

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Química Clínica Diagnóstica

“Análisis de correlación entre la expresión de genes asociados a pobre control glicémico y los niveles de hemoglobina glicada que presentan pacientes con diabetes *mellitus* tipo 2”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el

Grado de

Maestra en Química Clínica Diagnóstica

Presenta

Q.F.B Elizabeth Cristina Carrasco Ruiz

Dirigido por:

Dr. José Antonio Enciso Moreno

Dr. José Antonio Enciso Moreno

Presidente

M. en IM. David Gustavo García Gutiérrez

Secretario

Dra. Karla Isabel Lira de León

Vocal

M. en F. Enrique Villarreal Ríos

Suplente

Esp. en M.I Gabriel Frontana Vázquez

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Enero 2025

México

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



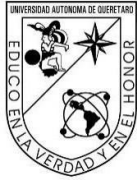
SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Química Clínica Diagnóstica

“Análisis de correlación entre la expresión de genes asociados a pobre control glicémico y los niveles de hemoglobina glicada que presentan pacientes con diabetes *mellitus* tipo 2”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el

Grado de

Maestra en Química Clínica Diagnóstica

Presenta

Q.F.B Elizabeth Cristina Carrasco Ruiz

Dirigido por:

Dr. José Antonio Enciso Moreno

Dr. José Antonio Enciso Moreno

Presidente

Firma

M. en IM. David Gustavo García Gutiérrez

Secretario

Firma

Dra. Karla Isabel Lira de León

Vocal

Firma

M. en F. Enrique Villarreal Ríos

Suplente

Firma

Esp. en M.I Gabriel Frontana Vázquez

Suplente

Firma

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Enero 2025

Índice general	3
Índice de tablas	6
Índice de figuras.....	7
Abreviaturas.....	8
Resumen	9
Abstract.....	11
1 Introducción.....	13
2 Antecedentes	16
2.1 Diabetes Mellitus tipo 2	16
2.1.1 Epidemiología	16
2.1.2 Clasificación.....	18
2.1.3 Etiología.....	20
2.1.4 Fisiopatología.....	21
2.1.5 Diagnóstico	27
2.2 Parámetros relacionados con el control glicémico	28
2.3 Análisis transcriptómico	31
2.3.1 Definición	31
2.3.2 Aplicaciones del análisis transcriptómico en el diagnóstico clínico	33
2.3.3 Transcriptoma asociado a Diabetes Mellitus tipo 2 pobre control glicémico	38
2.3.3.1 Gen NPRL3.....	43
2.3.3.2 Gen GP9	43
2.3.3.3 Gen DPM2	44
2.3.3.4 Gen SLC25A37	45

2.3.3.5 Gen RGS10	45
3 Hipótesis	47
4 Objetivos	48
4.1 General	48
4.2 Particulares	48
4.3 Profesionalizantes.....	48
5 Metodología	49
5.1 Diseño.....	50
5.1.1 Definición del universo	49
5.1.2 Tamaño de muestra	49
5.1.3 Criterios de inclusión.....	49
5.1.4 Criterios de exclusión.....	50
5.1.5 Criterios de eliminación.....	50
5.1.6 Definición de variables y unidades de medida	51
5.2 Fuentes, métodos, técnicas y procedimientos de recolección de la información	51
5.2.1 Obtención de muestras sanguíneas	51
5.2.2 Aspectos éticos.....	52
5.2.3 Purificación del RNA total a partir de sangre total de humanos.....	53
5.2.4 Síntesis de cDNA	54
5.2.5 Diseño de Oligonucleótidos	54
5.2.6 Cálculo de la expresión relativa de los genes seleccionados	57
5.2.7. Cálculo de la significancia estadística de la diferencia de expresión de cada gen entre los grupos de sujetos.	58
6. Resultados y discusión	60
6.1 Datos clínicos y sociodemográficos de los grupos de estudio.	60

6.2 Pureza e Integridad del ARN	63
6.3 Ensayos de amplificación por qPCR y expresión de los genes de los grupos de estudio	64
6.4 Análisis de correlación de la expresión relativa y porcentajes de hemoglobina glicada	71
7. Conclusiones	76
8.Referencias	77
Anexo 1: Cronograma de actividades	90
Anexo 2: Consentimiento informado.	91
Anexo 3: Carta de revocación del consentimiento informado	96
Anexo 2: Formulario para pacientes IMSS-DM.	99

Índice de tablas

Tabla 1. Criterios de diagnóstico para DM (ADA)	27
Tabla 2. Lista de los genes sobre-expresados en PDM2 con respecto a pacientes DM2 y sujetos sin DM2	40
Tabla 3. Niveles de glucosa y HbA1c utilizados como criterios de inclusión. ...	50
Tabla 4. Variables operacionales del estudio.	51
Tabla 5. Características de los oligonucleótidos.	55
Tabla 6. Mezcla de reacción utilizadas para los ensayos de qPCR	56
Tabla 7. Programa de amplificación utilizado en los ensayos de qPCR.....	57
Tabla 8. Datos clínicos y sociodemográficos de los grupos de estudio.	60
Tabla 9. Evaluación de las diferencias de expresión en los diferentes genes. .	71

Índice de figuras

Figura 1. Componentes de la vía de señalización de insulina por activación de fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)/Akt	23
Figura 2. Microfotografía de un corte transversal de un Islote pancreático de un individuo con diabetes tipo 2.....	24
Figura 3. Agregados de amilina en células beta formando fibrillas amiloideas de 6-9 nm de diámetro.....	25
Figura 4. Ruta de la gluconeogénesis.....	26
Figura 5. Pasos de desarrollo de perfil de expresión génica.....	34
Figura 6. Mapa de calor de genes diferencialmente expresados analizados por microarreglos de expresión en grupos de sujetos con DM2.	39
Figura 7. Diagrama de Venn de genes expresados diferencialmente en los grupos DM2 y PDM2.....	40
Figura 8. Niveles de expresión relativa de los genes evaluados por qPCR.....	65
Figura 9. Niveles de expresión relativa de los genes estudiados y su asociación a porcentajes de HbA1c.....	75

Abreviaturas

ADA	Asociación Americana de Diabetes
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
BCDM2	Diabetes Mellitus tipo 2 buen control glicémico
cDNA	ADN complementario
Ctrl	Sujetos aparentemente sanos
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
FID	Federación Internacional de Diabetes
G-6-P	Glucosa-6-fosfato
HbA1c	Hemoglobina Glicada
HGR2	Hospital General Regional del IMSS 2
HGZ4	Hospital General No 4 del IMSS de Celaya
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
miARN	micro ácido ribonucleico
OMS	Organización Mundial de la Salud
PEPCK	Fosfoenol piruvato carboxiquinasa
PDM2	Pobre control glicémico
PREDM2	Prediabetes

Resumen

La diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) es una enfermedad compleja que se caracteriza por una hiperglicemia generalmente asociada a la resistencia a la insulina. El control glicémico es un parámetro sustancial para identificar el desarrollo de complicaciones en pacientes con DM2, incluyendo enfermedades cardiovasculares, neuropatías, nefropatía diabética, retinopatías, etc. La medición de hemoglobina glicada (HbA1c) representa un índice único de control glicémico, pero falla en determinar complicaciones macrovasculares y microvasculares, porque su medición no es periódica y se aplica en intervalos prolongados. Considerando esto, hace falta validar otros biomarcadores de uso continuo para el control glicémico. La identificación de posibles biomarcadores asociados al aumento de HbA1c es esencial para el desarrollo de métodos diagnósticos y pronósticos que permitan identificar los riesgos asociados a las complicaciones de la DM2. La transcriptómica es una área clave de estudio utilizada previamente por nuestro grupo para la identificación de genes cuya sobreexpresión se encontró asociada a pacientes con pobre control glicémico. En este proyecto se evaluó la expresión por RT-qPCR de cinco de estos genes y la correlación estadística con los niveles de HbA1c en sangre total de 4 grupos de sujetos estratificados de acuerdo con sus niveles de glucosa y HbA1c en sangre: DM2 buen control glicémico (BCDM2), DM2 pobre control glicémico (PDM2), prediabéticos (PREDM2) y un grupo sin DM2 (CTRL). La toma de muestras fue bajo consentimiento informado en sujetos provenientes del Hospital General Regional del IMSS 2 (HGR2) y el Hospital General No 4 del IMSS de Celaya (HGZ4), seleccionados bajo los criterios de la Asociación Americana de Diabetes (ADA). Las muestras de sangre total se procesaron para la obtención de RNA total y síntesis de cDNA, y se amplificaron por qPCR con iniciadores específicos para cada gen de acuerdo con condiciones estandarizadas por nuestro grupo. Se realizó un análisis de expresión

relativa que mostró que los genes DPM2 y RGS10 tienen una sobreexpresión significativa en el grupo PDM2 respecto a los grupos Ctrl, PREDM2, y BCDM2. Además, el análisis de correlación con la hemoglobina glicada propone a DPM2 como buen candidato a biomarcador.

Palabras clave: control glicémico, hemoglobina glicada, transcriptómica.

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

Abstract

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a complex disease characterized by hyperglycemia generally associated with insulin resistance. Glycemic control is a substantial parameter for identifying the development of complications in patients with T2DM, including cardiovascular diseases, neuropathies, diabetic nephropathy, retinopathies, etc. The measurement of glycated hemoglobin (HbA1c) represents a unique index of glycemic control, but it fails to determine macrovascular and microvascular complications because its measurement is not periodic and is applied at prolonged intervals. Considering this, it is necessary to validate other continuous-use biomarkers for glycemic control. The identification of possible biomarkers associated with increased HbA1c is essential for the development of diagnostic and prognostic methods to identify the risks associated with T2DM complications. Transcriptomics is a key area of study previously used by our group to identify genes whose overexpression was found to be associated with patients with poor glycemic control. In this project, the expression of five of these genes was evaluated by RT-qPCR and statistically correlated with HbA1c levels in whole blood from four groups of subjects stratified according to their blood glucose and HbA1c levels: T2DM with good glycemic control (GCT2DM), T2DM with poor glycemic control (PCT2DM), prediabetics (PreT2DM), and a non-T2DM group (CTRL). Sample collection was done under informed consent from subjects from the IMSS Regional General Hospital 2 (HGR2), selected according to the criteria of the American Diabetes Association (ADA). Whole blood samples were processed for total RNA extraction and cDNA ~~synthesis, and~~ ~~synthesis and~~ amplified by qPCR with specific primers for each gene under conditions standardized by our group. A relative expression analysis was conducted, which showed that the genes DPM2 and RGS10 have significant overexpression in the PDM2 group compared to the Ctrl, PREDM2, and BCDM2 groups. Additionally, the correlation analysis with glycated hemoglobin suggests DPM2 as a good candidate for a biomarker.

Keywords: glycated hemoglobin, Transcriptomics, glycemic control

1. Introducción

La DM2 es una enfermedad progresiva caracterizada por niveles elevados de glucosa y un inadecuado metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Esta enfermedad está asociada a un decremento en la secreción de insulina por las células β pancreáticas (Wu et al., 2014) que provoca un incremento de la glucosa en sangre que puede conducir a una resistencia a insulina por cambios metabólicos asociados a mecanismos de lipotoxicidad y glucotoxicidad (Grill & Björklund, 2000). La importancia clínica de la DM2 radica en el aumento considerable de casos ocurridos en los últimos treinta años y que la sitúa como uno de los principales problemas de Salud Pública Mundial. En 2014, se estimaron a nivel mundial alrededor de 422 millones de casos de diabetes *mellitus* (DM), con una prevalencia del 8.5%. En la región de las Américas, la prevalencia registrada fue de 8.3%, pero estos datos tienen altos subregistros (Roglic, 2016). De todos los casos reportados más del 90 % son de DM2, mientras que el 10% restante pertenece a diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1), diabetes *mellitus* gestacional, y otros tipos más específicos de diabetes (Glovaci et al., 2019).

A partir de esta información, se ha determinado que la detección temprana de la DM2 es de suma importancia, por lo que se siguen buscando herramientas diagnósticas y pronósticas que permitan evaluar el riesgo a desarrollar la enfermedad. De acuerdo con la Asociación Americana de Diabetes (ADA), en el diagnóstico de la DM es criterio suficiente evaluar los niveles de glucosa. Sin embargo, para tener un indicativo de la progresión de la hiperglicemia, es necesaria la medición de hemoglobina glicada (American Diabetes Association, 2022). La medición de hemoglobina glicada es en la actualidad una estrategia prioritaria en el control glicémico y se considera, por tanto, necesaria para evaluar el riesgo de un individuo a desarrollar complicaciones originadas por la DM2 (Zhang et al., 2010). Si bien estas mediciones son utilizadas ampliamente hoy en día, la búsqueda

de biomarcadores en sangre para identificar en forma temprana a sujetos en riesgo, mucho antes que ocurran las manifestaciones clínicas de esta enfermedad, es un área de enorme interés. Definitivamente, el uso de nuevos métodos basados en la identificación de biomarcadores tempranos tiene mucha importancia para ayudar en el control de esta enfermedad. Por ejemplo, el análisis de expresión de genes en sangre ya ha permitido en un solo ensayo identificar biomarcadores tempranos para el control glicémico de la DM2 (Herder *et al.*,2011). La identificación y utilización de biomarcadores para el diagnóstico temprano de DM2 y/o el pronóstico de la evolución de la enfermedad permite la identificación temprana de sujetos desde el estadio de prediabetes (Mao *et al.*,2011).

El análisis de la expresión génica es una de las estrategias más utilizadas y efectivas para la identificación global de biomarcadores que puedan brindar información relevante sobre las alteraciones fenotípicas que ocurren asociadas para una diversidad de morbilidades como cáncer, enfermedades autoinmunes, padecimientos infecciosos y de tipo inflamatorio (Corbi *et al.*, 2020). En el caso de la DM2, ya sea en sujetos con riesgo genético o en sujetos donde existan alteraciones epigenéticas también puede aplicarse. En la DM2, se podrían identificar las alteraciones en la transcripción cuando son influenciadas por cambios en la dieta o por hábitos sedentarios. En particular, nuestro grupo de trabajo ha utilizado en los últimos años el análisis transcriptómico para biomarcadores que podrían ser candidatos útiles en el diagnóstico temprano de DM2, pero haciendo énfasis particular en aquellos asociados a fallas en el control glicémico en pacientes diabéticos. Estos estudios sugieren que es de suma relevancia conocer la relación entre los cambios en la expresión de los perfiles transcriptómicos en sujetos con DM2 y el pobre control glicémico que estos desarrollan conforme la evolución de la enfermedad, ya que se ha observado una directa asociación en el aumento de la transcripción para estos genes con el aumento del porcentaje de

hemoglobina glicada. Este proyecto analizó la correlación de la sobreexpresión de los genes NPLR3, GP9, DPM2, SLC25A37, RGS10 en sujetos con DM2 que presentan niveles elevados de Hb1Ac (porcentajes mayores al 8%). La medición de estos genes en estudios futuros podría servir incluso para distinguir a sujetos pre-diabéticos que podrían presentar sobreexpresión de estos genes asociadas a fallas futuras del control glicémico.

2 Antecedentes

2.1 Diabetes Mellitus tipo 2

2.1.1 Epidemiología

La DM es una enfermedad metabólica con un incremento considerable en su tasa de prevalencia a lo largo de los últimos 30 años, siendo hoy en día uno de los padecimientos crónicos más comunes a nivel mundial. Este incremento en incidencia de DM2 se debe principalmente al aumento en el sedentarismo, malos hábitos en la dieta, incremento en la tasa de envejecimiento y la predisposición genética en las poblaciones humanas actuales (Hameed et al.,2015). La DM2 tiene un impacto global importante en salud pública por lo que hay una necesidad cada vez mayor de conocer la incidencia reciente en los países afectados, sobre todo en aquellos donde su aumento ha sido notorio, como en México.

La Federación Internacional de Diabetes (FID) estimó que, en el año 2020, existían en el mundo 537 millones de adultos con diabetes, de edades entre 20 a 79 años; esto comprendía 10.5 % de la totalidad de adultos en este rango de edad. Se espera que para 2030, habrá aproximadamente 643 millones de adultos viviendo con diabetes (11.3 % de la población mundial) y 783 millones para 2045 (12.2 % respectivamente). Así, del año 2000 a la fecha, la prevalencia de esta enfermedad aumento más de tres veces, pasando de 151 millones a 537 millones. La FID estima una mortalidad de más de 6.7 millones por causas relacionadas a la diabetes en la población adulta.

Con base a proyecciones de la FID y de acuerdo con la economía de cada país, se estima que en países con medianos y bajos ingresos habrá un mayor porcentaje de casos para el año 2045, esto asociado principalmente al envejecimiento poblacional. Comparando el año 2021 con el 2045, la población mundial tendrá un aumento considerable de adultos mayores a 60 años, con un aumento en

prevalencia de DM de 24.7 %, que será todavía mayor en adultos de 75 a 79 años (25.4 %). En contraste, la prevalencia estimada para la población de entre 20 a 24 años en el año 2021 fue de 2.2 %. En cuanto al sexo, la FID estimó 17.7 millones más de hombres que mujeres diagnosticados con diabetes en 2021, ya que en total la prevalencia en las mujeres fue de 10.2% y en los hombres es de 10.8 % (Magliano *et.al.*,2021).

En el último reporte realizado en 2023 por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), se informa de 284 049 muertes por DM en la Región de las Américas, lo cual corresponde a un 4% del total de las muertes registradas en estos países. Mientras que el promedio regional de mortalidad tiene una tasa media de 20.9/100 mil habitantes, México presenta una de las tasas más altas con 71.8/100 mil habitantes (Organización Panamericana de la salud, 2023).

En México, el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reportó las estadísticas de defunciones para 2022, siendo de 89.9/100,000 habitantes para DM. Además, la DM se posicionó en el segundo lugar entre las principales causas de muerte con un total de 115,681. Respecto a esto, hasta un 2.37 % de los casos perteneció a DM no insulino-dependiente, el análisis mostro porcentajes de acuerdo al sexo, hasta 50.2 % para mujeres y 49.7 % para hombres. Además, la mayor frecuencia de defunciones según la edad ocurrió en sujetos mayores a 65 años (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2022).

La predisposición genética es un factor primordial para el desarrollo de la DM2. Por ejemplo, un descendiente de un padre o madre con DM2 enfrenta un riesgo cercano al 40 % de desarrollarla durante su vida, incrementando este riesgo a 70 % cuando ambos padres padecen DM2 (Meigs *et al.*,2000). En este sentido, los factores genéticos se suman al estilo sedentario de los individuos y a su alto

consumo calórico en sujetos afectados por DM. Por esto sigue siendo relevante realizar estudios que identifiquen las variantes genéticas involucradas con el comportamiento de la enfermedad en diferentes poblaciones (Grarup et al., 2014).

2.1.2 Clasificación

Debido a la relevancia clínica de la DM, ha surgido una necesidad imperante de identificar la etiología de la enfermedad para categorizarla en sus diferentes formas y estadios. La categorización de la DM permitió establecer un criterio diagnóstico más oportuno de la enfermedad. Con base a esto se reconoce que la DM, en cada uno de sus tipos, es una serie de desórdenes que promueven altos niveles de glucosa, como una consecuencia principal de la deficiencia y/o disminución de la secreción de insulina (DeFronzo et al., 2015).

La ADA clasifica a la DM en cuatro categorías generales. La primera corresponde a la DM1, que se define como una destrucción autoinmune de las células β -pancreáticas. La siguiente categoría se refiere a la DM2, la forma más frecuente, cuyas principales causas son la resistencia a la insulina, la deficiencia en la secreción de insulina por las células β pancreáticas y las fallas de los receptores de insulina para la utilización de glucosa por las células del organismo. El tercer tipo de diabetes incluye a las diabetes monogénicas, farmacológicas y enfermedades del páncreas exocrino. En la última categoría se incluye a la diabetes gestacional que se presenta en el segundo o tercer trimestre del embarazo, y que está más asociada a un desbalance hormonal y una alteración en demanda en las fuentes de energía (American Diabetes Association, 2022).

