



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**“DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA EN TEJIDO  
ADIPOSO DE PACIENTES CON OBESIDAD EN RELACIÓN CON  
LOS VALORES SÉRICOS DE GLUCOSA”**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA**

**P R E S E N T A:**

**RODRÍGUEZ AMADOR VIRGINIA**

**DIRECTOR: Dr. FERNANDO SUÁREZ SÁNCHEZ**

**ASESOR: Dra. RAQUEL RETANA UGALDE**

**ASESOR: Dr. JOSÉ LUIS ALFREDO MORA GUEVARA.**



**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN BIOQUÍMICA DEL  
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES BERNANDO  
SEPÚLVEDA, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS.**

**Ciudad de México, 2020**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

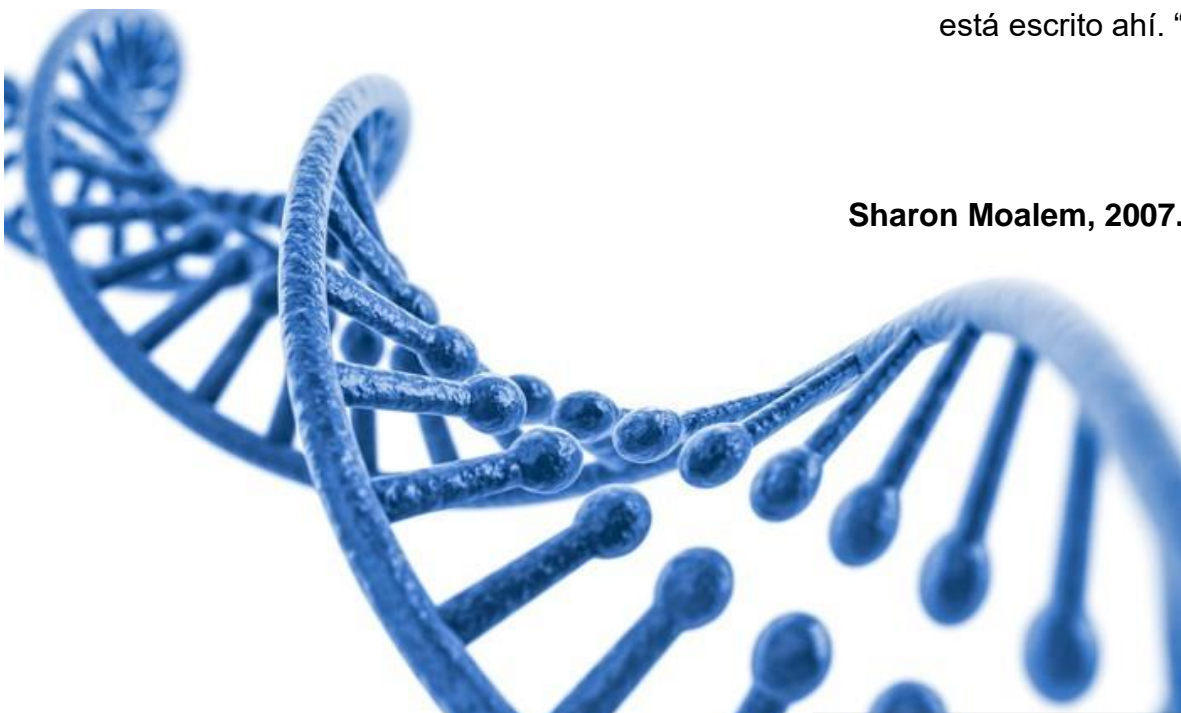
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

“El ADN no es un destino, es historia. Tus genes son el legado de todos los organismos que existieron antes que tú, empezando por tus padres y rebobinando para atrás hasta el mismo principio.

En algún lugar de tu código genético está el relato de cada plaga, cada parásito, cada depredador y cada alteración planetaria a la que tus antepasados sobrevivieron.

Y cada mutación, cada cambio, que les ayudó a adaptarse mejor a esas circunstancias está escrito ahí. “

**Sharon Moalem, 2007.**



## **DEDICATORIA**

Todo el esfuerzo, paciencia y sentimientos que conllevó concluir esta etapa y proyecto, no hubiera sido posible sin ustedes. Con todo mi amor, les dedico este trabajo. Son el motor de mi vida, y juntos me han dado las armas para que me encuentre en esta etapa de mi vida. Verónica, Rodrigo y Laura, esto es de ustedes.

¡Los Amo!

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Me encuentro infinitamente agradecida con mis grandes pilares. Los primeros dos, mis padres. Que sin ellos no hubiera sido posible culminar esta etapa de mi vida. Gracias por darme más de lo esencial, por siempre hacer posible cada sueño y por ayudarme en cada objetivo que me planteaba. No hay palabras ni actos que regresen todo el amor, confianza y apoyo que han depositado en mí. ¡Los Amo, mis superhéroes sin capa!

Mamá, gracias por los consejos y las palabras de aliento que me diste cuando más lo necesite. Papá, gracias por darme las armas para saber que la única limitante entre donde estoy y donde quiero estar, soy yo. Gracias a los dos por dejar todo de lado, su vida, sus sueños, sus planes. ¡Gracias por ser padres de tiempo completo!

Con mi tercer pilar, mi mejor amiga, mi confidente, mi hermana. Lau, siempre has sido “pieza” clave en cada faceta de mi vida. Gracias por brindarme amor, comprensión, paciencia y mucho conocimiento, por inyectarme desde pequeñas la idea de destacar siempre en todo aquello que nos hiciera felices. ¡Eres una mujer brillante!

A Enrique, que siempre ha estado incondicionalmente para mí. Gracias por la amistad y el amor sincero que siempre me has brindado. Has hecho de este trayecto un camino más ameno.

