syndrome model in zebrafish. *Haematologica*, 107(7), 1655-1668. <https://doi.org/10.3324/haematol.2021.278893>
58. Manel, D. (2014). Platelet Function and Hyperglycemia in Acute Coronary Syndrome. *Rev Esp Cardiol*, 67(1), 3–5. <http://doi.org/10.1016/j.rec.2013.08.011>
59. Kaur, R. et al. (2018). Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: molecular insights and therapeutic strategies. *Cardiovasc Diabetol*, 17(121), 1-17. <https://doi.org/10.1186/s12933-018-0763-3>
60. Neergaard, P. et al. (2016). Platelets and Antiplatelet Therapy in Patients with Coronary Artery Disease and Diabetes. *Semin Thromb Hemost*, 42(03), 234-241. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1571308>
61. Vazzana, N. et al. (2012). Diabetes mellitus and thrombosis. *Thromb Res*, 129(3), 371-377. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2011.11.052>
62. Gómez, B. et al. (2018). Fisiología plaquetaria, agregometría plaquetaria y su utilidad clínica. *Med Int Méx*, 34(2), 244-263. <https://doi.org/10.24245/mim.v34i2.1908>
63. Santilli, F. et al. (2015). Platelets and diabetes mellitus. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 120(2015), 28-39. <http://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2015.05.002>
64. Soppina, V. et al. (2014). Dimerization of mammalian kinesin-3 motors results in superprocessive motion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111(15), 5562-5567. <http://doi.org/10.1073/pnas.1400759111>
65. Santiago, S. (Octubre de 2018). Optimización de la cristalización del dominio tallo de la cadena pesada de la dineína citoplásmica humana 1. Centro de investigación y de estudios avanzados del instituto politécnico nacional. <https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/1230>
66. Junco, A. et al. (2001). Kinesin Light-Chain KLC3 Expression in Testis Is Restricted to Spermatids. *Biol Reprod*, 64(5), 1320-1330. <http://doi.org/10.1095/biolreprod64.5.1320>

67. Liang, Y. y Yang, W. (2018). Kinesins in MAPK cascade: How kinesin motors are involved in the MAPK pathway?. *Gen*, 684, 1-9.  
<http://doi.org/10.1016/j.gene.2018.10.042>
68. Morel, M. et al. (2012). Levels of kinesin light chain and dynein intermediate chain are reduced in the frontal cortex in Alzheimer's disease: implications for axoplasmic transport. *Acta Neuropathol*, 123(1), 71-84.  
<http://doi.org/10.1007/s00401-011-0901-4>
69. Okamoto, N. et al. (2014). KIF1A mutation in a patient with progressive Neurodegeneration. *J Hum Genet*, 59(11), 639-641.  
<http://doi.org/10.1038/jhg.2014.80>
70. Morfini, G. et al. (2002). Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and negatively regulates kinesin-based motility. *EMBO J*, 21(3), 281-293.  
<http://doi.org/10.1093/emboj/21.3.281>
71. Semiz, S. et al. (2003). Conventional kinesin KIF5B mediates insulin-stimulated GLUT4 movements on microtubules. *EMBO J*, 22(10), 2387-2399.  
<http://doi.org/10.1093/emboj/cdg237>
72. McDonald, A. et al. (2009). Control of insulin granule dynamics by AMPK dependent KLC1 phosphorylation. *Islets*, 1(3), 198-209.  
<http://doi.org/10.4161/isl.1.3.9608>
73. Wei, W. et al. (2022). Inhibition of RGS10 Aggravates Periapical Periodontitis via Upregulation of the NF-κB Pathway. *J Endod*, 48(10), 1308-1318.  
<http://doi.org/10.1016/j.joen.2022.07.009>
74. Lee, K. et al. (2003). Critical Role of Regulator G-Protein Signaling 10 (RGS10) in Modulating Macrophage M1/M2 Activation. *PLoS One*, 8(11), e81785.  
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0081785>
75. Espinoza, J. et al. (2012). Alternatively ActivatedMacrophages in Types 1 and 2 Diabetes. *Mediators of Inflammation*, 2012(815953) 1-10.  
<https://doi.org/10.1155/2012/815953>

76. Iffland, P. et al. (2022). NPRL3 loss alters neuronal morphology, mTOR localization, cortical lamination, and seizure threshold. *Brain*, 145(11), 3872-3885. <https://doi.org/10.1093/brain/awac044>
77. Saxton, R. y Sabatini, D. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 168(6), 960-976. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>
78. Zhang, J. et al. (2021). Adipocyte-specific deletion of Depdc5 exacerbates insulin resistance and adipose tissue inflammation in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 569(2021), 118-124. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.07.003>
79. Zoncu, R., Efeyan, A. y Sabatini, D. (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(1), 21-35. <https://doi.org/10.1038/nrm3025>

## 10. ANEXOS

### INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLÍTICAS DE SALUD COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

#### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

(Adultos)

#### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN

**Título:** "Exacerbación de Tuberculosis mediada por Diabetes: Un programa de Investigación clínica y experimental enfocado a la identificación de las huellas moleculares que definen la susceptibilidad de los pacientes con diabetes a desarrollar esta co-morbilidad".

Lugar: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Número de registro: R-2018-785-118

**Justificación y objetivo del estudio:** La diabetes favorece el desarrollo de la tuberculosis al provocar una mayor susceptibilidad a la infección. Por ello es importante identificar y caracterizar los mecanismos y moléculas que determinan las fallas de las personas con diabetes para eliminar la tuberculosis. En esta investigación identificaremos los mecanismos moleculares que se relacionan con esta susceptibilidad para ayudar a prevenir la creciente co-epidemia de diabetes y tuberculosis en humanos.