Los mecanismos fisiopatológicos en la DM2 están menos definidos que en la DM1, ya que, al ser más compleja, los defectos incluyen cambios metabólicos, un proceso inflamatorio de bajo grado y factores genéticos heredados (American Diabetes Association, 2022). En todos los tipos de DM ocurre un proceso de hiperglicemia que

comprende distintas etapas, que van desde niveles normales de glucosa en ayunas (valores de 70 mg/dL y hasta 100 mg/dL), alteración de la glucosa en ayunas y/o intolerancia a la glucosa, hasta tratamiento de emergencia con insulina para evitar casos de estado hiperosmolar e incluso la muerte. Por eso es importante definir el tipo de diabetes en los pacientes y la evolución de la enfermedad, ya que eso determina el tratamiento para el mejor control y regulación. En la DM2 existen pocos indicadores específicos útiles como factores de riesgo definidos, siendo la obesidad el más determinante (American Diabetes Association.,2011).

Así también ocurren complicaciones microvasculares como las nefropatías o neuropatías (Faselis *et al.*,2019), que se relaciona con fallas en el control glicémico. El control de las complicaciones está asociado con un buen control glicémico, el cual tiene como uno de los indicadores más utilizados a la medición de la hemoglobina glicada (HbA1c). Sin embargo, se ha reportado que la evaluación estricta del control glicémico únicamente con HbA1c, sin mediciones continuas de glucosa en sangre, puede pronosticar erróneamente un control glicémico y estas fallas pueden ignorar el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, y en algunos casos no detectar una hipoglicemia severa durante el monitoreo del tratamiento. Por lo que además de la utilización de la medición de HbA1c son necesarias otras pruebas de laboratorio, para dar seguimiento al tratamiento, que es fundamental para evitar el desarrollo de complicaciones en DM2 (Kusunoki *et al.*, 2022).

El control glicémico es muy importante para evitar complicaciones que lleven al tratamiento permanente con insulina, la cual aplica generalmente como una medida de emergencia para controlar hiperglicemia en la DM2. El diagnóstico temprano y la adopción de cambios hacia una dieta adecuada, el ejercicio regular y el soporte con un tratamiento farmacológico controlado, con la regulación de los niveles de glucosa en sangre usando hipoglicémicos orales de sostén,

son los requerimientos preventivos óptimos para lograr este control de la hiperglicemia (American Diabetes Association.,2011)

De acuerdo con lo anterior, para comprender la etiología de la DM2 y para su mejor clasificación, es primordial tener un historial clínico y epidemiológico que defina el proceso de desarrollo de la DM2 en cada paciente. De ahí que la clasificación actual dada por la OMS prioriza la definición del estadio clínico del paciente para seleccionar un tratamiento adecuado, dejando como opción última el tratamiento con insulina para su control (World health Organization, 2019).

2.1.3 Etiología

Como mencionamos, la DM2 se asocia con el decremento de la secreción de insulina por las células β pancreáticas. Esta disfunción se combina además con la incapacidad de los receptores de insulina de las células para la correcta utilización de glucosa por las células sanguíneas, provocando un aumento de sus niveles en sangre, fenómeno denominado como resistencia a la insulina (Brunetti et al., 2014). La resistencia a la insulina se presenta desde la etapa de prediabetes, aun cuando exista normoglicemia. Durante esta etapa temprana se han identificado cambios en la expresión de genes relacionados a la deficiencia de la secreción de insulina, pero estos cambios no son detectados por los biomarcadores actuales (Billings & Florez, 2010) . Es así como, en una etapa temprana, la deficiencia de secreción de insulina provoca una hiperglicemia de menor severidad, sin que los pacientes muestren síntomas y, por tanto, no pueden diagnosticarse midiendo únicamente los niveles de glucosa en sangre, a pesar de que desde esta fase temprana se presenten factores de riesgo cardiovascular como presión sanguínea alta, dislipidemia y obesidad(Maureen et al., 1992). Esto porque una mayor distribución de grasa corporal se relaciona con dislipidemias, que en presencia de hipertensión aumenta el riesgo cardiovascular (Maggio

et al.,2003).

Si bien la identificación de procesos fisiopatológicos y genéticos asociados a un padecimiento permiten conocer la etiología específica de la enfermedad (De Fronzo *et al.*,2015), en el caso de la DM2 las causas son multifactoriales, con un compendio de defectos moleculares heterogéneos relacionados con las alteraciones en las células β pancreáticas, con cambios negativos en el metabolismo de grasas y proteínas los cuales todavía no son completamente entendidos a nivel molecular (Castro-Juárez *et al.*, 2019).

Por otro lado, los factores epigenéticos también están estrechamente asociados con la causalidad del desarrollo de la DM2. La obesidad, inactividad física, tabaquismo, y alcoholismo son aspectos para considerar en el proceso de aparición de la DM2, ya que generan deficiencias en la homeostasis de la glucosa que conlleva a la resistencia a la insulina. La presencia de estos factores se relaciona directamente con el aumento de la prevalencia de DM2 a nivel mundial (Feinglos *et al.*,2008).

2.1.4 Fisiopatología

La fisiopatología de la DM2 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, por lo que su importancia radica en su carácter crónico-degenerativo a nivel multi-orgánico (Cornell,2015). El desarrollo fisiopatológico de la DM2 se caracteriza por un aumento en la producción de glucosa hepática, resistencia a la insulina, disfunción de las células β pancreáticas, que en conjunto impiden el metabolismo normal de glucosa mediado por la insulina en el músculo esquelético (DeFronzo & Tripathy, 2009).

Para la liberación de insulina tiene que ocurrir una despolarización de las células β ; el proceso inicia con el aumento de la concentración plasmática de carbohidratos que ingresan en la célula β , a través de

GLUT2. El GLUT2 es un transportador de glucosa con baja afinidad, que se expresa en el hígado, riñón, células β del páncreas y en la membrana basolateral de las células epiteliales del intestino delgado. El GLUT2 participa en la regulación de la secreción de insulina, ya que solo 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 induce a la liberación de la cantidad requerida de insulina para mantener la concentración de glucosa (Gutiérrez-Rodelo *et al.*,2017). Después de la ingesta de alimento, el hígado es capaz de incorporar la glucosa a través del GLUT2 para convertirla rápidamente en glucógeno (polímero de carbohidratos que funciona como almacén de estos). De forma inversa, durante el período postprandial tardío (período comprendido entre 6 y 8 horas de ayuno), el glucógeno sufre degradación para generar moléculas de glucosa, que salen de la célula hepática a la circulación sistémica, preservando de esta manera la glucemia en valores fisiológicos; El GLUT2 funciona así como un transportador bidireccional que apoya el transporte de glucosa desde la sangre al tejido o viceversa, de acuerdo a los requerimientos fisiológicos (Scherer ,2019).

La resistencia a la insulina en términos generales se refiere a una respuesta disminuida de la acción de la insulina en cualquier tejido. En la DM2 esta específicamente definido por un metabolismo alterado de glucosa en el músculo esquelético y acompañado de una regulación deficiente de la glucosa hepática por parte de la insulina (Feinglos *et al.*,2008). En la etapa temprana de la resistencia a la insulina no existe síntesis de glucógeno en el músculo. El proceso normal de metabolismo de la glucosa en músculo involucra la activación del sistema de transporte de la glucosa, por lo que un defecto en este proceso impediría la entrada de glucosa al tejido. El metabolismo de la glucosa en el músculo es llevado a cabo por reacciones de fosforilación controladas por insulina, donde se activa una cascada de señalización compleja que comienza con la unión de

la insulina a su receptor, provocando la fosforilación de tres moléculas de tirosina del receptor; posteriormente, el sustrato del receptor de insulina (IRS)-1 se mueve a la membrana celular para continuar la cascada. Una vez ocurrido esto se da la fosforilación de la (IRS)-1, dando lugar a la activación de la subunidad reguladora p85 de la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI)-3K, la que a su vez, activa la subunidad catalítica p110, incrementando con esto los niveles del fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PI). En consecuencia, se activa la proteína cinasa B (Akt) y la fosforilación del sustrato 160 de AKT (AS160). Así mismo, se da la translocación de GLUT4, concluyendo así en la entrada de glucosa a la célula (Gutiérrez-Rodelo,2017). En la figura 1 se muestra la ruta de señalización de la insulina involucrada en esta vía metabólica.

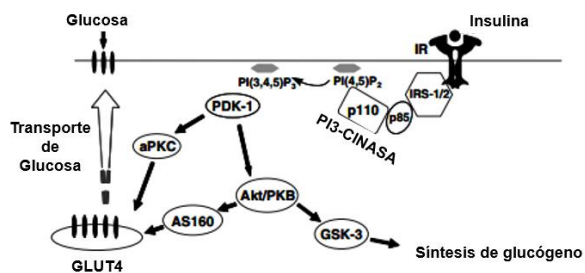


Figura 1. Componentes de la vía de señalización de insulina a través de la activación fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)/Akt (Modificado de Karlsson *et al.*,2007).

Los mecanismos de resistencia a la insulina están relacionados directamente con defectos en su vía de señalización. En la DM2 una disminución en la transducción de la insulina durante la translocación de GLUT4 y defectos en la (PI)-3K, afectan directamente el transporte de glucosa en el músculo, constituyendo el primer factor que origina la resistencia a la insulina en esta enfermedad (Krook *et al.*, 2000). Además, defectos en la señalización de insulina en (IRS)-1, cuando

ocurre una disminución de la fosforilación, conlleva a la resistencia en músculo esquelético (Butler et al., 2003). También existe una relación de mutaciones monogénicas en componentes tales como (IRS)-1, Akt2, PI3K con la resistencia a insulina (Fazakerley et al., 2019). Otra falla en el metabolismo de glucosa mediada por insulina está relacionada con la secreción de esta hormona. La evolución de este proceso en la DM2 está dada por una pérdida en la masa de las células β , o bien una disfunción de éstas. Una disminución en la masa de las células β está involucrada en las primeras etapas del desarrollo de hiperglicemia, donde aún los sujetos presentan un rango normal de tolerancia a la glucosa (Feinglos *et al.*,2008). El mecanismo principal de esta disminución ocurre por alteraciones en la apoptosis celular, que puede ser atribuido asimismo por la hiperglicemia o por depósitos amiloides(Butler et al., 2003). Los depósitos amiloides se caracterizan por la formación de fibrillas producidas por la polimerización de los polipéptidos amiloide de los islotes pancreáticos o Amilina (Figura 2).

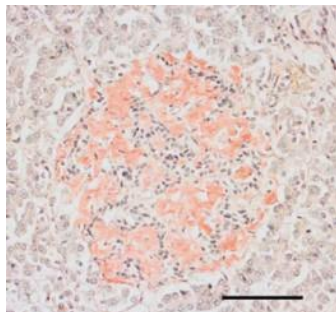


Figura 2. Microfotografía de un corte transversal de un Islote pancreático de un individuo diabético. Se observan células β pancreáticas con depósitos amiloides teñidas con Rojo Congo (corpúsculos marrón intenso) (Westermarck ,2011).

El polipéptido amiloide es secretado junto con la insulina por las células β pancreáticas y comparte la función de inhibir la secreción del glucagón, regulando la hiperglucemia post-prandial. En el proceso de resistencia a insulina se acompaña una hipersecreción de amilina, que induce el aumento de la secreción de fibrillas amiloideas, las cuales son tóxicas para las células β (figura 3) (Butler et al., 2003).

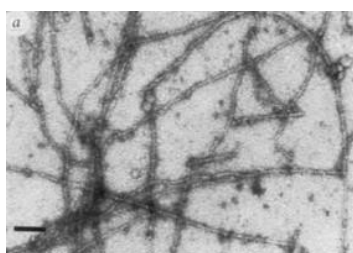


Figura 3. Agregados de amilina en células beta formando fibrillas amiloideas de 6-9 nm de diámetro. Se ha observado que en pacientes con DM2, el área y porcentaje de las células β pancreáticas se encuentra reducida en los islotes que contienen depósitos amiloideos, indicando su relación con la pérdida de masa de las células (Lorenzo *et al.*, 1994).

El mecanismo de la síntesis de glucosa hepática engloba dos aspectos importantes. El primero es la gluconeogénesis, que consiste en la formación de glucosa a partir del piruvato, y el segundo la glucogenólisis, donde se obtiene glucosa a partir de glucógeno. En el desarrollo de DM2, la gluconeogénesis juega un papel importante en el origen de la hiperglicemia mediada por la insulina. El lactato, glicerol, alanina y glutamina comprenden el 90% del total de sustratos necesarios para la gluconeogénesis. A partir del lactato se genera piruvato, el cual se convierte a oxalato en la mitocondria a través de una reacción de carboxilación. En esta reacción es necesaria la acetil-CoA, generada de la β - oxidación de ácidos grasos. Para la salida del oxalacetato de la mitocondria, se requiere

que este sea descarboxilado y fosforilado, obteniendo fosfoenolpiruvato gracias a la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), enzima que regula el grado de gluconeogénesis (figura 4). A partir de esta etapa ocurren varias reacciones de glicolisis reversa, que dan lugar a la síntesis de fructosa-6-fosfato a partir de fructosa 1,6- difosfato. En esta etapa la enzima fosfoglucoisomerasa toma esta última molécula como sustrato para formar Glucosa-6-fosfato (G-6-P). Como producto final se obtiene glucosa a través de una hidrolisis de G-6-P en el lumen del retículo endoplasmático. Para reconocer el nivel de desarrollo de la DM es por lo tanto muy importante saber cómo se regula el mecanismo que modula la gluconeogénesis por insulina (Hatting *et al.*,2018).

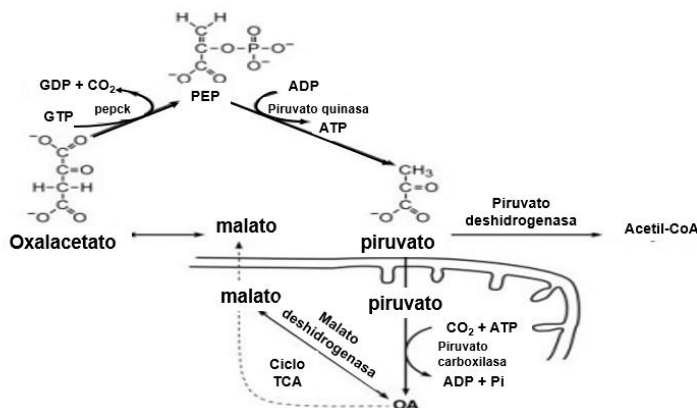


Figura 4. Vista parcial de la ruta de la gluconeogénesis, en donde se muestra que el piruvato es convertido a oxalacetato. El oxalacetato es convertido a fosfoenolpiruvato por la PEPCK (Modificado de Nuttall *et al.*,2008).

El control directo de la gluconeogénesis en el hígado es mediado por insulina, pero el efecto en otros tejidos para la regulación adecuada de la glucosa puede ser indirecto. En la regulación de la

gluconeogénesis participan células α -pancreáticas (productoras de glucagón), tejido adiposo, musculo esquelético y el cerebro. En las células α -pancreáticas, la insulina inhibe la secreción de glucagón, lo que produce una disminución indirecta de la producción de la glucosa hepática. El aumento exacerbado de glucosa hepática y glucagón por disminución de la regulación de la insulina contribuyen al origen fisiopatológico de la DM2 (Nuttall *et al.*,2008).

2.1.5 Diagnóstico

Para suministrar un tratamiento correcto en las etapas iniciales de desarrollo de la DM2 y evitar sus complicaciones, hay que establecer un criterio diagnóstico que permita reconocer los factores de riesgo, causas de la enfermedad, incidencia y prevalencia a las que un sujeto está sometido. A continuación, se adjunta una tabla donde se muestran los criterios de diagnóstico para DM de acuerdo con la American Diabetes Association (American Diabetes Association, ADA , 2022).

Tabla 1. Criterios de diagnóstico de la DM

Criterios de Diagnóstico para DM (ADA)			
Pruebas de laboratorio	de	Valor de referencia	Unidades
Glucosa	en	≥ 126	mg/dL
ayunas			
Prueba de tolerancia a la glucosa (75 gr,2h)	de	≥ 200	mg/dL
HbA1c		≥ 6.5	%
Glucosa al azar		≥ 200	mg/dL

En la toma de decisiones sobre el manejo de los síntomas de la DM2, una herramienta de diagnóstico muy útil es la evaluación de los porcentajes de hemoglobina glicada en sangre. Esta medición es importante en la determinación de la gravedad de la hiperglicemia e indica una relación con enfermedades cardiovasculares. Es primordial que esta medida de HbA1c se utilice junto con otros criterios de diagnóstico para reconocer la evolución de complicaciones, ya que no los niveles de HbA1c no representan un biomarcador suficiente para evaluar la eficacia del tratamiento, principalmente porque esta prueba se realiza generalmente en periodos largos de hasta 6 meses, lo que dificulta la identificación de algunos padecimientos cardiovasculares, los cuales pueden presentarse más asociados a los cambios continuos de los niveles de glucosa en sangre (Ackermann et al., 2011). Dentro de las ventajas diagnósticas de la medición de HbA1c frente a otras pruebas de laboratorio, sin embargo, se incluyen: a) que no requiere ayuno; y b) que la prueba permite evaluar el control glicémico con menor variabilidad (en un periodo de hasta 3 meses), haciendo posible su estandarización por su gran estabilidad analítica. Por otro lado, la interpretación de la HbA1c deberá considerar que exista una correlación bien determinada de glucosa en sangre, y tomando en cuenta las hemoglobinopatías, la accesibilidad económica y la disponibilidad de la prueba (American Diabetes Association, 2022). Esto último porque se recomienda realizar la prueba de la HbA1c por lo menos dos veces al año, lo cual es de mas más difícil acceso en comparación con la glucometría dado su mayor costo (Jiang et al., 2021).

2.2 Parámetros relacionados con el control glicémico

La importancia del control glicémico en el progreso de la DM2 requiere necesariamente conocer los factores involucrados y cuanto aporta cada uno al pobre control glicémico. La evaluación de los niveles de HbA1c es una medida del grado en que la hemoglobina es glicosilada

en los eritrocitos y se expresa como el porcentaje de la concentración total de la hemoglobina, por lo que su medición es un reflejo de concentración de glucosa expuesta a los eritrocitos en un periodo comprendido de 2 a 3 meses. A la fecha, la medición de HbA1c en sangre se ha convertido en uno de los indicadores claves en el monitoreo del progreso o control de la DM2, sobre todo para evaluar el riesgo al desarrollo de complicaciones (American Diabetes Association,2001). Respecto a esto, cuando tenemos niveles de HbA1c mayores a 7%, hay un riesgo de complicaciones microvasculares y macrovasculares. En este punto es necesario el monitoreo de los niveles de HbA1c, puesto que la prevención de estas complicaciones, tales como retinopatía, nefropatía, neuropatía y enfermedades cardiovasculares, ayudaría a evitar el daño a órganos vitales como consecuencia del pobre control glicémico(Haghighatpanah et al., 2018). Por ejemplo, el riesgo de padecer enfermedad de arteria coronaria en adultos diabéticos incrementa a 11% por cada aumento del 1% en HbA1c mayor al 6.5% (Henning *et al.*,2018); además, un valor de HbA1c mayor al 9%, en pacientes con DM que no presentan enfermedad cardiovascular de base, está asociado con riesgo de padecer infarto al miocardio y síndrome coronario agudo (Vazquez-Benitez *et al.*,2015).