Gracias a Anayeli por brindarme tu amistad sincera desde los últimos semestres de la carrera, por acompañarme en cada meta importante en vida. Eres una gran amiga y un gran ser humano. A Brenda, por su alegre amistad, por siempre hacerme ver el lado positivo de las cosas. Niñas, les agradezco por inyectarme de ganas en los momentos donde tuve mucha desesperación ¡Gracias por la empatía!, ¡Las adoro!

A la Dra. Raquel Ugalde y al Dr. Luis Mora, por ser parte importante de mi formación académica, brindándome excelentes conocimientos y experiencias. Gracias por su apoyo para concluir este proyecto.

Al Dr. Fernando Suárez, por la oportunidad de tener mi primer acercamiento a la investigación con proyectos tan interesantes. Gracias por la confianza que depositó en mi durante mi larga estancia en la Unidad. Le agradezco la paciencia y disposición que tuvo para que este proyecto fuera completado.

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES.**

A mi casa de estudios la Universidad Nacional Autónoma de México, que me ha formado desde el nivel medio superior y hoy me permite concluir plenamente la licenciatura a través de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

A la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS por el espacio brindado para desarrollar este trabajo.

A la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero otorgado para este proyecto de investigación. Con clave de registro FIS/IMSS/PROT/GLC/1611.

# ÍNDICE

RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	2
MARCO TEÓRICO.....	4
OBESIDAD .....	4
OBESOS METABÓLICAMENTE SANOS .....	5
TEJIDO ADIPOSO.....	6
RESISTENCIA A LA INSULINA.....	9
DIABETES TIPO 2.....	9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN. ....	11
HIPÓTESIS .....	11
OBJETIVOS .....	12
GENERALES.....	12
ESPECÍFICOS.....	12
MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
DISEÑO DE ESTUDIO .....	13
TIPO DE ESTUDIO.....	13
UNIVERSO.....	13
VARIABLES Y GRUPOS DE ESTUDIO.....	14
TÉCNICAS O INSTRUMENTOS.....	15
PROCEDIMIENTO. ....	15
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	22
RESULTADOS .....	24
DISCUSIÓN .....	33
CONCLUSIONES.....	40
PERSPECTIVAS .....	41
REFERENCIAS.....	42
ANEXOS .....	49



**El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Médica Bioquímica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, bajo la dirección del Dr. Fernando Suárez Sánchez y como coacesores en la UNAM la Dra. Raquel Retana Ugalde y el Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara.**

## **A B R E V I A T U R A S**

<b>ACTB</b>	B-Actina
<b>ADAMTS9</b>	ADAM Metalopeptidasa de tromnospondina tipo 1M9.
<b>AKT</b>	Quimasa serina/treonina.
<b>ALT</b>	Alanina Aminotransferasa.
<b>AST</b>	Aspartato Transaminasa.
<b>CCL2</b>	Quimiocina activante de monocitos ligando 2.
<b>cDNA</b>	DNA complementario.
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico.
<b>DT2</b>	Diabetes Tipo 2.
<b>ECNT</b>	Enfermedades Crónicas No Transmisibles.
<b>ENASNUT-MC</b>	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino.
<b>GDC</b>	Control de DNA genómico.
<b>GRK5</b>	Receptor de Quinasas 5 acoplado a proteína G
<b>HbA1c</b>	Hemoglobina glicosilada.
<b>HDL</b>	Colesterol de Alta Densidad.
<b>HK</b>	Gen de Referencia "House Keeping"
<b>HP</b>	Haptoglobina

<b>HPRT1</b>	Hipoxantina Fosforibosiltransferasa 1
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adhesión intercelular 1
<b>ICC</b>	Índice Cintura Cadera.
<b>IL1B</b>	Interleucina 1 tipo $\beta$
<b>IL1R1</b>	Receptor de interleucina 1 tipo 1
<b>IMC</b>	Índice de Masa Corporal.
<b>INEGI</b>	Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
<b>IR</b>	Receptor a la Insulina.
<b>LDL</b>	Colesterol de Baja Densidad.
<b>LEPR</b>	Receptor de leptina
<b>MAPK/Ras</b>	Vía de las proteínas Quinasas Activadas por mitógenos.
<b>MHO</b>	Metabolically Healthy but Obese.
<b>NAMPT</b>	Nicotinamida Fosforibosiltransferasa.
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud.
<b>OMS</b>	Obesos Metabólicamente Sanos.
<b>PI3k</b>	Fosfoinositol 3-quinasa.
<b>PKB</b>	Proteína Quinasa B.
<b>PPC</b>	Control de PCR positivo.

<b>PSMD6</b>	Subunidad del proteasoma 26S, No ATPasa 6
<b>PTEN</b>	Homólogo de fosfatasa y tensina
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico.
<b>SIRT1</b>	Sirtuina 1
<b>TA</b>	Tejido Adiposo.
<b>TAB</b>	Tejido Adiposo Blanco.
<b>TAE</b>	Tris, Ácido acético y EDTA.
<b>TAP</b>	Tejido Adiposo Pardo.
<b>TAS</b>	Tejido Adiposo Subcutáneo.
<b>TAV</b>	Tejido Adiposo Visceral.
<b>TLR2</b>	Receptor tipo "toll" 2
<b>TLR4</b>	Receptor tipo "toll" 4
<b>TP53NP1</b>	Proteína nuclear inducible por p53.
<b>UCP-1</b>	Uncoupledprotein.
<b>VEGFA</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular A

## INDICE DE FIGURAS.

- Figura 1.** *Clasificación de la Obesidad según IMC.* **Pág. 4**
- Figura 2.** *Tipos de tejido adiposo.* **Pág. 8**
- Figura 3.** *Distribución de los genes empleados. Placa 96 pozos.* **Pág. 20**
- Figura 4.** *Gel de agarosa al 2% para evaluar la integridad de RNA total extraído.* **Pág. 26**
- Figura 5.** *Gel de agarosa al 2% para evaluar el tratamiento con DNAsa.* **Pág. 27**
- Figura 6.** *Curvas de amplificación obtenidas de una placa de 96 pozos.* **Pág. 28**
- Figura 7.** *Gráficos de la expresión relativa correspondientes a glucosa sérica.* **Pág. 32**

## ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** *Mezcla de reacción para la eliminación de DNA genómico a partir de las muestras de RNA extraído de tejido adiposo visceral.* **Pág. 18**
- Tabla 2.** *Condiciones de reacción para obtener cDNA a partir de las muestras de RNA de tejido adiposo visceral.* **Pág. 19**
- Tabla 3.** *Condiciones de PCR en tiempo real, empleadas con Step One Plus* **Pág. 22**
- Tabla 4.** *Características de la población de estudio.* **Pág. 24**
- Tabla 5.** *Genes que se encontraron correlacionados con glucosa sérica* **Pág. 30**
- Tabla 6.** *Genes que se encontraron correlacionados con hemoglobina glicosilada.* **Pág. 30**
- Tabla 7.** *Gene con diferencia significativa en la expresión relativa relacionada al diagnóstico de DT2.* **Pág. 32**
- Tabla 8.** *Descripción detallada de la placa de 96 pozos.* **Pág. 48**

## RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** La obesidad se caracteriza por una acumulación excesiva de tejido adiposo. Se ha considerado que el tejido adiposo funciona como una glándula endocrina que secreta moléculas implicadas en el control metabólico y también es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas no transmisibles. La desregulación génica en el tejido adiposo visceral (TAV), se asocia con resistencia a la insulina, desencadenando el padecimiento de diabetes tipo 2 (DT2).

**OBJETIVO:** Evaluar las diferencias en la expresión relativa de los genes correlacionados con glucosa y hemoglobina glicosilada entre los pacientes sin diabetes y con diabetes tipo 2.

**METODOLOGÍA:** Empleando TAV de pacientes de cirugía bariátrica, se hizo la extracción de RNA total para sintetizar cDNA y con este una se realizó un ensayo PCR en tiempo real. En el ensayo de PCR se evaluaron 44 genes de interés relacionados con obesidad y DT2. Para el análisis de datos se hicieron correlaciones entre las variables bioquímicas glucosa y hemoglobina glicosilada con los datos de amplificación de cada muestra. Con los genes que resultaron significativos se calcularon las diferencias de la expresión relativa entre los grupos de estudio con la metodología de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . La población total fue dividida en base al diagnóstico de DT2 que cada paciente tenía.

**RESULTADOS:** Los genes que se encontraron correlacionados con glucosa y hemoglobina glicosilada fueron: *VEGFA*, *IL1R1*, *PSMD6*, *PTEN*, *TLR4*, *TLR2*, *SIRT1*, *LEPR*, *NAMPT*, *CCL2*, *ADAMTS9*, *GRK5*, *TP53INP1*, *IL1B*, *HP* e *ICAM*. El único gen que mostro diferencias significativas entre los grupos de estudio fue *SIRT1*.

**CONCLUSIONES:** Únicamente se encontró diferencias significativas entre los grupos de estudio en el gen *SIRT1*. Observando una disminución en la expresión del grupo que presentaban diagnóstico de DT2.

**PALABRAS CLAVE:** obesidad, tejido adiposo, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad la obesidad es uno de los problemas de salud pública más alarmantes a nivel mundial. En nuestro país sus complicaciones representan las principales causas de muerte (1). Este síndrome se caracteriza por el aumento de peso corporal relacionado con incremento del tejido adiposo, causado principalmente por un desequilibrio energético (2). Este padecimiento se asocia con una inflamación de bajo grado favoreciendo el desarrollo de resistencia a la insulina (RI) y una mala señalización de moléculas que impiden la correcta translocación de los transportadores de glucosa a la membrana (3).

La alimentación tiene un papel muy importante para el desarrollo y progresión de esta patología (2). Hoy en día la mayoría de las dietas está basada en grandes cantidades de grasas saturadas, carbohidratos y aditivos, ocasionando una inflamación de bajo grado, aumentando el riesgo de desarrollar resistencia a la insulina (4).

El presentar resistencia a la insulina se encuentra asociado con el padecimiento de diabetes tipo 2 (DT2) (5). Actualmente la diabetes es una de las enfermedades crónicas degenerativas que se ha convertido en la epidemia del siglo XXI (6), según proyecciones de la Organización Mundial de la Salud se estima que para el 2030, la diabetes será la séptima causa de mortalidad en el mundo (7).

La diabetes es una enfermedad originada cuando la insulina producida por el páncreas no es suficiente, o el organismo no la utiliza adecuadamente. Esto provoca altas concentraciones de glucosa en sangre y ocasionando graves alteraciones en todo el organismo, como: neuropatías, retinopatías, nefropatías etc. (7).



La DT2 se considera una enfermedad de origen multifactorial, en donde un gran aumento del tejido adiposo se encuentra relacionado con esta patología. El tejido graso es considerado un tejido endocrino metabólicamente activo, debido a su relación con sistemas energéticos, metabolismo de lípidos y glucosa, regulación de algunas funciones hormonales y su relación con moléculas en procesos inflamatorios (3). Determinar los genes en este tejido que estén relacionados con la concentración sérica de glucosa, y/o el diagnóstico de DT2 resulta importante para poder comprender la participación del tejido adiposo (TA) en el desarrollo de DT2.

## MARCO TEÓRICO.

### OBESIDAD

La obesidad es un padecimiento crónico que se origina cuando la ingesta energética diaria es mayor a la gastada, reflejando una acumulación de tejido graso y con ello un aumento de peso. El aumento alarmante de casos que se han presentado a través de los años, da lugar a catalogarlo como una epidemia (8).

La organización mundial de la salud (OMS) define al sobrepeso y a la obesidad como una acumulación anormal o excesiva de grasa, y en adultos es clasificada en referencia al índice de masa corporal (IMC), el cual se obtiene tras dividir el peso (kg) entre la estatura al cuadrado ( $m^2$ ). Un IMC igual o mayor a  $25 \text{ kg/m}^2$  se considera sobrepeso, mientras que un IMC superior o igual a  $30 \text{ kg/m}^2$  es obesidad. A su vez la obesidad está clasificada en 3 clases en relación al IMC presentado (9).