**Procedimientos:** Si usted acepta participar ocurrirá lo siguiente: Cuando asista a la Unidad de Medicina Familiar, Hospital General de Zona o directamente al laboratorio de la Unidad de Investigación Biomédica de Zacatecas, se le harán pruebas para diagnosticar si usted está enfermo de tuberculosis. A usted se le pedirá traer tres muestras diarias consecutivas de flema. A usted se le tomara una muestra de sangre periférica de 15 ml para obtención de suero y otros 15 ml (equivalente a 6 cucharadas= 30 ml totales), para extraer material genético para el desarrollo de este proyecto y realizar la biometría hemática, química sanguínea y hemoglobina glicosilada. Nos tardaremos aproximadamente 15 minutos en la toma de muestras. El propósito de realizarle los estudios clínicos y de laboratorio es para saber más sobre sus condiciones asociadas a Tuberculosis y Diabetes. Le entregaremos los resultados de baciloscopias del estudio de flemas a los 3 días después de haberlas llevado al laboratorio, y checaremos si su muestra creció en medios de cultivo y ese resultado se lo entregaremos en 60 días hábiles. Las molestias o riesgos asociados con los procedimientos son mínimos. Se trata de estudios clínicos no invasivos que no ocasionan dolor, incomodidad o riesgo alguno. Las molestias durante la toma de muestra de sangre son mínimas. En algunas ocasiones el procedimiento para tomarle una muestra de sangre puede causar un poco de dolor o una discreta molestia, y es posible que se le pueda formar un moretón.

**Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:** Un posible beneficio de su participación en este estudio es que los resultados de las pruebas clínicas y de laboratorio que le realizaremos le proporcionarán información sobre su estado de salud. El conocer sobre su estado de salud pudiera ser un beneficio para usted. Los resultados del presente estudio contribuirán a la identificación de biomarcadores moleculares asociados al desarrollo de tuberculosis, los cuales en su momento pueden ayudar al desarrollo de un método para diagnosticar esta enfermedad más rápidamente. No recibirá un pago por su participación en este estudio, ni este estudio implica gasto alguno para usted. No recibirá ningún beneficio directo al participar en este estudio.

**Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:** Durante el transcurso de este estudio, le informaremos de cualquier hallazgo nuevo que sea importante para la decisión de participar o continuar participando en este estudio; por ejemplo, si hubiera cambios en los riesgos o beneficios por su participación en esta investigación o si hubiera nuevas alternativas de tratamiento que pudieran cambiar su opinión sobre su participación en este estudio. Si le llegamos a proporcionar información nueva, nuevamente le solicitaremos su consentimiento para seguir participando en este estudio.

**Participación o retiro:** Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Si usted decide no participar, seguirá recibiendo la atención médica brindada por el IMSS si es derechohabiente, o por alguna otra institución del Sector Salud a la cual pertenezca. En caso de ser derechohabiente del IMSS, se le ofrecerán los

procedimientos establecidos dentro de los servicios establecidos de atención médica. Es decir, que, si usted no desea participar en el estudio, su decisión, no afectará su relación con el IMSS o con ninguna otra institución del Sector Salud y su derecho a obtener los servicios de salud que reciba en ese momento. Si en un principio desea participar y posteriormente cambia de opinión, usted puede abandonar el estudio en cualquier momento. El abandonar el estudio en momento que quiera no modificará de ninguna manera los beneficios que usted tiene como derechohabiente del IMSS o de otra institución a la cual este afiliado.

**Privacidad y confidencialidad:** La información que nos proporcione que pudiera ser utilizada para identificarla/o (como su nombre, teléfono y dirección) será guardada de manera confidencial y por separado al igual que sus respuestas a los cuestionarios y los resultados de sus pruebas clínicas, para garantizar su privacidad. El equipo de investigadores, el personal a cargo del Dr. José Antonio Enciso Moreno y las personas que estén involucradas en el cuidado de su salud sabrán que usted está participando en este estudio. Sin embargo, nadie más tendrá acceso a la información que usted nos proporcione durante su participación en este estudio, al menos que usted así lo deseé. Sólo proporcionaremos su información si fuera necesario para proteger sus derechos o su bienestar (por ejemplo, si llegara a sufrir algún daño físico o si llegara a necesitar cuidados de emergencia), o si lo requiere la ley. Cuando los resultados de este estudio sean publicados o presentados en conferencias, por ejemplo, no se dará información que pudiera revelar su identidad. Su identidad será protegida y ocultada. Para proteger su identidad le asignaremos un número que utilizaremos para identificar sus datos, y usaremos ese número en lugar de su nombre en nuestras bases de datos.

**En caso de colección de material biológico (si aplica):**

- No autoriza que se tome la muestra.  
 Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio.  
 Si autorizo que se tome la muestra para este estudio y estudios futuros (10 años de vigencia).

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a: Dr. JOSE ANTONIO ENCISO MORENO, que es el investigador responsable del estudio, a los teléfonos: 01 492 92 2 60 19, en la Unidad de Investigación Médica-Zacatecas ubicada en Interior Alameda número 45, Col. Centro. En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Col. Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55)56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: conise@cis.gob.mx

---

**Nombre y firma del sujeto participante**

**Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento**

**Testigo 1**

Nombre: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Relación: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

**Testigo 2**

Nombre: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Relación: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_