Dentro de los factores involucrados en el control glicémico en pacientes que padecen DM2, el desarrollo de complicaciones está muy vinculado con el estilo de vida. De acuerdo con un estudio observacional realizado en pacientes con DM del hospital Metu Karl Referral en Etiopía (Sheleme *et al.*,2020), se observó que la poca adherencia a una dieta controlada y la presencia de sobrepeso u obesidad se relacionan con un consumo excesivo de carbohidratos y grasas, produciendo un aumento de la acumulación de grasa y altos niveles de glucosa en sangre dando como resultado un pobre control glicémico. En pacientes obesos existe una menor tasa de oxidación de ácidos grasos, lo que induce hiperinsulinemia y un incremento en

la acumulación de grasa (Brand-Miller *et al.*,2002).

Además del control de la alimentación, ligado a la actividad física, produce un efecto en la disminución de los niveles de glucosa y mejora la sensibilidad a insulina, contribuyendo a la disminución de porcentaje de grasa y riesgo de complicaciones cardiovasculares, además del aumento de masa muscular, factores importantes en el control glicémico (Boulé *et al.*, 2001).

Por otro lado, un tratamiento farmacológico solo será adecuado cuando actúe sobre factores concomitantes a la hiperglicemia, tales como el exceso de producción de glucosa hepática, secreción y resistencia a la insulina. Queda claro que para llegar a un estado de normoglicemia es necesaria una mejora en el control glicémico acompañado de una dieta controlada y actividad física rutinaria. Esto se observó en un estudio realizado por (Weng *et al.*,2008), donde asignando una terapia aleatoria con insulina o agentes hipoglucemiantes a 382 pacientes de entre 25 y 70 años, se logro un estado normo glicémico después de dos semanas, solo aquellos pacientes tratados con insulina que fueron capaces de aplicar una buena adherencia a la dieta y a la actividad física; estos resultados se mantuvieron desde el inicio de la normoglicemia y posterior a un año de tratamiento.

Además de estos factores asociados al estilo de vida, en el metabolismo de la glucosa se involucran mecanismos de regulación glicémica a través de cambios en la transcripción y modificaciones post-transcripcionales (Ling & Rönn, 2019). En la actualidad sabemos que los procesos transcripcionales son una consecuencia de la desregulación metabólica de la glucosa, que como vimos, se relaciona con la presencia de factores epigenéticos ligados al estilo de vida en el progreso de la DM2 y fallas en el control glicémico (Yoon *et al.*, 2001).

La capacidad del hígado de producir o utilizar glucosa es primordial

para el control glicémico. En un estado de ayuno prolongado, el organismo obtiene glucosa a través de la gluconeogénesis utilizando piruvato, lactato, aminoácidos y glicerol. La compensación de los niveles de glucógeno evita cambios en la concentración de glucosa en plasma. Gran parte de este glucógeno se sintetiza a partir de una actividad en conjunto de la glucólisis y gluconeogénesis. En el glucólisis se sintetizan lípidos a partir de acetil-coA. Estos procesos involucran hormonas, como el glucagón, que activan factores de transcripción y coactivadores que llevan a la expresión de enzimas propias de la gluconeogénesis mientras que la insulina actúa en contra de este efecto y genera un aumento en la utilización de glucosa. Esta etapa temprana de la regulación génica y que genes están involucrados en el control glicémico es poco conocida, por lo que su análisis en la actualidad es causa de interés científico y médico.

2.3 Análisis transcriptómico

2.3.1 Definición

Durante la transcripción se los ácidos ribonucleicos (ARN) se copian a partir del genoma, resultando en secuencias codificantes y no codificantes de proteínas. Después de la transcripción, los precursores de ARN son procesados y empalmados para obtener transcritos de ARN mensajero (ARNm) maduros. Estos transcritos están compuestos de regiones 5' no traducidas (5'-UTR por sus siglas en inglés), regiones 3' no traducidas (3'-UTR por sus siglas en inglés), y regiones codificantes (marco de lectura abierto u ORF, por sus siglas en inglés) que dan origen a las proteínas. En el estudio de los mecanismos moleculares que determinan la fisiopatología de una enfermedad, el análisis de la expresión génica es una herramienta muy útil para identificar los mecanismos y procesos biológicos de la enfermedad (Terabayashi et al., 2020). La transcriptómica engloba el análisis de la expresión diferencial de estos ARNm para analizar si su

expresión corresponde a una huella transcripcional distintiva asociada a algún padecimiento o enfermedad, o con alguna otra condición que pudiera diferenciar molecularmente a un sujeto enfermo respecto de uno sano. Estos perfiles transcripcionales diferenciales identifican genes candidatos a biomarcadores de enfermedad (Liang et al., 2013). La transcriptómica incluye además del análisis de la transcripción diferencial, la evaluación de los niveles de expresión, función, localización, nivel de degradación y tráfico de los transcritos de ARN, ya sea de microARNs (miARNs), diferentes tipos de ARN largo no codificante (ARNln), y ARNm (Milward et al., 2016). Además, la transcriptómica brinda información sobre la regulación génica del RNAm ligada a la respuesta a un estímulo determinado, es decir, identifica los cambios que ocurren en la transcripción por dicho estímulo (Wu et al., 2017). Una herramienta en el análisis transcriptómico comúnmente utilizada es la técnica de análisis de microarreglos de expresión. Los ensayos de hibridación a microarreglos de expresión son utilizados para identificar transcriptomas diferenciales en una muestra de RNA a través de la hibridación de las sondas ligadas covalentemente a una fase sólida. En los microarreglos, estas sondas son diseñadas específicamente para el fragmento de ADN complementario (cDNA), generado del ARN y su hibridación, lo cual se cuantifica a través de la intensidad que refleja la incorporación de un marcador fluorescente a la cadena nascente de cDNA amplificado. La señal es capturada y procesada en un software específico que determina la abundancia relativa de los amplificados de cDNA (Liang et al., 2013). La técnica de microarreglos brinda un conocimiento amplio de los cambios globales de expresión del genoma humano usando un pequeño número de muestras (*“training set”*). Por su parte, la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), permite validar los resultados del análisis transcriptómico de microarreglos aplicado a un mayor número de muestras (*“test set”*), por lo que representa la técnica complementaria

y de elección para la validación y cuantificación de la expresión relativa (o absoluta) de los transcritos identificados en los ensayos de microarreglos, brindando información sobre la abundancia de mRNA en las muestras analizadas (Cocolin & Rantsiou, 2014).

2.3.2 Aplicaciones del análisis transcriptómico en diagnóstico clínico

En el campo de investigación de biomarcadores candidatos para el pronóstico y diagnóstico clínico en diversas enfermedades, los avances en las tecnologías de análisis de expresión génica son de suma relevancia. La selección de los biomarcadores capaces de discriminar entre los estados de salud y enfermedad, así como entre los distintos estadios de una enfermedad, permiten la detección temprana de los eventos moleculares involucrados con el desarrollo de los padecimientos (Wu *et al.*, 2017). Más aún, la expresión génica también puede ser utilizada en el pronóstico de la enfermedad o el efecto de un tratamiento; por ejemplo, el grado de agresividad de las células tumorales puede ser inferida de acuerdo con la actividad y grado de expresión génica. Así también el análisis transcriptómico por microarreglos y su validación por qPCR pueden ser enfocados a la identificación y validación de genes candidatos a biomarcadores. En la figura 5 se muestra el desarrollo del perfil de expresión génica a gran escala.

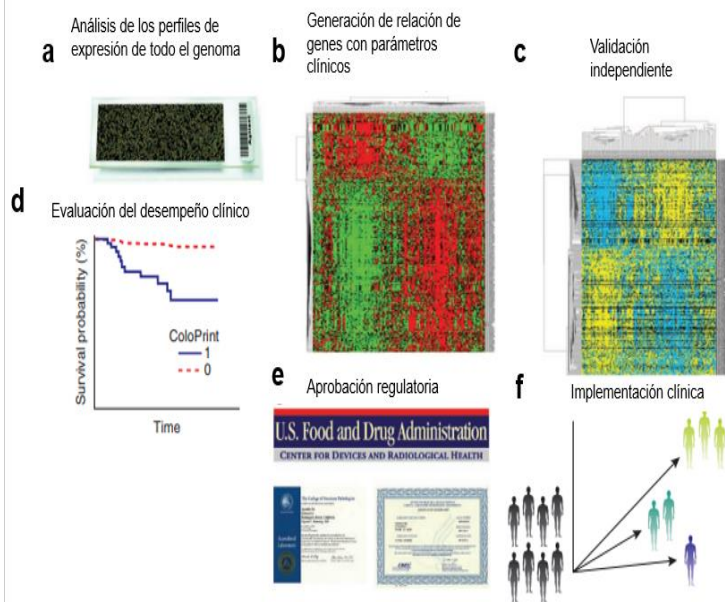


Figura 5. Proceso para la obtención de un perfil expresión génica. a) Análisis de la expresión génica del genoma completo de la muestra. b). Con la utilización de bioinformática se hace un análisis de los cambios de expresión de los genes identificados con parámetros clínicos. C). Posteriormente se hace la evaluación independiente de cada gen identificado con un resultado clínico conocido d). Evaluación del desempeño en comparación con los parámetros clínicos aceptados e). Aprobación regulatoria por institución responsable de regulación f). Implementación clínica de las pruebas aprobadas. (Modificado de Majewski & Bernards, 2011).

La estrategia de hibridación a microarreglos y qPCR están siendo aplicadas a un gran número de estudios sobre biomarcadores útiles en clínica, particularmente analizando el desarrollo de oncogénesis y aplicado a identificar los mecanismos de vías de activación tumoral. Así también la cuantificación de la expresión génica a través de la secuenciación de transcriptomas completos ha permitido observar patrones alterados en el RNAm asociados al desarrollo de otras

enfermedades (Shah et al., 2009). Un ejemplo de la asociación de cambios en la expresión y el desarrollo de cáncer se ha visto con los oncogenes KRAS, BRAF y PIK3CA, cuya sobreexpresión en cáncer de colon se relaciona con la resistencia al receptor del factor de crecimiento epidérmico, lo que lleva a modificaciones epigenéticas en esta vía de señalización (Sartore-Bianchi et al., 2009).

Otro ejemplo claro de la utilización de la transcriptómica en el estudio de vías de señalización comprende el descubrimiento de la inactivación del gen Pkd1 en la enfermedad poliquística renal, lo cual lleva a la progresión rápida de la enfermedad. En este caso se identificaron genes diferencialmente expresados en el estado previo al desarrollo de quistes, observando además que la alteración transcriptómica conlleva a la pérdida de Pkd1. Además, se identificaron genes con mutaciones que fueron diferencialmente expresados antes de la formación de los quistes, lo que sugiere una regulación negativa de las vías metabólicas (Terabayashi et al., 2020)

El progreso de enfermedades que llevan asociadas alteraciones en el metabolismo ha sido ampliamente estudiado con transcriptómica. Por ejemplo, en un estudio realizado por Skol y colaboradores (Skol et al., 2020) se identificaron genes expresados diferencialmente en individuos con DM1, con y sin retinopatía, por medio del análisis de la respuesta transcripcional, identificando además que la actividad del gen de la foliculina tiene una mayor expresión cuando ocurre un aumento de los niveles de glucosa en sangre. En enfermedades metabólicas complejas, tales como DM2 y la obesidad, existe un espectro amplio de variantes genéticas, cada una con una posible función biológica particular. La conjunción de tecnologías de transcriptómica y de genotipificación han permitido la integración del estudio molecular de la DM2 y analizar sus mecanismos fisiopatológicos, así como entender las modificaciones influenciadas por factores ambientales y variables epigenéticas. Con este tipo de análisis se han identificado genes que influyen en el riesgo de padecer

DM2 e implicados en el ~~desarrollo~~ desarrollo de complicaciones. Varios estudios han demostrado que la transcriptómica es una herramienta útil en la identificación de factores genéticos y ambientales involucrados en la fisiopatología de la DM2. La información obtenida indica que para identificar el riesgo genético hay que conocer las vías biológicas implicadas en DM2 y obesidad, las cuales pueden tener mecanismos diferentes dentro de la misma enfermedad. Así, algunas causas asociadas con los estadios de desarrollo de DM2, como pudieran ser la pérdida de la masa de células beta pancreáticas, el metabolismo de carbohidratos, la apoptosis o la respuesta autoinmune han sido estudiadas con esta estrategia. Por ejemplo, la identificación de biomarcadores de expresión que pudieran estar asociados con el progreso de la DM2 pueden permitir en un futuro cercano su utilización en el diagnóstico temprano de la enfermedad (Diabetes Mellitus Interagency Coordinating Committee,2011).

Varios estudios han demostrado que existe una conexión sustancial entre la predisposición genética y el desarrollo de DM2. Algunos de los genes estudiados en esta asociación incluyen a TCF7L2, PPARG, FTO, KCNJ11, NOTCH2, WFS1, CDKAL1, IGF2BP2, SLC30A8, JAZF1, HHEX y KCNJ11, por mencionar algunos, los cuales están estrechamente relacionados con los mecanismos que determinan la enfermedad, pero también con algunas condiciones como la obesidad, hipertensión, niveles altos de colesterol, dietas altas en carbohidratos y un estilo de vida sedentario (Olokoba *et al.*,2012).

Como se mencionó anteriormente, estos factores influyen estrechamente en el control glicémico, por lo que hay que tener cuidado con el fondo genético en distintas poblaciones estudiadas, ya que, por ejemplo, existen diferencias claras de expresión génica entre poblaciones sajonas, afroamericanas y mestizas latinoamericanas, lo que explicaría las diferencias encontradas en varios estudios con diferentes poblaciones. En resumen, se puede

monitorear la expresión de ciertos genes con el control glicémico relacionada a procesos inmunológicos, regulación metabólica y lipídica, replicación y daño del DNA.

Como lo ha demostrado el grupo de Tfaile Corbi y colaboradores (Corbi *et al.*, 2017), la metodología de microarreglos ha permitido saber que los genes HLA-DQA1 y HLA-DQB1 ~~estane~~están sobreexpresados en pacientes sudamericanos con buen control glicémico. Resulta relevante saber que estos genes de respuesta inmune ~~estene~~estén involucrados en el metabolismo de carbohidratos, considerando que están relacionados con quimiotaxis leucocitaria, señalización de proteínas G y expresión de IL-17. Particularmente, esto sugiere que la sobreexpresión de HLA-DQA1 y HLA-DQB1 en pacientes con buen control glicémico es necesaria para que ocurra un mejor control de la inflamación de bajo grado observada en pacientes con DM2. En contraparte, en nuestro grupo hemos identificado con análisis de expresión de microarreglos, algunos genes ~~sobreexpresados~~sobre expresados en población mexicana con DM2 con pobre control glicémico, los cuales parecen ser específicos y capaces de identificar cambios transcripcionales asociados con la evolución temprana de esta enfermedad en sujetos mexicanos. De acuerdo con este mismo autor, (Corbi et al.,2017) algunos de estos genes como SOCS1, son considerados parte del inmunometabolismo ya que están relacionados con la respuesta inflamatoria de bajo grado en DM2, al estar relacionados con la señalización de IL-7 en linfocitos B, con el metabolismo de lípidos y con las vías de señalización de la insulina. Otra compilación de genes candidatos identificados asociados con el buen control glicémico incluyen: CCDN3, CEBPD y MAP2K5. En donde el gen CCDN3 está asociado con la expresión de IL-5 y de IGF-1, así como de CEBPD que está asociado con IL-6 y IL-7, y de MAP2K5 que ligado con linfocitos T. Estos datos concuerdan con la característica inflamatoria alterada de bajo grado que se observa en la DM2.

De estos datos se puede concluir que el conocimiento de las alteraciones en las vías biológicas funcionales por análisis génico de muestras de sangre de pacientes con DM2, es esencial para el descubrimiento de biomarcadores candidatos (Keating & El-Osta, 2013). Estudios de transcriptómica en DM2 que han sido desarrollados previamente por nuestro grupo en población mexicana han arrojado una lista de 71 genes candidatos que están sobre-expresados en pacientes con DM2 de pobre control glicémico, por lo cual es importante corroborar por qPCR en un grupo mayor de sujetos (*test set*), su relación con la evolución temprana de DM2 y el desarrollo de sus complicaciones (considerando el aumento en los niveles de HbAc1), en pacientes con DM2 de pobre control glicémico (Oropeza et al., 2023). Este proyecto pretendió corroborar la sobreexpresión de algunos de estos 71 genes mediante qPCR, considerando para ello varios grupos de sujetos con y sin DM2. ~~Los genes a analizar~~Los genes para analizar son ~~distintos-diferentes~~ a los observados en otras poblaciones de fondo genético distinto al nuestro. Se buscó además saber ~~cómo~~cómo la expresión de estos genes correlaciona con los niveles de HbAc1, considerando que el aumento en los niveles de hemoglobina glicada correlacionan con la evolución de DM2.

2.3.3 Transcriptoma asociado a Diabetes Mellitus tipo 2 de pobre control glicémico

Nuestro grupo identificó previamente un perfil transcripcional en sangre de pacientes adultos ,hombres y mujeres entre 30 y 60 años, con pobre control glicémico (PDM2), cuando se compararon sus transcriptomas contra los de pacientes con DM2 de adecuado control glicémico (DM2), previamente substrayendo la expresión basal en un grupo de sujetos aparentemente sanos sin DM2 (Ctrl); esos estudios utilizaron análisis de hibridación a microarreglos de expresión que contenían 44 mil sondas con secuencias del genoma humano (Whole Human Genome Oligo Microarray Kit, 4 x 44K, Agilent

Technologies, USA). En la figura 6 se muestra el mapa de calor generado de este análisis considerando la expresión diferencial entre los grupos de estudio antes mencionados.



Figura 6. Mapa de calor mostrando un arreglo jerárquico de grupos de genes diferencialmente expresados analizados por microarreglos de expresión en grupos de sujetos con DM2, PDM2 y Ctrl. Se muestra un diagrama comparativo de genes inducidos (rojo) y genes reprimidos (verde) respecto a controles sanos. Los genes sin cambio en expresión se muestran en negro (Oropeza *et al.*,2024).

Posteriormente, se realizó la identificación de los genes diferencialmente expresados con diferencias significativas entre esos grupos de sujetos. En la figura 7 se muestra un Diagrama de Venn agrupando a los genes inducidos de acuerdo con los cambios en expresión relativa (o *fold change* mayor a 2) respecto a un grupo control, utilizando una $p < 0.05$ de significancia en la comparación entre los diferentes grupos de pacientes con DM2 con respecto a un

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial, 12 pto, Color de fuente: Automático, Sin Resaltar

grupo de sujetos con DM2 de pobre control glicémico, restando la expresión basal del grupo control. (con pobre control glicémico (Oropeza-Valdez et al., 2024; Oropeza-Valdez JJ, et al., Arch Med Res., 2023)

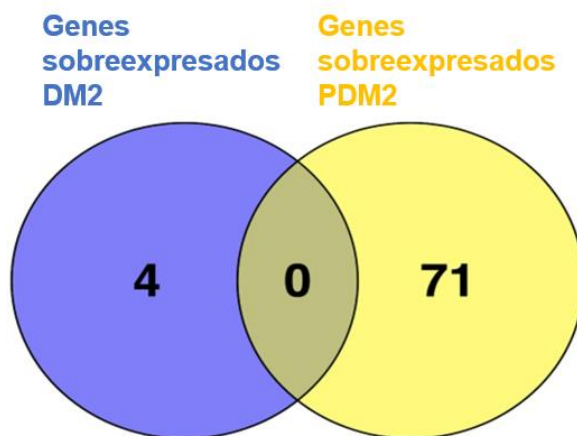


Figura 7. Diagrama de Venn mostrando genes expresados diferencialmente en los grupos DM2 y PDM2. Se muestra un diagrama comparativo de genes inducidos en cada grupo (Fold Change>2 y $p<0.05$) restando la expresión basal del grupo de controles sanos. (Modificado de Oropeza et al., 2023)

Con este procedimiento y la validación estadística de las diferencias, se identificó un perfil transcripcional diferencial compuesto de 71 genes inducidos en el grupo de DM2 con pobre control glicémico (PDM2). Estos genes diferencialmente expresados se muestran en la tabla 2, indicando el nombre, la descripción, el valor de la p a un intervalo de confianza del 95% y las diferencias de expresión (*fold change*) (Oropeza et al., 2023).