Clasificación	IMC ( $\text{kg/m}^2$ )	Riesgo Asociado a la salud
Normo Peso	18.5 – 24.9	Promedio
Exceso de Peso	$\geq 25$	
Sobrepeso o Pre Obeso	25 - 29.9	AUMENTADO
Obesidad Grado I o moderada	30 – 34.9	AUMENTO MODERADO
Obesidad Grado II o severa	35 - 39.9	AUMENTO SEVERO
Obesidad Grado III o mórbida	$\geq 40$	AUMENTO MUY SEVERO

**Figura 1.** Clasificación de la Obesidad según IMC. (2)

Entre 1975 y 2016 la prevalencia mundial de la obesidad se había triplicado (10). Para el 2016 más de 1900 millones de adultos presentaban sobrepeso, de los cuales, más de 650 millones eran obesos.

En 2017 referente al informe emitido por la OMS, México cuenta con la mayor tasa de adultos obesos en América Latina. La tasa de obesidad de adultos en México es de 28.9% de la población, seguido por Argentina (28.3%), Chile (28%) y República Dominicana (27.9%) (11).

Según la encuesta nacional de salud y nutrición de medio camino 2016 (ENASNUT-MC 2016) los datos de prevalencia de sobrepeso y obesidad en adultos mayores a 20 años es del 72.5%, aumentando 1.3 puntos en referencia a los datos recabados del 2012, teniendo un mayor porcentaje de mujeres que de hombres (12).

La obesidad está relacionada con el riesgo de padecer enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), reduciendo la calidad de vida y aumentando la mortalidad a temprana edad (13). Las enfermedades y complicaciones que se encuentran asociadas a pacientes con obesidad mórbida son; cardiopatía isquémica, insuficiencia cardíaca, hipertensión arterial, enfermedades cerebrovasculares, diabetes tipo 2, hiperlipidemias, alteraciones menstruales, osteoartrosis, síndrome de apnea del sueño, y de hipoventilación alveolar (14).

### *OBESOS METABÓLICAMENTE SANOS*

La obesidad está considerada como factor de riesgo importante para padecer o desarrollar enfermedades crónicas no transmisibles cuando el valor del índice de masa corporal (IMC) es mayor a 30 kg/m<sup>2</sup>. ¿Pero qué sucede con las personas que se encuentra en la clasificación de “obesos” y no presenta alteraciones metabólicas? Se calcula que aproximadamente entre un 10 y 20% no tienen alteraciones metabólicas como resistencia a la insulina, hipertensión o algún factor de riesgo cardiovascular (15).

Existen varias definiciones sobre las personas obesas metabólicamente “sanas”: Obesos metabólicamente sanos (OMS) o el termino anglosajón “Metabolically healthy but obese” (MHO). También existen definiciones respecto a la resistencia a la insulina, insulinosensible es el individuo obeso sano mientras que el insulinoresistente es el considerado patológico (16).

La definición de obesidad está relacionada con el aumento de tejido adiposo, pero la diferencia entre un obeso “sano” y uno “patológico” reside en la manera en la que este se acumula. El paciente sano puede acumular tejido adiposo subcutáneo incrementando este a medida que lo necesite, mientras que el individuo patológico lo acumula en tejido adiposo visceral y ectópico causando daño en órganos y generando las consecuencias relacionadas con la obesidad: dislipidemias, diabetes, hipertensión (16).

### *TEJIDO ADIPOSO*

El tejido adiposo (TA) hasta los años ochenta había sido considerado únicamente como reservorio de energía (17). Pero a medida que ha existido más evidencia de este tejido, se considera como un tejido endocrino complejo metabólicamente muy activo (3). Esto debido a la regulación de la función de diversos ejes endocrinos y al papel importante que cumplen estas células en el metabolismo en general (17).

El TA secreta sustancias bioactivas denominadas adipocinas (17). Estas están encargadas de sintetizar proteínas con estado paracrino, endocrino y autocrino, y que además controlan diversas funciones metabólicas (18).

De forma general, las adipocinas intervienen en las funciones de otros órganos y tejidos, regulando la secreción de hormonas y participan en procesos como la regulación térmica, la homeostasis del metabolismo de carbohidratos y lípidos. Y además se consideran protagonistas en el complejo proceso de la obesidad y el síndrome metabólico (17).

Existen dos tipos de TA, el tejido adiposo blanco (TAB) y el tejido adiposo pardo (TAP) (17). Ambos tienen funciones completamente distintas (18). En los seres humanos el TAB está disperso en todo el organismo. Las células de este tejido son grandes, los adipocitos miden entre 30 a 70  $\mu\text{m}$ , son esféricos y contienen una única gota lipídica (TAG) (19). Este tejido se encuentra dividido en tejido visceral y subcutáneo (20). A nivel visceral se encuentra la mayor proporción de este tejido, alrededor del omento (omental), del intestino (mesentérico) y de las áreas perirrenales (retroperitoneal). A nivel subcutáneo la grasa se localiza sobre todo a nivel de glúteos, muslos y abdomen (21).