Tabla 2. Lista de los genes sobre-expresados en PDM2, con respecto

a pacientes DM2 y sujetos sin DM2 (Controles). Se enlista la abreviatura de cada gen, su función biológica, *Fold Change* > 2 y el valor de $p < 0.05$ (Oropeza et al., 2023).

Gen	Descripción	P	FC
C16orf35	UPF0171 proteína C16orf35 (alfa-globina proteína génica que contiene un elemento regulador)	0.00018	4.53
NPRL3	Subunidad compleja GATOR1	0.0002	4.5
ECSIT	ECSIT homologa (Drosophila)	0.00029	2.77
RILP	Proteína lisosomal de interacción con RAB	0.00055	3.05
KIAA0040	Homo sapiens KIAA0040 (KIAA0040)	0.00072	3.59
MRGPRG	Miembro G del receptor acoplado a proteína G relacionado con MAS	0.00157	2.86
FAM100A	Familia con similitud de secuencia 100, miembro A	0.00175	3.02
C1orf229	Proteína no caracterizada C1orf229	0.00212	3.12
DPM2	dolicil-fosfato manosiltransferasa polipéptido 2, subunidad regulatoria	0.00243	3.15
UBXN6	Proteína 6 del dominio UBX	0.00254	3.19
GATA1	Proteína de unión a GATA 1 (factor de transcripción de globina 1)	0.00275	2.77
GP9	Glicoproteína IX (plaqueta)	0.00304	3.55
KIAA0427	Factor de iniciación de la traducción dependiente del complejo de unión CAP;CTIF.	0.00313	2.82
RBM38	Proteína 38 con motivo de unión a RNA	0.00336	3.42
NFE2	Factor Nuclear (derivado de eritroide 2)	0.00384	2.83
UNCX	UNC caja de inicio	0.00386	5.44
ELOF1	Factor de elongación 1	0.00496	3.13

SLC25A37	Familia de acarreadoras 25, miembro 37	0.00564	3.18
STK11	Serina/treonina cinasa 11	0.00609	2.91
NDUFAF3	NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 subcomplejo alfa, factor de montaje 3	0.00632	2.74
TREML1	Receptor desencadenante expresado en células mieloides 1	0.00706	2.75
RGS10	Regulador de la señalización de proteína G 10	0.00732	2.96
CMTM5	Dominio de transmembrane MARVEL similar a CKLF	0.00827	3.17
ANKRD9	Dominio de repetición ankyrin 9	0.00834	3.01
PRDX5	Peroxisredoxina 5	0.00946	2.81
CISD3	Dominio hierro azufre 3 CDGSH	0.0104	3.21
FIS1	Homólogo de la fission 1 (membrana externa mitocondrial)	0.01043	3.01
TMEM149	Proteína de transmembrana 149	0.01045	3.25
KIAA1841	BTB Dominio regulador de la RSE	0.01089	3.13
DNAJB2	Homólogo de DnaJ, subfamilia B, miembro 2	0.0112	2.78
KLC3	Cadena ligera de kinesina 3	0.0113	3.1
PLK3	Cinasa tipo polo 3	0.01145	3.27
CDC34	Ciclo de division celular 34 homólogo	0.0136	2.96
SCARF2	Receptor depurador clase F, miembro 2	0.01397	3.13
TGM2	Transglutaminasa 2 (polipéptido C, proteína glutamina-gamma-glutamilttransferasa)	0.01667	3.59
THEM5	Miembro 5 de la superfamilia de las tioesterasas	0.02044	3.58

expresados en el grupo de PDM2, incluyendo a: NPRL3, GP9, DPM2, SLC25A37 y RGS10, los cuales no fueron sobre-expresados en los sujetos con DM2 de buen control ni en los sujetos aparentemente sanos (Ctrl). Estos genes se seleccionaron considerando sus funciones ontológicas en los procesos metabólicos y en respuesta inflamatoria en humanos. Este trabajo evaluó por qPCR los niveles de expresión relativa de los genes y analizó el grado de correlación de la expresión de cada gen con el aumento en los niveles de HbA1c de cada sujeto, que es el parámetro de control glicémico más utilizado hoy en día. La selección de estos genes consideró entonces su categoría funcional y su posible papel en DM2, así como la significancia estadística de las diferencias en expresión entre los diferentes grupos analizado.

2.3.3.1 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. El complejo GATOR está compuesto por Nprl2, Nprl3 y Iml1/DEPDC5, tiene una actividad GAP que libera TORC1 del lisosoma para inhibir su actividad. El complejo GATOR2 interactúa con el complejo GATOR1 y promueve la actividad de TORC1 (Zhou *et al.*,2021). En un estudio realizado por Fang y cols, se encontró que las β -arrestinas ARRB1 y ARRB2 regulan la expresión de NPRL3, y está relacionado con respuestas inflamatorias. Además, la expresión de Nprl3 mejoró la expresión de genes marcadores proinflamatorios (IL6, IL1b, TNF α , y NOS2), así como la activación de p65 y STAT1 (Fang *et al.*,2021).

2.3.3.2 Gen GP9

El gen GP9 (glicoproteína IX) codifica la subunidad de un complejo glicoproteico de la membrana de la superficie de las plaquetas, siendo

un receptor para el factor de Von Willebrand, para regular la hemostasia después de una lesión. Las variantes de GP9 se asocian con el síndrome de Bernard-Soulier, tipo C (Gentilini *et al.*,2019), caracterizado por plaquetas gigantes y deficiencia en coagulación. Un estudio de análisis génico sobre osteoartritis y síndrome metabólico por Xiang J., encontró que el gen GP9 está involucrado en la activación plaquetaria y defectos en su expresión podrían provocar trombocitopenia, además de estar involucrado en vías de señalización GP1b-IX-V y diferenciación celular hematopoyética (Jiang *et al.*,2021). Además, una alteración en la expresión de GP9 se ha asociado con dislipidemia, inflamación obesidad y envejecimiento (Kifer *et al.*, 2021).

2.3.3.3 Gen DPM2

La sintasa de dolicol-fosfato-manosa (DPM) actúa donando cuatro residuos de manosa en los precursores de los N-glicanos dentro del lumen del retículo endoplasmático y de 3 residuos de manosa en el glicosilfosfatidilinositol. DPM se sintetiza de la GDP-Manosa y del dolícilfosfato (Dol-P) en el citosol del retículo endoplasmático, posteriormente es translocado por una flipasa al lumen del retículo endoplasmático (Maeda *et al.*,1998). La DPM consta de tres subunidades, DPM1, DPM2 y DPM3. DPM1 es la unidad catalítica, mientras que DPM2 y DPM3 son subunidades regulatorias y de anclaje respectivamente. Mutaciones en cualquiera de estas subunidades pueden llevar a desordenes congénitos de glicosilación (DCG). Los DCG son desordenes que consisten en defectos en la N-glicosilación de proteínas y lípidos, la mayoría de los síntomas se presentan en la infancia y se presentan como retraso severo, hipotonía, enfermedad multisistémica hasta hipoglicemia y pérdida anormal de proteínas del tubo digestivo (enteropatía). Un tipo de estos desordenes están relacionados con alteraciones en la expresión de la DPM2 (Radenkovic *et al.*,2021). Barone. R y cols. (Barone *et al.*,2012), identificaron un desorden DPM2-CDG en tres pacientes que

presentaban hipotonía severa, debilidad muscular progresiva, niveles de CK elevados, ausencia de desarrollo psicomotor y epilepsia. En este estudio se identificaron deficiencias de esta subunidad en los fibroblastos, lo que se caracteriza por la acumulación de Dol-PP-GlcNAc2Man5 y ocasiona un defecto en la N-glicosilación y O-glicosilación. Actualmente no existen estudios que relacionen alteraciones del gen DPM2 en DM2, sin embargo, una alteración en la N-glicosilación del transportador GLUT2 que se encuentra en las células beta pancreáticas puede llevar a una deficiencia en la secreción de insulina (Ohtsubo *et al.*,2005).

2.3.3.4 Gen SLC25A37

La mitoferria 1 (SLC25A37), es un miembro de proteínas acarreadoras solubles localizadas en la membrana interna de la mitocondria, la cual funciona como un importador de hierro en la síntesis del grupo hemo en los eritroblastos (Chen *et al.*,2009). En un estudio realizado por Yang y cols (2021) , se encontró que el gen SLC25A37 está involucrado en la infiltración de células de la respuesta inmune en la enfermedad de arteria coronaria, el cual tiene sitios de unión a RelB, un efector de la vía de señalización NFκ-β (Yang *et al.*,2021). Además, se ha encontrado que SLC25A37 regula procesos de apoptosis y proliferación en carcinoma a través del canal de hierro en la mitocondria (Ni *et al.*,2020).

2.3.3.5 Gen RGS10

El regulador de señalización de proteína G (RGS) son proteínas activadoras de GTPasa que regulan negativamente la señalización de los receptores acoplados a proteínas G al asociarse con las subunidades Gαi. Alteraciones en los miembros de esta familia de proteínas están asociados con obesidad, inflamación y pérdida de la sensibilidad a insulina (Fang *et al.*,2019). El regulador de señalización de proteína G 10 (RGS10) actúa como un regulador negativo de la respuesta inflamatoria de (NF)-κB, disminuyendo la

producción de citocinas proinflamatorias (Lee *et al.*,2011). En ratones knockout RGS10, se mostró una expresión génica desregulada mostrando una elevación en el factor de necrosis tumoral (TNF) y las interleucinas (IL)-1 β , IL-6,IL-10,IL-12. (Lee *et al.*,2008).

3. Hipótesis

La sobreexpresión relativa de NPLR3, GP9, DPM2, SLC25A37, RGS10 correlaciona con la elevación de hemoglobina glicada en pacientes con DM2 con pobre control glicémico.

4 Objetivos

4.1 General

Evaluar la correlación entre la expresión de los genes NPLR3, GP9, DPM2, SLC25A37, RGS10 con los niveles de hemoglobina glicada en pacientes con y sin diabetes mellitus tipo 2.

4.2 Particulares

4.2.1.- Medir y comparar los niveles de expresión relativa de NPLR3, GP9, DPM2, SLC25A37, RGS10 en sujetos sin diabetes, sujetos prediabéticos, pacientes con DM2 con buen control glicémico y pacientes con DM2 con pobre control glicémico clasificados de acuerdo con la ADA.

4.2.2.- Realizar un análisis de correlación entre la expresión de los biomarcadores con diferencias estadísticamente significativas y los niveles de HbA1c.

4.3 Profesionalizantes

4.3.1.- Adquirir entrenamiento para los procedimientos de toma de muestra, manejo de cadena fría, establecimiento de un biobanco y todo el manejo de muestras biológicas para su conservación y manejo en el área molecular.

4.3.2.- Adquirir entrenamiento práctico sobre técnicas moleculares para realizar el análisis de expresión relativa de genes mediante ensayos de qPCR.

4.3.3.- Aprender el análisis de validación estadística de los resultados de expresión relativa obtenidos por qPCR.

5. Metodología

5.1 Diseño

Estudio prospectivo transversal analítico para evaluar los niveles de expresión relativa de NPLR3, GP9, DPM2, SLC25A37, RGS10 en sangre total de sujetos con DM2 y su correlación con los niveles de HbA1c para definir si la sobreexpresión de estos genes está asociada con el pobre control glicémico.

5.1.1 Definición del Universo.

El estudio consideró individuos que presentan un diagnóstico clínico de DM2 y que podrían o no presentar características de hiperglicemia y porcentajes elevados de HbA1c. Se usaron muestras de sujetos aparentemente sanos como controles y sujetos con diagnóstico de pre-diabetes. Los pacientes fueron reclutados del Hospital Regional 2 del IMSS en Querétaro y del Hospital General no 4 del IMSS de Celaya.

5.1.2 Tamaño de muestra

El tamaño de muestra para este estudio consideró 4 grupos de 20 sujetos cada uno, considerando un total de 80 sujetos seleccionados con acuerdo a criterios robustos de inclusión predeterminados. Al ser un estudio observacional, no experimental y sin intervención, en primera instancia no requiere de un cálculo de tamaño de muestra.

5.1.3 Criterios de inclusión

Se incluyeron muestras de sujetos que firmaron la carta de consentimiento; se incluyeron adultos de cualquier género, de 18 a 65 años, pareados por edad y sexo. Los grupos de estudio a considerar fueron los siguientes:

Tabla 3. Niveles de Glucosa y HbA1c utilizados como criterios de inclusión para los grupos de estudio

Grupo de estudio	Glucosa (mg/dL)	HbA1c (%)
Control (Ctrl)	< 100	< 5.7
Prediabéticos (Pre-DM2)	101 – 125	5.7 – 6.4
DM2 buen control glicémico (BCDM2)	126 – 154	6.5 – 8
DM2 mal control glicémico (PDM2)	> 180	> 8

5.1.4 Criterios de exclusión

Se excluyeron sujetos que presentaban las siguientes características: Mujeres con diagnóstico de ovario poliquístico; Mujeres embarazadas; Pacientes con VIH; Pacientes hospitalizados graves; Pacientes con obesidad severa (IMC > 40); Pacientes con anemia y hemoglobinopatías; Pacientes con padecimientos psiquiátricos.

5.1.5 Criterios de eliminación

Se eliminaron del estudio a sujetos que no quisieron continuar en el estudio. Además, se eliminaron las muestras de sujetos que presentaron hemólisis o que fueron insuficientes para obtener los

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial, Sin Resaltar

resultados mínimos requeridos.

5.1.6 Definición de variables y unidades de medida

A continuación, se muestra una tabla que considera las variables aplicables al estudio considerando las unidades de medida requeridas para su inclusión.

Tabla 4. Variables operacionales del estudio

Variable	Definición	Variables Operacionales	Tipo de variable	Escala de medición
Control glicémico	Pobre control glicémico	Porcentajes	Cuantitativa	Continua
	Buen control glicémico	Porcentajes	Cuantitativa	Continua
Expresión relativa de NPLR3, GP9, DPM2, SLC25A37 y RGS10	Valores de $\Delta\Delta Ct$	Expresión relativa	Cuantitativa	Continua

5.2 Fuentes, métodos, técnicas y procedimientos de recolección de la información

5.2.1 Obtención de muestras sanguíneas

Las muestras de sangre periférica de los grupos sanos, preDM2, DM2

con buen control glicémico (BCDM2) y diabéticos con pobre control glicémico (PDM2), se obtuvieron en el laboratorio Clínico del Hospital Regional de Zona 2 (HGR2, IMSS), bajo la supervisión de la Dra. Carolina Serrano, jefa de laboratorio del HGR2, de pacientes derechohabientes del IMSS previamente evaluados y seleccionados por el médico internista Martín Reyna, considerando los criterios de inclusión establecidos por la ADA. Además, las muestras de sangre periférica de cada uno de los grupos también se obtuvieron del Hospital General 4 de Celaya (HGZ4, IMSS). Se tomaron muestras de sangre venosa periférica de cada sujeto incluido en el estudio, utilizando 3 tubos vacutainer de 4 ml con EDTA (Becton Dickinson Diagnostics, USA), y 3 tubos vacutainer sin anticoagulante. Estas muestras fueron utilizadas para la evaluación de HbA1c (%) y glucosa (mg/dL). Además, se preservó suero que podría ser utilizado en estudios futuros, con el consentimiento de los sujetos de estudio, descrito previamente en el consentimiento informado. Para inhibir la degradación del RNA total, a cada tubo con las muestras de sangre total con EDTA se les agregó inmediatamente a su obtención 1 ml de RNALater (Thermo Fisher Scientific, USA), que es un inhibidor competitivo y estable de la actividad de RNAsas, para proteger la integridad de las muestras durante su obtención, manejo, almacenaje y procesamiento. Las muestras de sangre con EDTA/RNALater fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso.

5.2.2 Aspectos éticos

De acuerdo con el reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación se considera un estudio de categoría B, con riesgo mínimo para el paciente. No incluyó 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 (Ley General de Salud en materia de investigación para la Salud, 2013) y de

la declaración de Helsinki (World Medical Association,2013). Para la toma de muestras de humanos se solicitó el consentimiento informado de los sujetos de estudio (ANEXO 2) 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. Estos estudios futuros podrían ser ensayos de ELISA y de tiras reactivas para evaluar los productos (proteínas) producidas por estos genes en suero de los pacientes reclutados y muestras prospectivas. Eso permitiría verificar los resultados y permitiría tener un banco de muestras para poder estandarizar ensayos diagnósticos/pronósticos. Toda la información generada en reportes de laboratorio, y publicaciones se realizó manteniendo la confidencialidad de los sujetos de estudio.

5.2.3 Purificación, cuantificación y evaluación de la integridad del RNA total a partir de sangre total de humanos

La extracción de RNA se realizó utilizando el kit de extracción "Quick-RNA Miniprep plus kit (Zymo Research, USA). Este contiene un buffer de lisis, que se agregó para obtener un lisado celular. El lisado se precipitó con etanol absoluto y posteriormente se sometió a una columna de sílice Zymo Spin IIICG Column (incluida en el kit). Se hizo un tratamiento con DNasa I (incluida en el kit) y se continuó con los lavados correspondientes, finalmente eluyendo 50 µl de RNA de la columna con agua libre de RNAsas mediante centrifugación en un tubo estéril libre de RNAsas. Este procedimiento se estandarizó para todas las muestras del estudio. Adicionalmente, se realizó un tratamiento con Dnasa I (Thermo Scientific, USA), a partir de 1 µg de RNA. El RNA se almacenó a -70 °C.

Se calculó la concentración de RNA en ug/mL midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 260 nm, utilizando el espectrofotómetro de microplacas Multiskan SkyGO (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.). La integridad del RNA se evaluó en todas las muestras por electroforesis en gel de agarosa, evaluando visualmente las bandas de RNA ribosomal 18S y 28S. Únicamente las muestras con integridad de RNA adecuada (relación 2 a 1 bandas 28S/18S) fueron consideradas para la síntesis del DNA complementario (cDNA), utilizado posteriormente en la amplificación por qPCR.

5.2.4 Síntesis de cDNA.

Una vez asegurada la cantidad, pureza y calidad del RNA extraído, se realizó la síntesis de cDNA. Se utilizaron 0.25 ug de cada muestra para realizar la síntesis del cDNA, usando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Primero, se ajustó el volumen de cada muestra de RNA a 10 µl (0.25 ug/mL). Para la síntesis de cDNA, se utilizó un mastermix que contenía todos los componentes de la reacción de retrotranscripción (enzima, dNTPs, random primers y buffer 10X). Se utilizaron 1 µl de la enzima Multiscribe Reverse Transcriptase (50 U/ µl) (ThermoScientific, USA). Se utilizó bajo las siguientes condiciones de incubación: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos y 85°C por 5 minutos. Finalmente, se cuantificó el cDNA de cada muestra utilizando el Multiskan SkyGO (Thermo Fisher Scientific, USA).

5.2.5 Diseño de Oligonucleótidos

El diseño de los oligonucleótidos utilizados en la reacción de qPCR se hizo a través de la herramienta de diseño de primers "*Primer-Blast*" de NCBI. Las secuencias seleccionadas se mandaron a sintetizar a una escala de 100 nmol y pureza HPLC en T4Oligo ADN Artificial S. DE R.L.

DE C.V. Las especificaciones y secuencias se indican en la tabla 4.

Tabla 5. Características de los oligonucleótidos

Gen	Oligo	Secuencia	Tm Melting	%GC
	F	CCAGACATGGGTTGATCACCTAGA	66.6	50
NPRL3	R	GGGCCTGCCCAGACAAGATTT	68.2	57.1
	F	GCCAACAACAGCCTTCAGTC	64.7	55
GP9	R	CAGGGGTTCTGCGTCACAT	65.3	57.9
	F	TATGTGGCCTTTCTGGTCTGTG	65.4	50
DPM2	R	CTGAGCCTTCTTGGTCACTCT	64.6	52.4
	F	ACATGAGCCCCAAAAAGCC	66.5	55
RGS10	R	ATGATAAACCCGGCACGGTC	65.6	55
	F	TTCCCTGTGCAGTCTAGGG	64.4	55
SLC25A37	R	AGATAGGCCTGGCTCTTGTC	64.3	55
	F	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	65.6	54.5
GADPH	R	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA	69.5	54.5

Se preparó un stock de almacenaje a 200 μM ~~μM~~ en alícuotas de 100 μL , y se prepararon alícuotas de trabajo de 20 μM en alícuotas de 50 μL para utilizarse en la reacción de qPCR.

5.2.6 Ensayos de amplificación por qPCR utilizando la enzima SsoFast-EvaGreen.

Se realizaron ensayos de qPCR para la amplificación de los genes de interés previamente seleccionados en el grupo de pacientes con PDM2. Se usó el gen GADPH como gen constitutivo para normalizar. Los niveles de expresión relativa de los genes seleccionados y del gen constitutivo se determinaron por duplicado. Se utilizó el kit "SsoFast™ EvaGreen®" (BioRad, USA), que emplea una enzima hot-start para la

amplificación y combina el colorante intercalante de DNA EvaGreen como sistema de detección.

La amplificación se realizó utilizando el termociclador LightCycler 96 (Roche Diagnostics, USA). Para cada ensayo, se utilizó una cantidad inicial de 2 μ l de cada una de las muestras problema por separado, así como del control interno de cDNA para cada gen (diluido 1/1000 de un cóctel de 5 muestras del grupo control obtenidos de la amplificación, el cual se almacenó en alícuotas para ensayos posteriores) y 8 μ l de la mezcla de reactivos, en un volumen final de reacción de 10 μ l como se muestra en la tabla 6. Finalmente, el ensayo se llevó a cabo con 45 ciclos de amplificación, bajo las condiciones sugeridas por el fabricante, como se indica en la tabla 7.

Tabla 6. Mezcla de reacción utilizadas para los ensayos de qPCR.

Componente	Volumen por reacción (μ l)	Volumen por n reacciones (μ l)
Agua	2.5	2.5 x n
SsoFast-EvaGreen	5	5 x n
Iniciador Forward (20 μ M)	0.25	0.25 x n
Iniciador Reverse (20 μ M)	0.25	0.25 x n
cDNA	2	No Aplica

Tabla 7. Programa de amplificación utilizado en los ensayos de qPCR.

Nombre del programa	Ciclos	Modo de análisis	Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)
Desnaturalización	1	Ninguno	95	30
			95	5
Alineación y Amplificación	45	Cuantificación	65	10
			60	15
Curva Melting	1	Curva Melting	95	Continuo
Enfriado	1	Ninguno	40	30

5.2.6 Cálculo de la expresión relativa de los genes seleccionados.

Al término de la reacción de qPCR y para cada gen de manera individual, se analizaron los niveles de expresión relativa de los genes usando los valores de Ct (del inglés “*Cross-threshold*”) de cada curva de amplificación y procesados mediante la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, fórmula que no utiliza la eficiencia de cada reacción de la PCR como factor de corrección, sino que supone una eficiencia óptima e idéntica de 1 en la eficiencia de la reacción para las diferentes muestras amplificadas por qPCR, y que considera tanto los valores del gen en estudio como del gen de referencia o *housekeeping* (Livak K.J,2001), siendo aplicable y reproducible para una estimación rápida de la proporción relativa de la expresión génica (Pfaffl, M.W,2001).

Primero se normalizaron los valores de Ct del gen constitutivo (GenConst) de cada individuo, con los valores de Ct de los individuos de cada grupo incluyendo el control, utilizando la siguiente ecuación:

$$ER = 2^{(Ct\ Problema - Ct\ GenConst) / (Ct\ Control - Ct\ GenConstControl)}$$

En donde:

2 = Constante de eficacia de amplificación.

Ct Problema = Ct de amplificación de cada muestra para determinado gen.

CtGenConst = Ct de amplificación de la muestra problema para el Gen Constitutivo.

CtControl = Promedio de Ct's del grupo control para el Gen Problema

CtGenConst Control = Promedio de Ct's del grupo control para Gen Constitutivo.

Se obtuvieron los valores de Ct para el gen problema y el control, normalizados con el GenConst, luego se obtuvo la diferencia de dichos valores. La eficiencia en la amplificación es igual a 1 por lo que el 2 representa el valor al que teóricamente la amplificación se incrementa al doble en forma constante; Por último, se obtuvo la expresión relativa ya normalizada de cada individuo.

5.2.7. Cálculo de la significancia estadística de la diferencia de expresión de cada gen entre los grupos de sujetos.

Se realizó un análisis para identificar los datos atípicos o outliers de los valores de expresión relativa. Posteriormente se realizó una prueba de normalidad de acuerdo con la ecuación de Shapiro-Wilk, considerando el tamaño de muestra, para la evaluación de la distribución de los datos de expresión relativa. Los datos obtenidos se ajustaron a una distribución no normal, por lo que se realizó la prueba de Kruskal Wallis, para determinar las diferencias significativas entre las medianas de todos los grupos de estudio, además de una prueba U Mann Whitney para analizar

diferencias entre los grupos de estudio, a un intervalo de confianza del 95%. Los datos de expresión relativa de los individuos que conformaron cada uno de los grupos de estudio analizados (Ctrl, PREDM2, BCDM2 y PDM2), se ubican dentro del grupo de datos conocidos como de dos clases o datos no pareados, ya que los valores de los grupos de datos a comparar provienen de diferentes individuos; en el análisis de datos no pareados existen dos grupos de datos, y lo que se pretende en este tipo de análisis es determinar las diferencias de expresión de cada gen comparando entre los 4 grupos de estudio. Las pruebas estadísticas se realizaron mediante el programa de IBM SPSS Statistics 26 (Java, USA). Posteriormente se realizó un análisis de correlación con los valores de Hb1Ac con los valores de expresión de cada gen usando el coeficiente correlación de Spearman mediante el programa IBM SPSS Statistics 26 (Java, USA), que proporciona una medida de dependencia lineal entre dos variables aleatorias cuantitativas y que es independiente de la escala de medida de las variables.

6. Resultados y discusión

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial, Negrita

6.1 Datos clínicos y sociodemográficos de los grupos de estudio

~~Se analizaron los datos demográficos de los pacientes reclutados en este estudio. La muestra poblacional en este estudio fue a conveniencia considerando los criterios de inclusión antes descritos.~~ Entre los 4 grupos de estudio se obtuvieron un total de 49 sujetos de los cuales solo el grupo CTRL alcanzó la n de 20 sujetos previamente estipulada para cada grupo.

Tabla 8. Datos clínicos y sociodemográficos de los grupos de estudio

Grupo	n	Sexo		Rango de edad (años)			Glucosa (mg/dL)	Hemoglobina glicada (%)
		F	M	18 - 40	41 - 60	>60	\bar{x} ($\pm S$)	\bar{x} ($\pm S$)
Ctrl	20	11	9	18	2	0	81.85(\pm 9.77)	5.18(\pm 0.28)
PreDM2	15	9	11	8	6	1	95.75(\pm 11.36)	6.02(\pm 0.22)
BCDM2	9	5	4	4	3	2	119.52(\pm 31.15)	6.51(\pm 0.61)
PDM2	5	3	2	0	2	3	167.6 (\pm 62.6)	12.0(\pm 2.43)

\bar{x} = media muestral, S = desviación estándar muestral. F= Femenino; M= Masculino.

En la tabla 8 se muestran los datos clínicos y sociodemográficos de los diferentes grupos de estudio, ~~los cuales fueron~~ clasificados de acuerdo con edad, sexo, y valores promedio de glucosa y hemoglobina glicada. La edad es un factor de riesgo para la DM2. Se ha demostrado que conforme avanza la edad, los humanos presentan un decremento de la secreción de insulina, así como un aumento de la resistencia a insulina (Kyrou et al., 2020). ~~La muestra poblacional en este estudio fue a conveniencia considerando los criterios de inclusión antes descritos.~~ De

acuerdo con los resultados obtenidos, los grupos variaron en número de sujetos. Por ejemplo, la totalidad del grupo PDM2 (5 individuos), presentaron una edad mayor a 41 años y más de la mitad tuvieron más de 60 años. De igual manera, el grupo BCDM2 con 5 individuos, tuvieron un rango de edad entre 41 años y hasta más de 60 años. Nuestra población ~~de estudio~~ de pacientes con DM2 tiene más de 41 años, lo que concuerda en términos de edad con la población que tiene DM2 en otras partes del mundo, en donde la prevalencia de DM2 es mayor entre los adultos de tercera edad (>60 años). Se proyecta que para 2045, existan aproximadamente 253.4 millones de adultos mayores con DM2 a nivel mundial (Cho et al., 2018). Fisiológicamente, se ha reportado que el control glicémico es también afectado con la edad, principalmente por los cambios en el metabolismo asociados ~~a~~ al envejecimiento, provocando fallas en la capacidad de los humanos para mantener un control glicémico adecuado (Anioke et al., 2019). En las muestras de sangre de nuestro grupo con PDM2 es ~~notable~~ notable, además, que la mayoría provienen de sujetos con más de 60 años. Es importante señalar que nuestro estudio ~~previene de una tomase hizo con una de~~ previene de una tomase hizo con una de muestra a conveniencia, sin ningún filtro de selección, más allá de los criterios de inclusión establecidos, y por las dificultades para las tomas de muestras, las con unas n están por debajo de las planteadas originalmente, y además, no fue posible sin tomar muestras pareadas ~~parear~~ por edad y sexo. Definitivamente, no podemos afirmar que nuestra población representa a la población con DM2 en México. Por lo anterior sugerimos que es crucial realizar una toma de muestra con sujetos pareados por edad y sexo, aumentando la n poblacional para balancear todos los grupos de estudio y obtener datos más representativos de la población mexicana. Esto seguramente aportara resultados más confiables.

De acuerdo con la clasificación por sexo, en los diferentes grupos,

notamos ~~que todos los grupos~~ presentan un mayor porcentaje de sujetos del sexo femenino, a excepción del grupo PREDM2. Si bien existen datos epidemiológicos que ~~demuestran~~ que las mujeres tienen una mayor dificultad para mantener un control glicémico adecuado medido por los niveles de HbA1c en comparación a los hombres, (Duarte et al., 2019), no podemos asegurar que este ocurra, dadas las limitaciones ~~con~~ de los datos en nuestro estudio, ~~principalmente por las mismas limitaciones planteadas para la edad~~

De acuerdo con este mismo autor, se ha sugerido que las mujeres tienen diferencias respecto a la homeostasis de la glucosa, respuestas deficientes al tratamiento, y por factores psicológicos. En nuestro caso no podemos afirmar que la DM2 tiene una mayor prevalencia en mujeres mexicanas. Definitivamente, en estudios futuros es necesario parear por edad y sexo a los sujetos involucrados en el estudio, ~~este~~ para robustecer ~~el estudio~~ esta hipótesis, eliminar variables confusoras y asegurar que haya una distribución más homogénea en los grupos comparados para evitar obtener conclusiones equivocadas ~~concluyentes~~.

De acuerdo con nuestras variables de glucosa y HbA1c en los diferentes grupos de estudio, observamos que los valores descritos en la tabla 6, corresponden a los rangos esperados para este proyecto, ~~por lo que este~~ demuestra que los criterios de inclusión seleccionados para este estudio fueron correctos y cuidadosamente priorizados al momento de seleccionar los grupos. Como se muestra en la tabla 6, las medias de los valores de glucosa para los grupos de estudio Ctrl, PreDM2, BCDM2 y PDM2 fueron de 83 mg/dL, 102.6 mg/dL, 130.68 mg/dL y 147.01 mg/dL, respectivamente. Asimismo, las medias de los valores de hemoglobina glicada para los grupos de estudio PreDM2, BCDM2 y PDM2 fueron de 5.18%, 6.0%, 6.51% y 12.0% respectivamente. Se observa en todos los grupos que los valores medios de glucosa presentan una desviación

estándar mayor a lo esperado. Esto pudiera explicarse considerando el criterio arbitrario para ~~la selección el establecimiento de los rangos de HbA1c~~ de los grupos de estudio, el cual consideró rangos arbitrarios preestablecidos para clasificar cada grupo de acuerdo con ~~sus niveles niveles~~ de hemoglobina glicada normal, bajo, medio y altos, asociados a la evolución de riesgos y complicaciones de la DM2. ~~y considerando además que estos valores serán primordiales para la correlación con los valores de expresión relativa de cada gen en cada grupo de estudio.~~

6.2 Pureza e Integridad del ARN

Todas las muestras de ARN extraídas a través del kit de extracción “Quick-RNA Miniprep plus kit” presentaron un índice de pureza A260/280 nm de entre 1.8 – 2.2, como fue establecido para el control de calidad de las muestras. Por otra parte, el índice de pureza A260/230 nm obtenido fue de entre 0.3 – 1.8. Para la estandarización del protocolo de extracción de RNA, se siguieron inicialmente las instrucciones del fabricante. Sin embargo, debido a las dificultades que se presentaron para obtener un índice óptimo de pureza a A260/280 nm y a A260/230 nm, ~~y una para~~ mejorar la integridad adecuada del RNA utilizado para los ensayos de qPCR, se establecieron modificaciones al protocolo. Esto incluyó un aumento (4:1) en el volumen de buffer de (RNA lysis buffer) durante la preparación de la muestra, y durante los lavados (5:1), con lo que se obtuvo un índice de pureza 260/280 cercano a 2 y una integridad de 2:1 en relación a las bandas ribosomales 28S y 18s., para tener en el paso siguiente el DNAc con el mínimo de degradación y adecuado para realizar la reacción de qPCR. ~~Además, se estima~~ Considerando que la causa de una baja relación A260/A230 se debe a contaminación por sales como el tiocionato de guanidina, carbohidratos, péptidos y fenol (o compuestos aromáticos en general) (Luebbehusen,2004), se busco eliminar esos contaminantes con el aumento en lavados. Esto a pesar de

~~Sin embargo,~~ que se ha reportado que ~~también~~ concentraciones de hasta 100 mM de sales, en una muestra de ARN no compromete realmente la ~~fiabilidad de la~~ fidelidad de la reacción de RT-qPCR en tiempo real, incluso cuando se utilizan reactivos de qPCR que son sensibles a los inhibidores (Cicinati et al.,2008). Por lo que en este proyecto, se consideró que cubrimos estos parámetros ~~valores para el~~ ~~establecimiento de un~~ protocolo estandarizado para realizar las reacciones de qPCR.

La integridad de todas las muestras fue aceptable, ya que su valoración a través de electroforesis en gel de agarosa 1.8%, mostró una relación 2 a 1 en las bandas 18s/28s.

6.3 Ensayos de amplificación por qPCR y expresión de los genes en los grupos de estudio

Para los ensayos de amplificación, se obtuvieron valores de Ct de cada una de las muestras de los diferentes grupos de estudio, y se uso así ~~como para~~ un control negativo para evaluar contaminaciones exógenas y un control interno para evaluar variaciones interensayos y calidad de los reactivos de qPCR. El control interno para cada uno de los genes fue reproducible de ensayo a ensayo, con un Ct promedio de 21.87 para GADPH, 23.17 para GP9, 27.15 para DPM2, 24.49 para RGS10, 22.96 para NPRL3 y 23.39 para SLC25A37. El análisis de expresión génica se calculó usando los valores de Ct obtenidos para cada una de las muestras y para todos los ensayos de cada uno de los genes, normalizando los valores considerando el Ct del gen constitutivo, utilizando la fórmula de Livak (Livak,2001). Para la comparación de datos y como medida de ajuste, se identificaron y eliminaron los outliers a través del método de rango intercuartílico (IQR). Es importante señalar que, para realizar el análisis estadístico, se incluyeron datos calculados ~~seleccionados aleatoriamente de probabilísticamente a partir de los~~

valores de expresión relativa obtenidos de los datos de Ct resultantes de los pacientes durante el proyecto, con el fin de completar una n de 20 en cada grupo. Por lo tanto, el análisis realizado en este proyecto considera valores calculados teóricamente de los valores reales obtenidos de las muestras de RNA obtenidas de los pacientes reclutados, esto reales con el objetivo de completar los grupos de estudio. Estamos seguros quede que esto es una ~~una~~ limitación importante de nuestro estudio, pero nos permite modelar ~~con esto~~ los resultados para comprobar que si existen diferencias de expresión entre los grupos de estudio cuando se realizan las comparaciones entre grupos con una n igual en número pero mayor y con una n más representativa. -

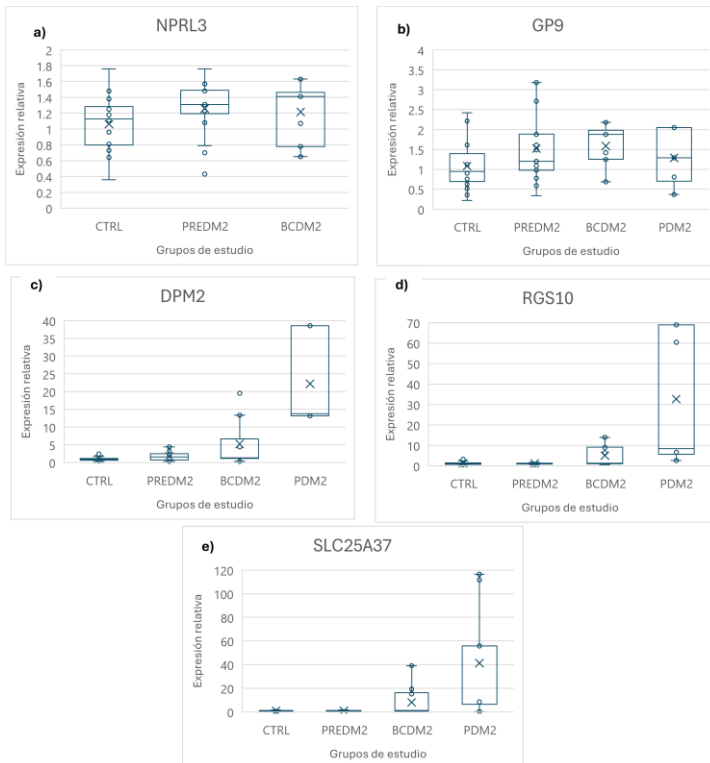


Figura 8. Niveles de expresión relativa de los genes NPRL3 (a) , GP9 (b), RGS10 (c), DPM2 (d) y SLC25A3 (e), en cada grupo de estudio evaluados por qPCR* Los rectángulos representan los valores medios, ~~en donde se encuentra representada~~ las medianas, además de los límites mínimos (25% de los datos) y límites máximos (25% de los datos) representados con una línea sobre el rectángulo. Diagrama de caja y bigotes realizado con el programa estadístico IBM SPSS Statistics 26 . *NOTA: Los valores de expresión relativa para el grupo PDM2 en la figura 8a no fueron ~~calculados~~ considerados, debido a que no fue posible amplificar las muestras para este gen en ~~ninguna muestra durante los 45 ciclos de amplificación establecidos en la programación~~ caso.