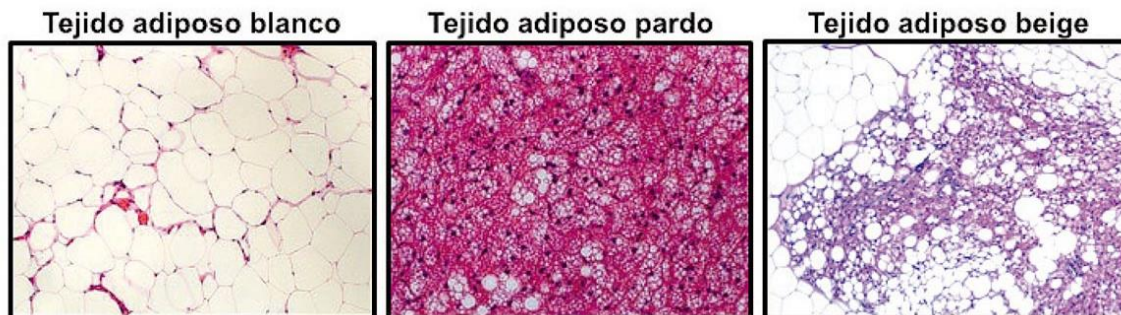
Actualmente se sabe que las diversas localizaciones del TAB tienen características metabólicas y endocrinas diferentes (21). Por ejemplo, se ha reportado, que los adipocitos que forman parte del tejido adiposo visceral (TAV) tienen una mejor capacidad de captación de glucosa que los que se encuentran a nivel subcutáneo (TAS) (20).

Por otra parte, el tejido adiposo pardo (TAP) es de menor tamaño, sus adipocitos miden entre 20 y 40  $\mu\text{m}$  y no son esféricos. De igual forma que los adipocitos del TAB, estos almacenan triacilgliceroles, pero en varias gotas lipídicas y sus células contienen mayor número de mitocondrias (19). Este tejido en humanos es muy

abundante en fetos y recién nacidos, disminuye de forma gradual hacia la vida adulta. Su principal función es la termogénesis y se caracteriza por expresar las proteínas desacoplantes 1 “Uncoupling protein 1 “(UCP-1) (17).

Debido a la función, localización y diferencias de ambos tejidos (TAB y TAP), se han encontrado mayor relación positiva con el riesgo desarrollar resistencia a la insulina cuando el TAB, se encuentra en mayor abundancia (22).

Por otra parte, existe evidencia que el tejido adiposo blanco frente a ciertos estímulos (el frío, ejercicio físico, determinados estímulos nutricionales, como una sobre ingesta crónica) puede diferenciarse a otro tipo de tejido adiposo llamado beige. Este presenta características muy similares al pardo. Cuando estos estímulos desaparecen, el tejido adiposo beige se transforma nuevamente en blanco (23). Este fenómeno tiene gran relevancia clínica, estudios llevados a cabo en roedores demuestran que la actividad de estos adipocitos, también se asocia con obesidad y alteraciones metabólicas (24).



**Figura 2.** Tipos de tejido adiposo. (24)

## *RESISTENCIA A LA INSULINA*

Se define como resistencia a la insulina a la capacidad disminuida de esta hormona (insulina) para llevar a cabo sus funciones fisiológicas normales, suele estar relacionada con patologías como la diabetes tipo 2 (DT2). Inicialmente se generan mecanismos compensatorios en donde se secretan grandes cantidades de insulina, permitiendo mantener los niveles de glucosa sanguíneos dentro de los valores normales. A la larga este mecanismo se deteriora progresivamente hasta llegar al fallo pancreático y ocasionar DT2 (25).

## *DIABETES TIPO 2*

La DT2, es el trastorno endocrino más común en el ser humano (5). Es una enfermedad crónico-degenerativa, caracterizada por presentar resistencia a la insulina, y/o una deficiencia relativa de esta hormona en el organismo. Esto evita que las células respondan al estímulo con insulina o dejen de hacerlo adecuadamente (26) repercutiendo en la concentración sérica de glucosa en los individuos.

El 90 % de los casos presentados de diabetes tipo 2, en México son atribuibles al sobrepeso y la obesidad (13). Esta enfermedad se encuentra dentro de las primeras tres causas de muerte en el país. Según datos arrojados por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) ocupó el segundo lugar con un 15.4% en el 2016 (27).

Los datos reportados en la ENSANUT-MC 2016, demuestran el aumento de la prevalencia que presenta esta enfermedad en México. El porcentaje reportado en

2016 fue de 9.4%, observando un ligero aumento con respecto a la ENSANUT 2012 (9.2%) y un mayor aumento respecto a los datos de 2006 (7%) (12).

Se sabe que la resistencia a la insulina es un rasgo característico de la disfunción metabólica inducida principalmente por la obesidad (5). Esta resistencia se presenta por una anomalía en la cascada de señalización (25).

La acción de la insulina esta mediada por la unión a receptores específicos localizados en la membrana celular. El receptor a la insulina (IR), está compuesto por dos subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$  unidas por puentes disulfuro (28). Cuando este receptor se activa por la unión a la insulina, comienza su cascada señalización. Existen principalmente dos vías: la vía de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K)/Akt también llamada proteína cinasa B (PKB), responsable de la mayoría de sus acciones metabólicas, y la vía de las cinasas activadas por mitógeno/Ras (MAPK/Ras), que regula la expresión genética y los efectos mitogénicos asociados a la insulina(5).

Se sabe que la resistencia a la insulina es causada principalmente por el aumento desmedido del tejido adiposo. A su vez, este aumento de TA se encuentra relacionado con inflamación crónica de bajo grado. Se ha relacionado la vía de NF- $\kappa\beta$  como una vía importante para la resistencia a la insulina asociada a la inflamación. Existen tratamientos que inhiben la activación de NF- $\kappa\beta$ , en donde su inhibición mejora la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina (29).



## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.**

Hoy en día la obesidad es una patología común en el ser humano, que ha ido aumentando y persistiendo a través del tiempo por factores genéticos y ambientales. Esta patología conlleva a desarrollar síndrome metabólico, resistencia a la insulina y patologías como la diabetes tipo 2. Debido a que el aumento del tejido adiposo es característico de la obesidad y este se caracteriza por ser un tejido endocrino y metabólicamente activo. El presente trabajo se planteó las siguientes preguntas de investigación.

- ✓ ¿Qué genes expresados en el tejido adiposo visceral están correlacionados con la concentración de glucosa sérica?
- ✓ ¿Existen diferencias en la expresión de estos genes entre pacientes con y sin el diagnóstico de diabetes tipo 2?

## **HIPÓTESIS**

Debido a que el tejido graso es un tejido altamente activo relacionado con el desarrollo de obesidad y diabetes, se espera encontrar diferencias en la expresión relativa de genes involucrados con el metabolismo de glucosa, entre pacientes obesos con diagnóstico de diabetes tipo 2, comparado con los pacientes que no presenten esta patología.

## OBJETIVOS

### GENERALES

- ✓ Evaluar en tejido adiposo visceral de pacientes obesos la expresión de genes asociados con obesidad y diabetes, y su correlación con valores séricos de glucosa y hemoglobina glicosilada.
- ✓ Evaluar las diferencias en la expresión relativa de los genes correlacionados entre los pacientes sin diabetes y con diabetes tipo 2.

### ESPECÍFICOS

- ✓ Extracción de RNA total a partir de tejido adiposo visceral.
- ✓ Síntesis de cDNA a partir del RNA total extraído.
- ✓ Cuantificar la expresión de los genes en tejido adiposo visceral.
- ✓ Análisis estadístico para identificar los genes con diferencias significativas de la expresión relativa entre los grupos de estudio.

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

### *DISEÑO DE ESTUDIO*

Casos y controles (comparativo).

### *TIPO DE ESTUDIO.*

Estudio observacional, analítico y transversal.

### *UNIVERSO*

Los participantes del estudio fueron reclutados en la “Clínica de Diabetes y Obesidad” perteneciente al Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda” del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Dichos pacientes estaban programados para ser sometidos a una cirugía bariátrica en dicha institución.

Los pacientes interesados a ser parte del protocolo recibieron una explicación del objetivo y justificación del trabajo de investigación. Todos los pacientes que aceptaron participar firmaron un consentimiento informado previo a cualquier toma de muestra o recolección de datos.

### *Criterios de inclusión.*

- ✓ Pacientes adultos de entre 35 y 55 años de sexo indistinto con un índice de masa corporal mayor o igual a 35.

### *Criterios de exclusión.*

- ✓ Participantes que presentaran signos, síntomas y parámetros bioquímicos involucrados a enfermedad renal (creatinina alta, diálisis, etc.) o hepática (crecimiento del abdomen, dolor, ictericia, transaminasas elevadas).
- ✓ Signos clínicos de infección.

## *VARIABLES Y GRUPOS DE ESTUDIO*

### **VARIABLES**

- A. Expresión génica.
- B. Niveles séricos de glucosa.
- C. Valor de Hemoglobina glicosilada.
- D. Diagnóstico de diabetes tipo 2.

### **GRUPOS DE ESTUDIO**

**I, control:** Participantes con un IMC  $\geq 35$ ; sin el diagnóstico de diabetes tipo dos.

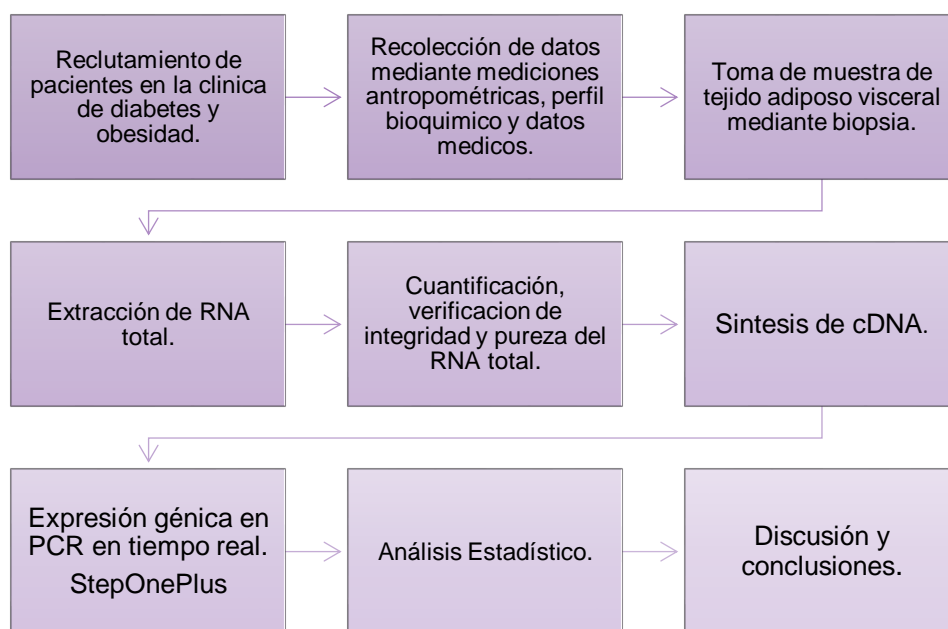
**II, casos:** Participantes con un IMC  $\geq 35$ ; con el diagnóstico de diabetes tipo dos.

## TÉCNICAS O INSTRUMENTOS.

ACTIVIDAD	TÉCNICA O INSTRUMENTO
- RECOLECCIÓN DE DATOS.	Aplicación de cuestionarios y mediciones.
- EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL.	Método fenol/tiocianato de guanidina (TRIPURE) con Homogenizador POLYTRON PT 1200 CL de Kinematica AG, Lucerna, Suiza.
- SÍNTESIS DE cDNA A PARTIR DE RNA TOTAL	Transcripción inversa Kit “SuperScript™ III Reverse Transcriptase” de Invitrogen™, Carlsbad, California, EUA.
- PCR EN TIEMPO REAL.	Kit “Custom RT2 Profiler PCR Arrays” de Qiagen N.V, Hilden Alemania Instrumento Step One Plus de Life Technologies, Carlsbad, California, EUA.