Para determinar si existían diferencias significativas de la expresión relativa para cada uno de los genes entre los grupos de estudio, se realizó un test de Kruskal-Wallis. Este análisis ~~es adecuado para~~ permitió comparar las medianas de más de dos grupos independientes cuando no se cumplen los supuestos de normalidad necesarios para un ANOVA. Los resultados del test de Kruskal-Wallis indicaron diferencias significativas en la expresión relativa entre los grupos de estudio para los genes DPM2 ($p= 0.000$), RGS10 ($p= 0.000$) y SLC25A37 ($p= 0.009$). Sin embargo, para los genes NPRL3 ($p= 0.107$) y GP9 ($p= 0.236$), no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de estudio, lo que sugiere que las medianas de expresión relativa entre los grupos no presentan diferencias estadísticas para estos ~~dos últimos genes~~ pero si ~~para DPM2, RGS10 y SLC25A37~~.

Por otro lado y como se observa en la Figura 8c), existe un aumento evidente de la expresión relativa del gen DPM2 en el grupo PDM2 en comparación con el grupo control. Este aumento es estadísticamente significativo como se muestra en la Tabla 9, de acuerdo a la prueba de U. de ~~Mann~~ ~~Whitney~~ ($p=0.000$). Lo mismo se observó para los genes RGS10 ($p=0.000$), y SLC25A37 ($p=0.006$) ~~bajo la misma, prueba de U de Mann-Whitney~~ (figura 8 d y figura 8 e), respectivamente.

En un estudio previo (Oropeza et al., 2023) se identificaron 71 genes sobreexpresados en un grupo de DM2 con pobre control glicémico. Uno de los objetivos de este proyecto consistía en corroborar a través de RT-qPCR, los resultados de la expresión relativa de ~~algunos de~~ ~~estos genes~~ ~~obtenidos~~ ~~identificados~~ por el análisis de microarreglos, partiendo de la hipótesis de que habría una sobreexpresión significativa en el grupo PDM2 con respecto a todos los ~~demás~~ grupos ~~considerados~~ en este estudio.

Se encontró que el gen DPM2, presentó una expresión relativa mayor en el grupo PDM2, con una diferencia significativa respecto al grupo control, PREDM2 y BCDM2 (ver tabla 9). 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.

La proteína codificada por el gen DPM2 forma parte del complejo heterotrimérico dolicol-fosfato-manosa sintasa (DPMS), una enzima clave en la glicosilación N- y O- ligada, así como en la síntesis del ancla glicosilfosfatidilinositol (GPI), que constituye a la subunidad reguladora. Se ha descrito que la mutación en este gen, tiene como consecuencia el desarrollo de desordenes congénitos de la glicosilación, lo que produce defectos en la vía de la N-glicosilación (Radenkovic et al., 2020). Nuestros resultados son relevantes desde el punto de vista funcional, 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 tienen 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. 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. La N-glicosilación es una modificación postraduccional que está involucrada con el enriquecimiento de la estructura y función de las proteínas. Se han descrito cambios en la N-glicosilación en diferentes enfermedades, crónicas, incluyendo la diabetes tipo 2. Se ha descrito que genes que al

alterar su expresión ocasionan defectos en la N-glicosilación pueden ser considerados como biomarcadores de DM2 de evolución temprana (Keser et al., 2018). Por ejemplo (Ohtsubo et al., 2013) describió que una N-glicosilación aberrante del transportador de glucosa-2 (Glut-2) en las células beta pancreáticas en la diabetes tipo 2 lleva a la alteración de la secreción de insulina. Lo que sugiere que el gen DPM2 podría ser un buen candidato para biomarcador de la DM2 en sus etapas tempranas.

Otro hallazgo ~~interesante~~ fue que la sobreexpresión del gen RGS10 en el grupo PDM2 ~~es de en~~ más del 50% ~~en todos de~~ los datos con valores por encima de la mediana (ver figura 8d). Además, como se observa en la tabla 7, ~~este el~~ grupo PDM2 presentó una diferencia significativa en ~~la~~ su expresión relativa en comparación con los grupos CTRL, PREDM2 y BCDM2. RGS10 es una proteína que forma parte de la familia de las proteínas reguladoras de proteínas G (RGS) y de la subfamilia RGS D/R12. Las proteínas RGS controlan las vías de señalización mediadas por proteínas G. También actúan como proteínas activadoras de guanosina trifosfatasa (GTPasa), acelerando la hidrólisis del GTP de la forma activa $G\alpha$ -GTP y, a su vez, lo convierten de nuevo en la forma inactiva $G\alpha$ -GDP. A pesar de que RGS10 carece de varios de los dominios regulatorios definidos encontrados en otras proteínas RGS, ~~esta~~ contiene sitios de modificación postraduccional que regulan su expresión, localización y función. Además, RGS10 es una proteína importante en la regulación de procesos fisiológicos en múltiples células, donde la desregulación de su expresión se ha implicado en diversas enfermedades, incluyendo la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple, la osteopetrosis, el cáncer de ovario quimiorresistente y la hipertrofia cardíaca (Almutairi et al., 2020). Aunque no se ha descrito el papel de RGS10 en DM2, su función RGS10 se ha relacionado con desordenes metabólicos. Así se ha reportado una disminución en la

expresión de RGS10 en ratones alimentados con una dieta alta en grasas, ~~ligado observándose con~~ un incremento en la expresión de este gen en tejido adiposo; ~~los animales~~, además ~~exhiben de exhibir~~ resistencia a insulina, intolerancia a la glucosa y aumento de leptina (Fang et al., 2019). ~~Por lo tanto, los Nuestr~~ resultados de expresión relativa ~~aumentada en PDM2~~ y lo reportado en otros estudios ~~con pacientes diabéticos~~, sugieren ~~que se ajusta a que~~ nuestra hipótesis previamente establecida ~~es correcta~~. De este modo, la sobreexpresión de RGS10 en sangre podría ~~representar ser~~ otro biomarcador indicativo de la aparición ~~y evolución~~ de DM2 ~~asociada al mal control glicémico~~.

~~El SLC25A37 es otro gen en el que se corroboró mostro~~ una sobreexpresión ~~relativa~~ en el grupo PDM2 por qPCR (figura 8e), con una diferencia significativa ~~en la expresión relativa~~ al ser comparado con el grupo CTRL y PREDM2 (ver tabla 9). El producto de expresión de este gen es la mitoferrina 1 ~~o SLC25A37~~, el cual es un transportador localizado en la membrana ~~mitocondrial interna~~ ~~mitocondrial~~. Esta molécula funciona como un importador esencial de hierro para la síntesis del ~~grupo~~ hemo ~~mitocondrial~~ y ~~de~~ grupos hierro-azufre ~~en la mitocondria~~ (Chen et al., 2009). En un estudio ~~, en el que se hicieron con~~ redes de expresión génica mitocondrial en ratones obesos resistentes a insulina, se encontró un incremento en la expresión de este gen. Por lo que una alteración en la expresión de ~~este gen SLC2537~~ podría afectar el transporte de hierro, teniendo como consecuencia una leve deficiencia de hierro ~~pero capaz suficiente para de~~ afectar el metabolismo de lípidos (Milhem et al., 2024). Aunque no se ha descrito la alteración de SLC25A37 en diabetes anteriormente, es importante ~~denotar mencionar~~ ~~que hay una estrecha relación entre que la relación de~~ la resistencia a la insulina y el metabolismo de lípidos, ~~es muy estrecha~~, por lo que se sugiere ~~que en realizar~~ estudios futuros pueda ~~analizar ser analizada~~ esta

interacción.

No obstante las limitaciones de los resultados de nuestro proyecto debido al pequeño número de muestras colectadas, los resultados utilizando valores calculados probabilísticamente, nos permiten vislumbrar que si existe sobreexpresión de algunos de los genes candidatos probados. Es importante mencionar que los resultados de estos proyectos tiene claras limitaciones al haber utilizado para el análisis estadístico valores de expresión teóricos a partir de la selección aleatoria de los datos de expresión relativa obtenidos para cada uno de los grupos. Aunque este análisis demuestra el probable comportamiento de los datos reales, por lo que es un buen aliciente para probar en estudios futuros nuestra hipótesis. Para ello se deberá aumentar la n de cada uno de los grupos, obtener la validación con datos reales, siempre equilibrados y emparejar por edad y sexo; esto robustecería indudablemente a los grupos de estudio para robustecer el análisis planteado.

En segundo lugar, como se puede observar en la figura 8a y en la tabla 9, el grupo PDM2 no pudo ser analizado estadísticamente en para el gen NPRL3. En este caso debido a que no se pudieron amplificar las muestras de los pacientes. Esto pudo deberse posiblemente a que la expresión de este gen es muy baja en sangre, y se necesitaría aumentar la cantidad inicial de RNA para los ensayos de qPCR; Otra posibilidad podría ser por defecto en la secuencia y pureza de los primers. Así sugerimos, o en su defecto, modificar los juegos de primers usados en la amplificación de este gen. Como ~~resultad~~ se observa en la figura 8a, no hubo amplificación en ninguno de los grupos ~~y por lo tanto las medianas resultaron iguales.~~

Definitivamente, para verificar que los genes que presentaron diferencias significativas puedan ser llamados biomarcadores asociados al desarrollo de DM2, tenemos que sugerir algunas cosas importantes.

~~Aunque los datos teóricos calculados permitieron é aumentar la n en

todos de los grupos para validar el ensayo y y con este corroborar los

 resultados obtenidos previamente en los análisis por microarreglos para

 algunos genes estudiados aquí, es necesario realizar los ensayos de

qPCR con un mayor número de muestras de pacientes apareados por

edad y sexo para comprobar las diferencias de expresión encontradas y

fundamentar la utilidad de la sobreexpresión de estos genes como

biomarcadores asociados al desarrollo de DM2.~~

Tabla 9. Evaluación de las diferencias de expresión en los diferentes

 genes comparando los grupos de estudio y calculando los valores de p

 por la prueba U de Mann Whitney

Gen	Valor de p* comparando entre los grupos de sujetos de estudio					
	CTRL- PREDM2	CTRL- BCDM2	CTRL- PDM2	PREDM2- BCDM2	PREDM2- PDM2	PDM2- BCDM2
NPRL3	0.033	0.149	NA**	0.799	NA**	NA**
GP9	0.142	0.03	0.602	0.277	0.779	0.529
DPM2	0.192	0.012	0.000	0.221	0.000	0.000
RGS10	0.678	0.007	0.000	0.012	0.000	0.001
SLC25A37	0.478	0.925	0.006	0.547	0.004	0.009

* Valores de p para las diferencias de expresión entre grupos, de cada

 uno de los genes. Calculado con IBM SPSS Statistics 26.

** Los valores de p no fueron calculados para PDM2 por incapacidad de

amplificación de las muestras

6.4 Análisis de correlación de expresión relativa y porcentajes de hemoglobina glicada

Un pobre control glicémico en individuos con DM2 está estrechamente asociado con un mayor riesgo a padecer complicaciones microvasculares, por lo que la búsqueda de biomarcadores que estén relacionados con el control glicémico esta justificado, ya que esto puede ser útil en sobre todo en etapas tempranas de la DM2, pero también en el agravamiento de la enfermedad.

Por eso, o Otro objetivo de este proyecto fue analizar la correlación entre la sobreexpresión de los genes seleccionados relacionados y la elevación de los niveles de hemoglobina glicada en un que llevan a un pobre control glicémico y los niveles de hemoglobina glicada. De acuerdo con ello, realizamos un análisis de correlación entre los porcentajes de HbA1c y los niveles de expresión relativa calculados para cada uno de los genes. En la figura 9 se muestra la correlación entre estas dos variables. Se obtuvieron diferencias significativas para los genes DPM2, RGS10 y SLC25A37 ($p=0.000$, $p=0.000$ y $p=0.000$ respectivamente), con valores significativos de correlación entre las en los niveles de HbA1c, variables evaluadas. Nuestros resultados mostraron que e Esta diferencia no fue significativa para el gen GP9 ($p=0.059$), siendo el único que no mostró correlación con los valores de HbA1c. Para el gen NPRL3, aunque se obtuvo un valor de correlación significativo ($p=0.001$) en el respecto al grupo control, no fue posible incluir en este el análisis con el al grupo PDM2 no fue posible, esencialmente por la falta de datos de amplificación para el análisis, como se mencionó anteriormente, quedando pendiente evaluar la correlación para el grupo DM2 con pobre control glicémico.

Como puede observarse en la figura 9c), el gen DPM2, tuvo una correlación significativa entre los valores de hemoglobina glicada y la expresión relativa de este gen, con valores de expresión relativa (*fold change*) mayores de entre 10 y 40, con valores de hemoglobina glicada de hasta 15.5%. Además de acuerdo con el coeficiente de correlación de Spearman obtenido, que es una medida que indica la fuerza de asociación entre variables, se obtuvo un valor de 0.735, lo que *indica denota* que esta correlación es moderada. Si bien no se ha descrito una correlación de este gen con los valores aumentados de hemoglobina glicada en DM2, si se sabe que su alteración ocasiona defectos en la N-glicosilación. De acuerdo con (Ohtusbo et al., 2011) las células beta detectan elevaciones de glucosa en la sangre mediante la expresión de transportadores de glucosa en la superficie celular que permiten el transporte de glucosa a través de la membrana plasmática en función de la concentración. Esto es seguido por la acción de la glucocinasa y, en última instancia, la secreción de insulina dependiente de calcio. La pérdida de secreción de insulina estimulada por glucosa debido a defectos en la glicosilación se ha relacionado con la expresión deteriorada de transportadores de glucosa (Glut) en las células beta en modelos animales, y se ha propuesto que esta falla puede promover el desarrollo temprano de DM2 (Guillam et al.,2000). Una hemoglobina glicada elevada, se presenta en individuos DM2 con pobre control glicémico que presentan elevaciones de glucosa *yy*, por lo tanto, este gen podría estar relacionado con una disminución de la glicosilación en el metabolismo de la glucosa. Tomando en cuenta la hipótesis de este proyecto, DPM2 podría ser un buen candidato a biomarcador para DM2 en pacientes con pobre control glicémico.

En la figura 9d) se observa la correlación entre los valores de hemoglobina glicada y la expresión relativa aumentada del gen RGS10.

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial, Cursiva

De acuerdo con el análisis estadístico, esta correlación es significativa. Sin embargo, en comparación con el gen DPM2, el coeficiente de correlación ($p=0.695$) no es tan fuerte como con el primero. En la figura 9d) pueden observarse, valores de expresión relativa (*fold change*) de hasta 60 relacionados con una hemoglobina glicada de hasta 15.5, que corresponde a un pobre control glicémico, lo que se ha asociado a un riesgo muy elevado de desarrollarse las complicaciones de la enfermedad. Estos hallazgos, concuerdan con lo mencionado anteriormente en el punto 6.3 sobre el gen RGS10. RGS10 es una proteína que pertenece a la familia de proteínas RGS. Específicamente RGS10 tiene un papel importante en la producción de citocinas proinflamatorias en la microglía regulando negativamente la vía del factor nuclear (NF)- κ B (Lee et al., 2013). En este sentido RGS10 actúa como un mediador inflamatorio negativo, que podría sugerir que RGS10 pudiera participar en la inflamación crónica de bajo grado observada en la DM2, y que además pudiera su elevación estar asociada ~~tambien~~ también a la resistencia a insulina y al síndrome metabólico, como ha sido indicado por otros investigadores (Lee et al., 2014). Además, los procesos de inflamación, alteraciones del metabolismo de glucosa, y complicaciones están estrechamente relacionados con niveles altos de hemoglobina glicada, presentes en pacientes PDM2. Lo que, propone que este gen también podría fungir como un candidato a biomarcador de mala evolución de DM2.

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial, Cursiva

SLC25A37 tuvo altos niveles de correlación en sus valores de expresión relativa (*fold change*), incluso mayores a 100, con valores de HbA1c tan altos como 15.5 %. ~~Además~~ Además, esta correlación fue estadísticamente significativa. Sin embargo, el coeficiente de correlación fue bajo (0.453), El gen SLC25A37, codifica para una proteína transportadora de hierro, si bien se ha estudiado la expresión de este

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial, Cursiva

gene y su relación con la resistencia a la insulina en modelos murinos, ~~su relación con la resistencia a la insulina~~, nuestros hallazgos indican que el grado de correlación con los niveles de hemoglobina glicada no son significativos, por lo que en este caso no se puede sugerir como un gen candidato para el pobre control glicémico en DM2.

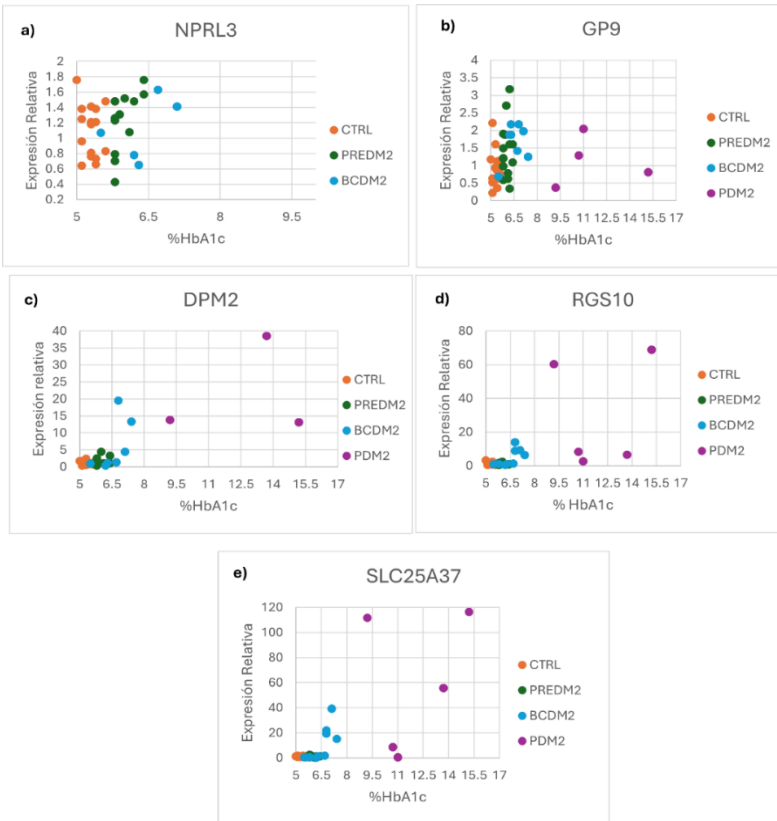


Figura 9. Niveles de expresión relativa de los genes estudiados y su asociación a porcentajes de HbA1c. 9a) NPRL3* 9b) GP9 9c) DPM2 9d) RGS10 y 9e) SLC25A37

*NOTA: Los valores expresión relativa no fueron calculados para PDM2 en el gen NPRL3 debido a que no se obtuvieron valores de Ct durante los 45 ciclos de amplificación establecidos para el programa de amplificación

7. Conclusiones

Se realizó el análisis de expresión relativa de los genes NPRL3, GP9, DPM2, RGS10 y SLC25A37 en individuos DM2 con pobre control glicémico (PDM2), respecto a los grupos Ctrl, PREDM2 y BCDM2. De acuerdo con los valores obtenidos teóricamente, se propone que DPM2 y RGS10 podrían ser ~~un buen~~buenos candidatos para biomarcadores de ~~para DM2 individuos DM2~~ en etapas tempranas en humanos.

El análisis de correlación de estos genes con la hemoglobina glicada, permitió identificar a DPM2, como un buen candidato ~~a biomarcador para biomarcador~~ e indicativo de complicaciones microvasculares en individuos DM2 con pobre control glicémico, por su alta correlación con la elevación en los niveles de Hba1A ~~esto debido al comportamiento en individuos PDM2 que se presentó en este proyecto~~, además de que tiene la una clara función ontológica ~~que podría fungir en~~ asociada a DM2.

Sería ~~interesante~~ pertinente para validar nuestros resultados de qPCR, realizar un análisis de correlación de la expresión relativa de estos genes, con HbA1c considerando un tamaño más amplio de ~~ampliando el tamaño de muestras~~, y pareando por edad y sexo. Esto permitiría, ~~para~~ confirmar el comportamiento de los datos teóricos analizados en este proyecto y robustecer ~~el análisis de los datos~~ nuestros resultados que indican la utilidad de la evaluación de estos genes como biomarcadores de progresión de DM2 por fallas en control glicémico.

8. Referencias

Ackermann, R. T., Cheng, Y. J., Williamson, D. F., & Gregg, E. W. (2011). Identifying adults at high risk for diabetes and cardiovascular disease using hemoglobin A1c: National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. *American Journal of Preventive Medicine*, 40(1), 11– 17. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2010.09.022>

Almutairi, F., Lee, J. K., & Rada, B. (2020). Regulator of G protein signaling 10: Structure, expression and functions in cellular physiology and diseases. *Cellular signalling*, 75, 109765.

American Diabetes Association, (2022) , Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes — 2022. *Diabetes Care*, 45(Suppl), 17–38

American Diabetes Association, (2011), Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* (Vol. 34, Issue SUPPL.1). <https://doi.org/10.2337/dc11-S062>

American Diabetes Association, (2001). Postprandial blood glucose. *Diabetes care*, 24(4), 775-778.

Anioke, I. C., Ezedigboh, A. N., Dozie-Nwakile, O. C., Chukwu, I. J., & Kalu, P. N. (2019). Predictors of poor glycemic control in adult with type 2 diabetes in South-Eastern Nigeria. *African Health Sciences*, 19(4), 2819-2828.

Barone, R., Aiello, C., Race, V., Morava, E., Foulquier, F., Riemersma, M., & Lefeber, D. (2012). DPM2-CDG: a muscular dystrophy-dystroglycanopathy syndrome with severe epilepsy.(IF 11.183).

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

Billings, L. K., & Florez, J. C. (2010). The genetics of type 2 diabetes: What have we learned from GWAS? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1212, 59–77. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05838.x>

Brand-Miller, J. C., Holt, S. H., Pawlak, D. B., & McMillan, J. (2002). Glycemic index and obesity. *The American journal of clinical nutrition*, 76(1), 281S-285S.

Boulé, N. G., Elizabeth Haddad, M., Kenny, G. P., Wells, G. A., & Sigal, R. J. (2001). Effects of Exercise on Glycemic Control and Body Mass in Type 2 Diabetes Mellitus A Meta-analysis of Controlled Clinical Trials. www.jama.com

Brunetti, A., Chiefari, E., & Foti, D. (2014). Recent advances in the molecular genetics of type 2 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*, 5(2), 128. <https://doi.org/10.4239/wjd.v5.i2.128>

Butler, A. E., Janson, J., Bonner-weir, S., Ritzel, R., Rizza, R. a, & Butler, P. C. (2003). Humans With Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 52(January), 102–110.

Castro-Juárez, C. J., Ramírez-García, S. A., Villa-Ruano, N., & García-Cruz, D. (2019). Genetic epidemiology on casual theories and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Gaceta de Mexico*, 153(7), 784–793. <https://doi.org/10.24875/gmm.m18000086>

Chen, W., Paradkar, P. N., Li, L., Pierce, E. L., Langer, N. B., Takahashi-Makise, N., ... & Paw, B. H. (2009). Abcb10 physically interacts with mitoferrin-1 (Slc25a37) to enhance its stability and function in the erythroid mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(38), 16263-16268.

Cho, N. H., Shaw, J. E., Karuranga, S., Huang, Y., da Rocha Fernandes,

J. D., Ohlogge, A. W., ... & Malanda, B. (2018). IDF diabetes atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 138, 271–281.

Cicinnati VR, Shen Q, Sotiropoulos GC, Radtke A, Gerken G, Beckebaum S. Validation of putative reference genes for gene expression studies in human hepatocellular carcinoma using real-time quantitative RT-PCR. *BMC Cancer*. 2008 Nov 27;8:350. doi: 10.1186/1471-2407-8-350. PMID: 19036168; PMCID: PMC2607287.

Cocolin, L. S., & Rantsiou, K. (2014). *Molecular Biology: Transcriptomics*. In *Encyclopedia of Food Microbiology*, Second Edition (pp. 803-807). Elsevier.

Corbi, S. C. T., de Vasconcellos, J. F., Bastos, A. S., Bussaneli, D. G., da Silva, B. R., Santos, R. A., Takahashi, C. S., de S. Rocha, C., Carvalho, B. de S., Maurer-Morelli, C. v., Orrico, S. R. P., Barros, S. P., & Scarel-Caminaga, R. M. (2020). Circulating lymphocytes and monocytes transcriptomic analysis of patients with type 2 diabetes mellitus, dyslipidemia and periodontitis. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65042-9>

Corbi, S. C. T., Bastos, A. S., Nepomuceno, R., Cirelli, T., Santos, R. A. D., Takahashi, C. S., ... & Scarel-Caminaga, R. M. (2017). Expression profile of genes potentially associated with adequate glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of diabetes research*, 2017.

Cornell, S. (2015). Continual evolution of type 2 diabetes: an update on pathophysiology and emerging treatment options. *Therapeutics and clinical risk management*, 11, 621.

Copps, K. D., & White, M. F. (2012). Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia*, 55(10), 2565–2582.

<https://doi.org/10.1007/s00125-012-2644-8>

DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Zimmet, P., & Alberti, G. (Eds.). (2015). *International textbook of diabetes mellitus*. John Wiley & Sons.

DeFronzo, R. A., & Tripathy, D. (2009). Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. In *Diabetes care*: Vol. 32 Suppl 2. <https://doi.org/10.2337/dc09-s302>

Diabetes Mellitus Interagency Coordinating Committee. (2011). *Advances and Emerging Opportunities in Diabetes Research: A Strategic Planning Report of the Diabetes Mellitus Interagency Coordinating Committee*. US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, Diabetes Mellitus Interagency Coordinating Committee.

Duarte, F. G., da Silva Moreira, S., Maria da Conceição, C. A., de Souza Teles, C. A., Andrade, C. S., Reingold, A. L., & Moreira Jr, E. D. (2019). Sex differences and correlates of poor glycaemic control in type 2 diabetes: a cross-sectional study in Brazil and Venezuela. *BMJ open*, 9(3), e023401.

Fang, X., Chung, J., Olsen, E., Snider, I., Earls, R. H., Jeon, J., ... & Lee, J. K. (2019). 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. *Nutrition Research*, 70, 50-59.

Fang, Y., Jiang, Q., Li, S., Zhu, H., Xu, R., Song, N., ... & Hu, G. (2021). Opposing functions of β -arrestin 1 and 2 in Parkinson's disease via microglia inflammation and Nprl3. *Cell Death & Differentiation*, 28(6), 1822-1836.

Faselis, C., Katsimardou, A., Imprialos, K., Deligkaris, P., Kallistratos, M.,

& Dimitriadis, K. (2019). Microvascular complications of type 2 diabetes mellitus. *Current Vascular Pharmacology*, 17. doi:10.2174/15701611176661905021

Fazakerley, D. J., Krycer, J. R., Kearney, A. L., Hocking, S. L., & James, D. E. (2019). Muscle and adipose tissue insulin resistance: malady without mechanism?. *Journal of Lipid Research*, 60(10), 1720-1732.

Feinglos, M. N., & Bethel, M. A. (Eds.). (2008). *Type 2 diabetes mellitus: an evidence-based approach to practical management* (p. 462). New York, NY: Humana Press.

Gentilini, F., Turba, M. E., Giancola, F., Chiocchetti, R., Bernardini, C., Dajbychova, M., ... & Drögemüller, C. (2019). A large deletion in the GP9 gene in Cocker Spaniel dogs with Bernard- Soulier syndrome. *Plos one*, 14(9), e0220625

Glovaci, Diana; Fan, Wenjun; Wong, Nathan D. (2019). Epidemiology of Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease. *Current Cardiology Reports*, 21(4), 21-. doi:10.1007/s11886-019-1107-y

Grarup, N., Sandholt, C. H., Hansen, T., & Pedersen, O. (2014). Genetic susceptibility to type 2 diabetes and obesity: from genome-wide association studies to rare variants and beyond. *Diabetologia*, 57(8), 1528-1541

Grill V., & Björklund, A. (2000). Dysfunctional insulin secretion in type 2 diabetes: role of metabolic abnormalities. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(3), 429-440.

Guillam, M. T., Hümmler, E., Schaerer, E., Wu, J. Y., Birnbaum, M. J., Beermann, F., ... & Thorens, B. (1997). Early diabetes and abnormal postnatal pancreatic islet development in mice lacking Glut-2. *Nature genetics*, 17(3), 327-330.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

Gutiérrez-Rodelo, C., Roura-Guiberna, A., & Olivares-Reyes, J. A. (2017). Mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina: una actualización. *Gaceta médica de México*, 153(2), 214-228.

Haghighatpanah, M., Nejad, A. S. M., Haghighatpanah, M., Thunga, G., & Mallayasamy, S. (2018). Factors that correlate with poor glycemic control in type 2 diabetes mellitus patients with complications. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 9(4), 167–174. <https://doi.org/10.24171/j.phrp.2018.9.4.05>

Hameed, I., Masoodi, S. R., Mir, S. A., Nabi, M., Ghazanfar, K., & Ganai, B. A. (2015). Type 2 diabetes mellitus: From a metabolic disorder to an inflammatory condition. *World Journal of Diabetes*, 6(4), 598. <https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i4.598>

Hatting, M., Tavares, C. D., Sharabi, K., Rines, A. K., & Puigserver, P. (2018). Insulin regulation of gluconeogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1411(1), 21-35.

Henning, R. J. (2018). Type-2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Future Cardiology*. doi:10.2217/fca-2018-0045)

Herder, C., Karakas, M., & Koenig, W. (2011). Biomarkers for the prediction of type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 90(1), 52-66

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2021) ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL DE LA DIABETES (14 DE NOVIEMBRE).https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/EAP_Diabetes2021.pdf

Jiang, X., Zhong, R., Dai, W., Huang, H., Yu, Q., Zhang, J. A., & Cai, Y. (2021). Exploring Diagnostic Biomarkers and Comorbid Pathogenesis for Osteoarthritis and Metabolic Syndrome via Bioinformatics Approach.

International journal of general medicine, 14, 6201.

Karlsson, H. K. R., & Zierath, J. R. (2007). Insulin signaling and glucose transport in insulin resistant human skeletal muscle. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 48(2-3), 103–113. doi:10.1007/s12013-007-0030-

Keating, S., & El-Osta, A. (2013). Epigenetic changes in diabetes. *Clinical Genetics*, 84(1), 1–10. doi:10.1111/cge.12121

Kifer, D., Louca, P., Cvetko, A., Deriš, H., Cindrić, A., Grallert, H., ... & Menni, C. (2021). N- glycosylation of immunoglobulin G predicts incident hypertension. *Journal of hypertension*, 39(12), 2527-2533.

Krook, A., Björnholm, M., Galuska, D., Jiang, X. J., Fahlman, R., Myers, M. G., Wallberg- Henriksson, H., & Zierath, J. R. (2000). Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes*, 49(2), 284–292.

Kusunoki, Y., Konishi, K., Tsunoda, T., & Koyama, H. (2022). Significance of Glycemic Variability in Diabetes Mellitus. *Internal Medicine*, 8424-21.

Kyrou, I., Tsigos, C., Mavrogianni, C., Cardon, G., Van Stappen, V., Latomme, J., ... & Manios, Y. (2020). Sociodemographic and lifestyle-related risk factors for identifying vulnerable groups for type 2 diabetes: A narrative review with emphasis on data from Europe. *BMC Endocrine Disorders*, 20, 1-13.

Lee, J. K., Chung, J., McAlpine, F. E., & Tansey, M. G. (2011). Regulator of G-protein signaling-10 negatively regulates NF-κB in microglia and neuroprotects dopaminergic neurons in hemiparkinsonian rats. *Journal of Neuroscience*, 31(33), 11879-11888.

Lee, J. K., Chung, J., Kannarkat, G. T., & Tansey, M. G. (2013). Critical role of regulator G-protein signaling 10 (RGS10) in modulating macrophage M1/M2 activation. *PloS one*, 8(11), e81785.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

Lee, B. C., & Lee, J. (2014). Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1842(3), 446-462.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

Lee, J. K., McCoy, M. K., Harms, A. S., Ruhn, K. A., Gold, S. J., & Tansey, M. G. (2008). Regulator of G-protein signaling 10 promotes dopaminergic neuron survival via regulation of the microglial inflammatory response. *Journal of Neuroscience*, 28(34), 8517-8528.

Ley General de Salud en materia de investigación para la salud, 2013, Diario Oficial de la Federación, https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/regley/Reg_LGS_MIS.pdf

Liang, K.-H. (2013). Transcriptomics. In *Bioinformatics for Biomedical Science and Clinical Applications* (pp. 49–82). Elsevier.

Ling, C., & Rönn, T. (2019). Epigenetics in Human Obesity and Type 2 Diabetes. *Cell Metabolism*, 29(5), 1028–1044. doi:10.1016/j.cmet.2019.03.009

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402-408.

Lorenzo, A., Razzaboni, B., Weir, G. C., & Yankner, B. A. (1994). Pancreatic islet cell toxicity of amylin associated with type-2 diabetes mellitus. *Nature*, 368(6473), 756-760.

Luebbehusen, H. (2004) The Significance of the 260/230 Ratio in Determining Nucleic Acid Purity, (www.bcm.edu/mcfweb/?PMID=3100).

Maeda, Y., Tomita, S., Watanabe, R., Ohishi, K., & Kinoshita, T. (1998). DPM2 regulates biosynthesis of dolichol phosphate-mannose in mammalian cells: correct subcellular localization and stabilization of

DPM1, and binding of dolichol phosphate. *The EMBO journal*, 17(17), 4920- 4929.

Maggio, C. A., & Pi-Sunyer, F. X. (2003). Obesity and type 2 diabetes. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 32(4), 805–822. doi:10.1016/s0889-8529(03)00071-

Magliano J., Boyko Balkau E., Barengo N., Barr E., Basit A., Bhata D., Bommer C., Booth G., Cariou B., Chan J., Chen H., Chen L., Chivese T., Dabalea D, Divakar H., (2021).IDF Diabetes Atlas. International Diabetes Federation,10th edition.

Majewski, I. J., & Bernards, R. (2011). Taming the dragon: Genomic biomarkers to individualize the treatment of cancer. In *Nature Medicine* (Vol. 17, Issue 3, pp. 304–312). <https://doi.org/10.1038/nm.2311>

Maureen I. Harris, PHD, M., Ronald Klein, MD, M., TIM A. Welborn, PHD, F., & Matthew W. Knuiman, PHD, B. (1992). Onset of NIDDM Occurs at Least 4-7 Yr Before Clinical Diagnosis. *Diabetes Care*, 15(7), 815–819.

Mao, J., Ai, J., Zhou, X., Shenwu, M., Ong, M., Blue, M., ... & Deng, Y. (2011). Transcriptomic profiles of peripheral white blood cells in type II diabetes and racial differences in expression profiles. *BMC genomics*, 12(5), 1-8.

Meigs JB, Cupples LA, Wilson PW. Parental transmission of type 2 diabetes: the Framingham Offspring Study. *Diabetes* 2000. 49:2201-2207.)

Milhem, F., Hamilton, L. M., Skates, E., Wilson, M., Johanningsmeier, S. D., & Komarnytsky, S. (2024). Biomarkers of metabolic adaptation to high dietary fats in a mouse model of obesity resistance. *Metabolites*, 14(1), 69.

Milward, E. A., Shahandeh, A., Heidari, M., Johnstone, D. M., Daneshi,

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

N., & Hondermarck, H. (2016). Transcriptomics. In *Encyclopedia of Cell Biology* (Vol. 4, pp. 160–165). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394447-4.40029-5>

Ni, S., Kuang, Y., Yuan, Y., & Yu, B. (2020). Mitochondrion-mediated iron accumulation promotes carcinogenesis and Warburg effect through reactive oxygen species in osteosarcoma. *Cancer cell international*, 20(1), 1-12.

Nuttall, F. Q., Ngo, A., & Gannon, M. C. (2008). Regulation of hepatic glucose production and the role of gluconeogenesis in humans: is the rate of gluconeogenesis constant?. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 24(6), 438-458

Ohtsubo, K., Takamatsu, S., Minowa, M. T., Yoshida, A., Takeuchi, M., & Marth, J. D. (2005). Dietary and genetic control of glucose transporter 2 glycosylation promotes insulin secretion in suppressing diabetes. *Cell*, 123(7), 1307-1321.

Ohtsubo K, Takamatsu S, Gao C, Korekane H, Kurosawa TM and Taniguchi N (2013) Nglycosylation modulates the membrane sub-domain distribution and activity of glucose transporter 2 in pancreatic beta cells. *Biochem Biophys Res Commun* 434, 346–351.

Olokoba, A. B., Obateru, O. A., & Olokoba, L. B. (2012). Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman medical journal*, 27(4), 269

Oropeza-Valdez JJ, Hernandez JCM, Jaime-Sánchez E, López-Ramos E, Lara-Ramírez EE, Hernández YL, Castañeda-Delgado JE, Enciso-Moreno JA. Transcriptome Analysis Identifies oxidative stress injury biomarkers for diabetic nephropathy. *Arch Med Res*. 2023 Jan;54(1):17-26. doi: 10.1016/j.arcmed.2022.12.004. Epub 2022 Dec 22. PMID: 36564298.

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT– PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45

Radenkovic, S., Fitzpatrick-Schmidt, T., Byeon, S. K., Madugundu, A. K., Saraswat, M., Lichty, A., ... & Morava, E. (2021). Expanding the clinical and metabolic phenotype of DPM2 deficient congenital disorders of glycosylation. *Molecular genetics and metabolism*, 132(1), 27- 37

Roglic, G. (2016). WHO Global report on diabetes: A summary. *International Journal of Noncommunicable Diseases*, 1(1), 3.

Sartore-Bianchi, A., Martini, M., Molinari, F., Veronese, S., Nichelatti, M., Artale, S., di Nicolantonio, F., Saletti, P., de Dosso, S., Mazzucchelli, L., Frattini, M., Siena, S., & Bardelli, A. (2009). PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. *Cancer Research*, 69(5), 1851–1857. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2466>

Scherer, P. E. (2019). The many secret lives of adipocytes: implications for diabetes. *Diabetologia*, 62(2), 223-232.

Shah, S. P., Morin, R. D., Khattra, J., Prentice, L., Pugh, T., Burleigh, A., Delaney, A., Gelmon, K., Guliany, R., Senz, J., Steidl, C., Holt, R. A., Jones, S., Sun, M., Leung, G., Moore, R., Severson, T., Taylor, G. A., Teschendorff, A. E., ... Aparicio, S. (2009). Mutational evolution in a lobular breast tumour profiled at single nucleotide resolution. *Nature*, 461(7265), 809–813. <https://doi.org/10.1038/nature08489>

Sheleme Girma Mamo Tsegaye Melaku Tamiru Sahilu, T. (2020). Glycemic Control and its Predictors among Adult Diabetic Patients attending Mettu Karl Referral Hospital, Southwest Ethiopia: A Prospective Observational Study. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.12459182>

Skol, A. D., Jung, S. C., Sokovic, A. M., Chen, S., Fazal, S., Sosina, O.,

... & DCCT/EDIC Study group. (2020). Integration of genomics and transcriptomics predicts diabetic retinopathy susceptibility genes. *Elife*, 9, e59980.

Terabayashi, T., Germino, G. G., & Menezes, L. F. (2020a). Pathway identification through transcriptome analysis. In *Cellular Signalling* (Vol. 74). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109701>

Vazquez-Benitez, G., Desai, J. R., Xu, S., Goodrich, G. K., Schroeder, E. B., Nichols, G. A., ... & O'Connor, P. J. (2015). Preventable major cardiovascular events associated with uncontrolled glucose, blood pressure, and lipids and active smoking in adults with diabetes with and without cardiovascular disease: a contemporary analysis. *Diabetes Care*, 38(5), 905-912.)