## PROCEDIMIENTO.

### ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO.



## *MEDICIONES ANTROPOMÉTRICAS Y PARÁMETROS BIOQUÍMICOS.*

Una vez firmado el consentimiento informado, se tomaron medidas antropométricas (peso, talla, circunferencia de cintura y cadera) y con estos datos se hizo el cálculo para el Índice de Cintura y Cadera (ICC) e Índice de Masa Corporal (IMC). Se realizó la medición de presión arterial y se recabaron datos como el género, edad y el esquema de tratamiento farmacológico empleado en el caso de los participantes que indicaran el padecimiento de alguna patología (DT2, dislipidemias, etc.)

Se tomaron muestras de sangre para la determinación de glucosa, insulina, hemoglobina glicosilada, colesterol total, colesterol de alta densidad (HDL), colesterol de baja densidad (LDL), triglicéridos, urea, creatinina y transaminasas hepáticas.

## *MUESTRAS DE TEJIDO ADIPOSO*

Se realizó la toma de tejido adiposo visceral, mediante una biopsia (omento, aproximadamente 1-2 g) durante la cirugía bariátrica que tenían programada los pacientes. La grasa visceral se tomó del omento mayor bajo visión directa con su correspondiente hemostasia. Al tejido extraído le fue adicionado una solución de RNA*later* y almacenado posteriormente a -70°C.

## *EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL A PARTIR DE TEJIDO ADIPOSO.*

Las muestras proporcionadas se homogenizaron con 500µL de TRIPURE utilizando el POLYTRON PT 1200 CL (Kinematica AG, Lucerna, Suiza) para facilitar la homogenización del Tejido Adiposo (TA). Se emplearon 3 ciclos de 1 minuto de

homogenizando y 1 minuto dejando reposar en hielo. A las muestras homogenizadas se les agregó 500µL de TRIPURE más para completar un volumen de 1000µL, se centrifugó a 12000xg a 4°C durante 15 minutos.

Se tomó la fase acuosa y se transfirió a un tubo nuevo Eppendorf. Se adicionaron 200µL de cloroformo, se homogenizó con ayuda de un vortex por 30 segundos, para posteriormente incubar por 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugar a 12000xg a 4°C por 15 minutos.

Se separó la fase acuosa y se midió el volumen extraído para agregar la misma cantidad de isopropanol, con el fin de mantener una relación 1:1. Se homogenizó por inversión durante 1 minuto y se incubó por 1 hora a -70°C. Transcurrido el periodo de incubación se dejaron descongelar las muestras a temperatura ambiente, para centrifugarlas a 12000xg a 4°C por 15 minutos y decantar el sobrenadante.

Se agregó 1 mL de etanol al 75% y se homogenizó mediante un vortex, se centrifugó a 10000xg a 4°C por 10 minutos para decantar el sobrenadante y dejar secar invertido a temperatura ambiente por 10 minutos. Se resuspendió el pellet en 100µL de agua DEPC, y se adicionaron 500µL de TRIPURE y 100µl de cloroformo para homogenizar en vortex por 15 segundos. Las muestras fueron incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente, y centrifugadas a 12000xg a 4°C por 15 minutos. La fase acuosa fue transferida a otro tubo midiendo el volumen para adicionar la misma cantidad de isopropanol, enseguida se agregaron 10 µL de acetato de sodio y se incubó a -70°C por una noche.

Las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente y centrifugadas a 12000 xg a 4°C por 15 minutos. Se decantó el sobrenadante y se adicionó 1 mL de etanol al 75%, para homogenizar en vortex por 15 segundos y centrifugar a 10000xg a 4°C por 10 minutos, el lavado con etanol se repitió 2 veces más. Cuando se decantó el último lavado, se dejó secar el pellet durante 20 minutos a temperatura ambiente, para finalmente resuspender en 15 µL de agua DEPC y guardar hasta su uso a -70°C.

Se cuantificó la concentración de las muestras, y se observó su pureza con la relación 260/280 y 260/230 para descartar contaminación por trazas de proteínas o fenol. La integridad del RNA extraído fue determinada a partir de una electroforesis utilizando gel de agarosa al 2%.

#### *TRATAMIENTO CON DNasa EN MUESTRAS DE RNA TOTAL*

Se adicionaron los siguientes reactivos en un tubo Eppendorf de 0.2mL libres de RNasas:

**Tabla 1.** Mezcla de reacción para la eliminación de DNA genómico a partir de las muestras de RNA extraído de tejido adiposo visceral.

REACTIVO	CANTIDAD
RNA	1 µg
10X BUFFER DE REACCIÓN CON MgCl <sub>2</sub>	1 µL
DNasa I, LIBRE DE RNasas	1 µL (U)
AGUA DEPC	Lo necesario para completar 10 µL



Se incubaron las muestras a 37 °C por 30 minutos, después del tiempo transcurrido, se adicionó 1 µL de EDTA 50 mM y se incubó a 65 °C por 10 minutos. Este RNA fue utilizado como base para la retrotranscripción (cDNA).

### *SÍNTESIS DE cDNA*

Se preparó la mezcla de reacción en hielo, adicionando 2 µL de buffer 10X RT, 0.8 µL de dNTP 25X, 2 µL de primers RT 10X, 1 µL de transcriptasa reversa (RT) y 4.2 µL de agua libre de nucleasas por muestra. Se empleó el Kit “SuperScript™ III Reverse Transcriptase “(Invitrogen™, Carlsbad, California, EUA.)