Weng, J., Li, Y., Xu, W., Shi, L., Zhang, Q., Zhu, D., Hu, Y., Zhou, Z., Yan, X., Tian, H., Ran, X., Luo, Z., Xian, J., Yan, L., Li, F., Zeng, L., Chen, Y., Yang, L., Yan, S., ... Cheng, H. (2008). Effect of intensive insulin therapy on β -cell function and glycaemic control in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a multicentre randomised parallel-group

Westermarck, P. (2011). Amyloid in the islets of Langerhans: Thoughts and some historical aspects. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 116(2), 81–89. <https://doi.org/10.3109/03009734.2011.573884>

World Health Organization .(2019). Classification of diabetes mellitus. <https://apps.who.int>

World Medical Association. (2013). World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *Jama*, 310(20), 2191-2194.

Wu, Y., Ding, Y., Tanaka, Y., & Zhang, W. (2014). Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and

prevention. *International journal of medical sciences*, 11(11), 1185.

Wu, C., Xu, G., Tsai, S. Y. A., Freed, W. J., & Lee, C. T. (2017). Transcriptional profiles of type 2 diabetes in human skeletal muscle reveal insulin resistance, metabolic defects, apoptosis, and molecular signatures of immune activation in response to infections. *Biochemical and biophysical research communications*, 482(2), 282-288.

Yang, Y., & Xu, X. (2021). Identification of key genes in coronary artery disease: an integrative approach based on weighted gene co-expression network analysis and their correlation with immune infiltration. *Aging (Albany NY)*, 13(6), 8306.

Yoon, J. C., Puigserver, P., Chen², G., Donovan, J., Wu, Z., Rhee, J., Adelmant, G., Stafford³, J., Kahn, C. R., Granner³, D. K., Newgard², C. B., & Spiegelman, B. M. (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. In *NATURE* (Vol. 413).

Zhang, X., Gregg, E. W., Williamson, D. F., Barker, L. E., Thomas, W., Bullard, K. M., ... & Albright, A. L. (2010). A1C level and future risk of diabetes: a systematic review. *Diabetes care*, 33(7), 1665-1673 trial.

Zhou, Y., Guo, J., Wang, X., Cheng, Y., Guan, J., Barman, P., ... & Wei, Y. (2021). FKBP39 controls nutrient dependent Npr13 expression and TORC1 activity in *Drosophila*. *Cell death & disease*, 12(6), 1-15.

9. Anexos

Anexo 1: Cronograma de Actividades

Actividades	1er semestre (2022)			2do semestre (2023)				3er semestre (2023)				4to semestre (2024)													
	Agosto	Septie	Octubri	Noviem	Diciem	Enero	Febrer	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agost	Septie	Octubri	Novier	Diciem	Enero	Febrer	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	
Planteamiento del proyecto	X																								
Desarrollo de la estructura del protocolo		X																							
Planteamiento de criterios de inclusión, exclusión y eliminación				X																					
Reuniones de consenso para la logística de toma de muestra				X	X					X															
Recolección de muestras				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Capacitación de curso de bioética intrahospitalaria				X																					
Primer tutorial						X																			
Protocolo aceptado por comité de bioética							X																		
Protocolo aceptado a consejo de posgrado								X																	
Participación en el coloquio estudiantil									X																
Participación en el congreso de la sociedad mexicana de inmunología										X															
Segundo tutorial										X															
Revisión de protocolos de metodología											X														
Pedido de reactivos y equipo											X														
Ensayos de extracción y purificación de RNA											X	X	X	X	X	X									
Ensayos de evaluación de la integridad del RNA											X	X	X	X	X	X									
Participación en la semana cultural de la facultad de química													X												
Tercer tutorial																X									
Extracción y purificación de RNA																	X	X	X	X	X	X			
Evaluación de integridad de RNA																	X	X	X	X	X	X			
Síntesis de cDNA																	X	X	X	X	X	X			
Amplificación por qPCR																	X	X	X	X	X	X			
Cuarto tutorial																							X		
Participación en coloquio estudiantil modalidad divulgación																							X		
Escritura de la tesis																							X	X	X

***NOTA:** Este proyecto está ligado a una investigación previa la cual tiene registro ante un comité de bioética.

Anexo 2: Consentimiento informado.

Carta de Consentimiento Informado

“Análisis de correlación entre la expresión de genes asociados a pobre control glicémico y los niveles de hemoglobina glicada que presentan pacientes con diabetes mellitus tipo 2”

Registro:

INTRODUCCIÓN: La Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una enfermedad progresiva que en los sujetos afectados se presenta con niveles elevados de glucosa. La DM2 afecta a más de 12.8 millones de mexicanos adultos. La detección temprana de la DM2 es de suma importancia, por lo que en este proyecto se busca identificar y validar moléculas para desarrollar pruebas diagnósticas y pronósticas que permitan evaluar el riesgo a desarrollar la enfermedad. Para ello se tomarán muestras de sangre en 5 tubos vacutainer para realizar estudios de los genes y de las proteínas en suero.

En virtud de lo cual, entiendo que se solicita mi autorización para utilizar las muestras de sangre y suero proporcionadas para desarrollar investigaciones futuras en salud relacionadas con la diabetes mellitus.

RIESGOS Y BENEFICIOS: Entiendo que los investigadores tomarán las medidas necesarias para cuidar mi integridad y confidencialidad de los datos relacionados con las muestras biológicas que proporcioné. Además, entiendo que los beneficios generados con el uso de mis muestras serán para la comunidad y para futuras generaciones que podrían tener factores de riesgo para el desarrollo de diabetes.

DERECHOS Y OPCIONES DEL PACIENTE: Entiendo que **mis muestras biológicas** solo podrán ser utilizadas por investigadores que realicen estudios relacionados con la generación de métodos para la resolución de problemas ocasionados por la diabetes, siempre y cuando firme este documento de consentimiento informado.

Al aceptar que **mis muestras biológicas** sean utilizadas con los fines antes mencionados, no renuncio a ninguno de los derechos que por ley

me pertenecen. Estoy consciente de que la información que se genere del análisis de **mis muestras biológicas** será utilizada únicamente para fines de investigación y desarrollo y **nunca se colocarán o publicarán datos que permitan revelar mi identidad**, debido a que los investigadores me garantizan que anonimizarán (codificarán) los datos con la finalidad de respetar mi confidencialidad.

Entiendo que la institución donde se almacenarán **mis muestras biológicas** es la **Universidad Autónoma de Querétaro, en la Facultad de Química ubicada en Centro Universitario con domicilio en Cerro de las Campanas S/N, Col. código postal 76010**, y que esta institución será la encargada de velar por la seguridad y confidencialidad de **mis muestras biológicas**, y que podré contactarme con la misma con los datos colocados en la sección de información de contacto de este documento. Además, esta institución será responsable de dar un adecuado manejo para el correcto mantenimiento de estas. Entiendo que **mis muestras biológicas** serán almacenadas por un tiempo máximo de **10 años** (dependiendo del tipo de muestra, condiciones de almacenamiento y análisis que se pretenda realizar).

Entiendo que soy libre de retirar mi consentimiento en cualquier momento, para lo cual deberé informar al personal a cargo de custodiar **mis muestras biológicas**, quienes se comunicarán con los investigadores que se encuentren utilizando **mis muestras biológicas** en investigaciones, para que, en ese momento, las muestras y los datos obtenidos del análisis de las muestras sean eliminados y no puedan ser utilizados para ningún fin. **Esto no me causará ninguna penalidad**, ni tendrá impacto alguno en la atención en salud que por ley **me corresponde**.

Entiendo que tengo derecho a decidir si deseo o no recibir información de los resultados de los análisis que se realicen durante la investigación con **mis muestras biológicas**.

Deseo recibir los resultados de los análisis: SI___NO___.

En caso de respuesta afirmativa pueden contactarme al correo:

y/o a los teléfonos:

Entiendo que se comunicarán **conmigo** en caso de que en alguna investigación que tenga que ver con la generación de aportes para la resolución de problemas ocasionados por la diabetes. Se me informará si encontraran algún resultado que ponga en peligro mi vida, para lo cual podrán contactarme al correo y teléfonos antes mencionados.

Entiendo que mis muestras biológicas podrían ser utilizadas para realizar análisis genéticos o genómicos, siempre y cuando se encuentren enmarcadas en la misma línea de investigación que tenga que ver con problemas ocasionados por la DM.

Entiendo que mis muestras biológicas serán utilizadas únicamente con fines de investigación, y no serán empleadas con fines comerciales.

Entiendo que mis muestras biológicas serán destruidas en un máximo de 10 años.

COSTOS Y COMPENSACIÓN: Entiendo que, al autorizar el uso de **mis muestras biológicas**, no recibiré ninguna compensación.

CONFIDENCIALIDAD DE DATOS: Entiendo que los investigadores reemplazarán mis datos personales por una codificación con el objeto de precautelar la seguridad de mi información. Entiendo que, tanto las muestras biológicas humanas como mis datos confidenciales serán utilizados exclusivamente para la investigación científica propuesta, y solo eventualmente para investigaciones científicas posteriores relacionadas con la diabetes, para lo cual deberán pasar por la evaluación y aprobación de un Comité de Ética de Investigaciones humanas, con la finalidad de asegurar que se respeten en todo momento los principios bioéticos.

INFORMACIÓN DE CONTACTO: Entiendo que en cualquier momento puedo comunicarme con la institución donde se almacenarán **mis muestras biológicas**, para que a su vez sirva como canal de comunicación con los investigadores que las usen en sus estudios al siguiente teléfono: 4421921200 en las siguientes extensiones: 5594, 5517, 5505, 5500; y correo electrónico: davidg3@uaq.mx.

DECLARATORIA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO:

Yo _____, comprendo que mis muestras biológicas serán utilizadas con fines de investigación que tenga que ver con la generación de aportes para la resolución de problemas ocasionados por la diabetes. Me han explicado los riesgos y beneficios de la utilización de mis muestras biológicas en un lenguaje claro y sencillo. Han respondido a todas las preguntas que he realizado y me entregaron una copia de este documento. Entiendo que en todo momento los investigadores tomarán las medidas necesarias para cuidar la confidencialidad de mi información. En virtud de lo cual, voluntariamente (marque con una X):

ACEPTO

NO ACEPTO

Nombre completo del paciente:

Firma _____

Fecha y lugar _____

Nombre completo del testigo _____

Firma del testigo _____ Fecha y lugar _____

Nombre completo del responsable de tomar este documento

Firma del responsable

Fecha y lugar

Anexo 3: Carta de revocación del consentimiento informado
Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Química Clínica Diagnóstica

CARTA DE REVOCACION DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del proyecto de investigación:

“Análisis de correlación entre la expresión de genes asociados a pobre control glicémico y los niveles de hemoglobina glicada que presentan pacientes con diabetes mellitus tipo 2 ”

Investigadores:

Dr. J. Antonio Enciso
M. en I.M. David G. García
Dra. Karla Lira
Dr. Gabriel Frontana;
Dr. Enrique Villareal
Dr. Martín Reyna;
Dra. Carolina Serrano

Estudiantes:

Elizabeth C. Carrasco Ruiz

Sedes donde se realizará el estudio: Hospital General Regional 2 del IMSS, Circuito Universidades, 76269 Santiago de Querétaro, Qro.
Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química, Cerro de las Campanas S/N, Centro Universitario, 76010 Santiago de Querétaro, Qro.

Nombre del paciente: _____

Por este conducto deseo informar mi decisión de retirarme de participar en el proyecto de investigación con nombre:

“Análisis de correlación entre la expresión de genes asociados a pobre control glicémico y los niveles de hemoglobina glicada que presentan pacientes con diabetes mellitus tipo 2 ”, por las siguientes razones. (PUEDE DEJARLO EN BLANCO SI NO DESEA MENCIONAR LAS RAZONES) :

_____.

Si el paciente lo desea, podrá solicitar que le sea entregada toda la información que se haya recabado sobre el/ella/elle con motivo de su participación en el proyecto de investigación antes referido.

Nombre y firma del paciente

___/___/___.
día mes año

Nombre y firma del testigo

___/___/___
día mes año

Nombre y firma del testigo

___/___/___
día mes año

Con copia para el paciente (Se deberá elaborar por duplicado, quedando una copia en poder del paciente)

Anexo 4: Formulario para aplicar a los pacientes IMSS-DM

Hipercolesterolemia v/o Hipertensión arterial <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No Año de diagnóstico: _____ Años de evolución: _____ ¿Se trata con alguno de estos medicamentos? <input type="checkbox"/> Atorvastatina <input type="checkbox"/> Pravastatina <input type="checkbox"/> Bezafibrato <input type="checkbox"/> Otro _____ Especifique: _____ Año de consumo de medicamento: _____ ¿Si recibió tratamiento su médico verificó mediante estudios de laboratorio que los niveles de grasas regresaron a la normalidad? <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No		ANTECEDENTES GINECÓ-OBSTETRICOS Menarquia (inicio de regla): _____ Ritmo: _____ F.U.M.: _____ Gestas: _____ Partos: _____ Abortos: _____ Cesáreas: _____ I.V.S.A.: _____ Algun hijo pesó más de 4kg <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No Uso de métodos anticonceptivos: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No Cuales: _____ Le han encontrado alguna vez valores de glucosa altos durante sus embarazos: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No *Si la respuesta es: No (sumar 0p.) Si (sumar 5p.) *Sumar 5 puntos en el apartado de prediabetes-diabetes.									
Tuberculosis <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No *Si es afirmativo realizar estudio epidemiológico. Año de diagnóstico: _____ Años de evolución: _____ Se trata con alguno de estos medicamentos actualmente: <input type="checkbox"/> Isoniacida <input type="checkbox"/> Rifampicina <input type="checkbox"/> Pirazinamida <input type="checkbox"/> Etambutol <input type="checkbox"/> Otro _____ Especifique: _____ Se ha realizado alguna prueba para saber si tiene TB: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No Tipo de prueba: _____ Resultado: _____ Enf. Autoinmunes <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No Tiene enfermedad que pueda afectar su sistema inmunológico: <input type="checkbox"/> VIH <input type="checkbox"/> Cáncer <input type="checkbox"/> Leucemia <input type="checkbox"/> Artritis reumatoidea <input type="checkbox"/> Lupus <input type="checkbox"/> Esclerosis múltiple <input type="checkbox"/> Otra _____ Especifique: _____		SINTOMAS GENERALES Síntomas de tuberculosis: <input type="checkbox"/> Tos persistente (Más 3 sem) <input type="checkbox"/> Tos con flema -sangre <input type="checkbox"/> Sudoraciones nocturnas <input type="checkbox"/> Fiebre <input type="checkbox"/> Astenia (Fatiga) <input type="checkbox"/> Adinamia (Perdida de fuerza) <input type="checkbox"/> Pérdida de peso *Si alguno de estos síntomas es afirmativo realizar estudio epidemiológico. Síntomas de Diabetes: <input type="checkbox"/> Pérdida de peso <input type="checkbox"/> Poliuria (Orina frecuente) <input type="checkbox"/> Polifagia (Mucha hambre) <input type="checkbox"/> Polidipsia (Mucha sed) <input type="checkbox"/> Sangran las encías <input type="checkbox"/> Dientes flojos <input type="checkbox"/> Adormecimiento de pies <input type="checkbox"/> Dificultades de erección (hombres)									
ANTECEDENTES PERSONALES NO PATOLOGICOS Alcohol: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No Consume alcohol en las comidas: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No Consume alcohol fuera de comidas: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No Bebe los fines de semana: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No Tipo de bebida que consume: _____ ¿Cuántas vasos a la semana? _____ Tabaquismo: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No Cantidad de cigarrillos que fuma al día: _____ Tiempo que tiene fumando: _____ Drogas: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No Tipo de droga que consume: _____ Vacunas: ¿Tienes esquema completo?: _____ Realiza habitualmente al menos 30 minutos de actividad física: ¿cuántas veces a la semana? <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No *Si la respuesta es negativa sumar 2 puntos en el apartado de prediabetes-diabetes. Frecuencia que come frutas o verduras: <input type="checkbox"/> Todos los días <input type="checkbox"/> No todos los días *Si la respuesta es todos los días (sumar 0p.) *Si la respuesta es no todos los días (sumar 1p.)		SIGNOS VITALES T.A.: _____ T.A.: _____ F.C.: _____ Brazo der.Sentado Brazo Izq.Sentado Frec.Resp.: _____ Temp: _____ Peso: _____ Talla: _____ IMC: _____ Menos de 25kg/m2 (Sumar 0p.) Entre 25-30 kg/m2 (Sumar 1p.) Mayor de 30kg/m2 (Sumar 3p.) Perímetro de cintura medido por debajo de la costilla (Normalmente a nivel del ombligo): _____ <table border="0"> <tr> <td>Hombres</td> <td>Mujeres</td> </tr> <tr> <td>Menos de 94 cm</td> <td>Menos de 80 cm (Sumar 0p.)</td> </tr> <tr> <td>Entre 94-102 cm</td> <td>Entre 80-88 cm (Sumar 3p.)</td> </tr> <tr> <td>Más de 102 cm</td> <td>Más de 88 cm (Sumar 4p.)</td> </tr> </table>		Hombres	Mujeres	Menos de 94 cm	Menos de 80 cm (Sumar 0p.)	Entre 94-102 cm	Entre 80-88 cm (Sumar 3p.)	Más de 102 cm	Más de 88 cm (Sumar 4p.)
Hombres	Mujeres										
Menos de 94 cm	Menos de 80 cm (Sumar 0p.)										
Entre 94-102 cm	Entre 80-88 cm (Sumar 3p.)										
Más de 102 cm	Más de 88 cm (Sumar 4p.)										
Suma de puntaje de prediabetes y diabetes. Más de 14 puntos es riesgo de prediabetes-diabetes.											

Datos relevantes de la exploración clínica:



SOLICITUD DE PRUEBAS DE LABORATORIO

(Presentarse en ayuno de 12 h y llevar la primera orina de la mañana)

1. Biometría hemática (BHc)
2. Química Sanguínea 4 (glucosa, urea, creatinina, ácido úrico)
3. Perfil de Lípidos (Colesterol total, Col-HDL, Col-LDL, Triglicéridos)
4. Hemoglobina glicada (HbA1c%)
5. Examen general de orina
6. Insulina sérica basal

Nombre y firma de encuestador

Supervisor



HOJA PARA EL LABORATORIO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
HOSPITAL REGIONAL 2 "EL MARQUEZ"

Cuestionario

FOLIO: DM-

Número consecutivo

Iniciales nombre y apellidos

D D M M A A A A

FECHA

NSS: _____

IDENTIFICACION			
1. Nombre:	Apellido paterno	Apellido materno	Nombre (s)
2. Fecha de nacimiento:	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	3. Edad: <input type="text"/>	4. Sexo: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F
Menos de 45 años (Sumar 0 p.)		45-54 años (Sumar 2 p.)	55-64 años (Sumar 3 p.)
Más de 64 años (Sumar 4 p.)		*Sumar en el apartado del prediabetes-diabetes al final del cuestionario.	
5. Domicilio actual:	Calle y número		
Colonia:	Estado: _____ C.P: _____		
Municipio:	Escolaridad: _____	Ocupación: _____	
Estado civil: _____	Celular: _____	E-mail: _____	
Teléfono: _____			

SOLICITUD DE PRUEBAS DE LABORATORIO

(Presentarse en ayuno de 12 h y llevar la primera orina de la mañana)

1. Biometría hemática (BHc)
2. Química Sanguínea 4 (glucosa, urea, creatinina, ácido úrico)
3. Perfil de Lípidos (Colesterol total, Col-HDL, Col-LDL, Triglicéridos)
4. Hemoglobina glicada (HbA1c%)
5. Examen general de orina
6. Insulina sérica basal

Nombre y firma del médico