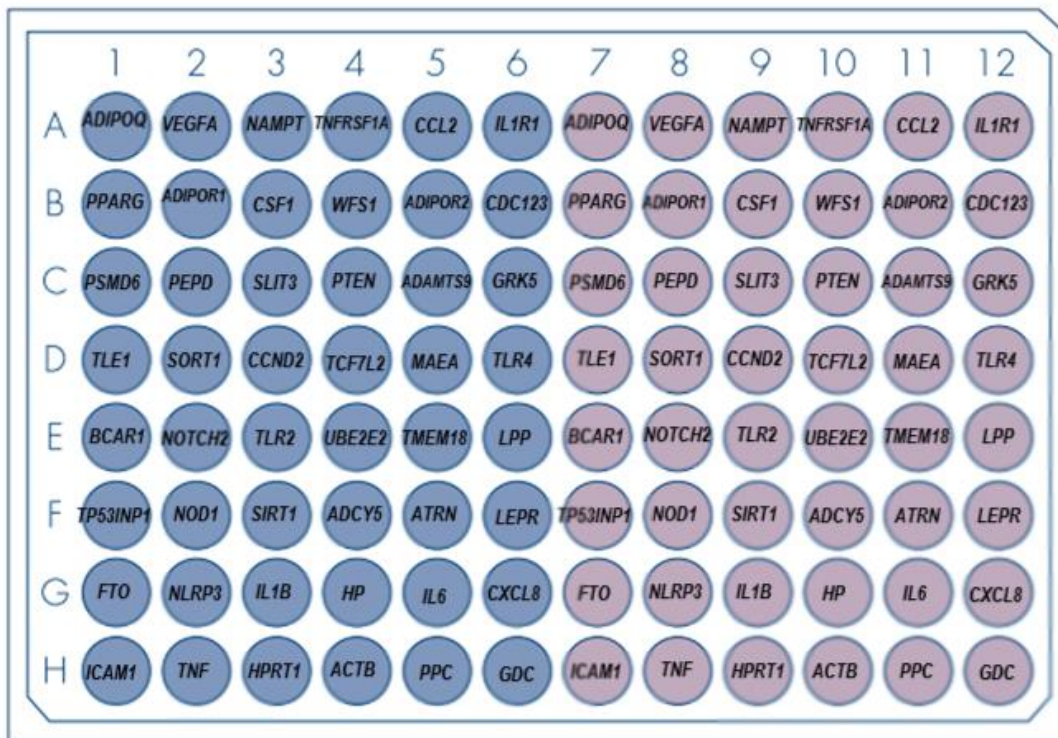
Posteriormente, se agregó en un tubo nuevo 10 µL de 2X RT master mix y 10 µL del RNA tratado con DNasa y se resuspendió la mezcla mediante pipeteo suave. La mezcla fue centrifugada brevemente para eliminar burbujas, se colocó el tubo en hielo y se programó el termociclador con las siguientes condiciones:

**Tabla 2.** Condiciones de reacción para obtener cDNA a partir de las muestras de RNA de tejido adiposo visceral.

	<b>PASO 1</b>	<b>PASO 2</b>	<b>PASO 3</b>	<b>PASO 4</b>
<b>TEMPERATURA (°C)</b>	25	37	85	4
<b>TIEMPO (MIN)</b>	10	120	5	∞

### PCR EN TIEMPO REAL – DISEÑO DE LA PLACA.

Para evaluar la expresión de las muestras de cDNA sintetizadas se realizó una reacción de PCR en tiempo real empleando placas de 96 pozos. Cada pozo tenía previamente cargado los pares de oligonucleótidos (sentido y antisentido). Por cada muestra, se determinó la expresión de 44 genes de interés, 2 genes de referencia o HouseKeeping (*HPRT1* y *ACTB*) y 2 controles de calidad (PPC y GDC). Cada placa fue diseñada para amplificar dos muestras, correspondiendo 48 pozos para cada una. Los genes de interés fueron seleccionados por su relación y prevalencia en obesidad y diabetes tipo 2 (DT2) (30). La distribución de los genes en la placa se muestra en la Figura 3, en donde están indicado con la letra y número el pozo correspondiente a cada gen. Los diseños de las placas fueron en base a los arreglos y distribución de “Custom RT2 Profiler PCR Arrays “(Quiagen N.V, Hilden Alemania).



**Figura 3.** Distribución de los genes. Placa de 96 pozos.

Los genes empleados como referencia o calibradores fueron *HPRT1* y *ACTB*. El primero corresponde a un gen que codifica a una proteína relacionada al reciclaje de purinas y el segundo a la proteína actina.

Los dos pozos referentes a los controles de calidad de cada placa corresponden a *PPC* y *GDC*. Su función se describe a continuación:

- *PPC*. Este control se usa para evaluar la eficiencia de cada reacción, y contenía una muestra de DNA precargada para asegurar su amplificación y la reproducibilidad del ensayo.
- *GDC*. Permite detectar alguna contaminación de DNA genómico presente en las muestras de cDNA.

Para realizar las reacciones de amplificación de las placas para cada muestra se realizó la siguiente mezcla en un tubo estéril y libre de DNAsas de 1.5 mL: 675 $\mu$ L de RT<sup>2</sup> SYBR Green qPCR Mastermix (Quiagen N.V, Hilden Alemania), 624 $\mu$ L de agua y 51 $\mu$ L de la muestra de cDNA. Este cDNA empleado se preparó previamente a partir de 1 $\mu$ g de cDNA sintetizado, resuspendido en 55.5 $\mu$ L de agua.

De la mezcla inicial, se agregaron 25 $\mu$ L a cada pozo, de tal forma que por pozo se tenían 17.02 ng de cDNA presentes para llevar a cabo la reacción deseada. La placa se selló y se centrifugó brevemente. Las reacciones fueron amplificadas en el equipo Step One Plus (Life Technologies, Carlsbad, California, EUA.) bajo las condiciones de reacción descritas en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Condiciones de PCR en tiempo real, empleadas con Step One Plus (Life Technologies, Carlsbad, California, EUA.)

ETAPA	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (MM:SS)
ACTIVACIÓN	95	10:00
PCR	40	CICLOS
DESNATURALIZACIÓN	95	00:15
ALINEACIÓN	60	01:00

Después de que haber concluido los 40 ciclos de amplificación, se programó una curva de disociación como última etapa del ensayo, esto para comprobar la especificidad de los ensayos realizados. Esta curva fue programada en 3 etapas, iniciando en 95°C por 15 segundos, después 60°C durante 1 minuto y al finalizar se incrementó 1°C cada 30 segundos hasta alcanzar 95°C permaneciendo 15 segundos en esta última temperatura.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Con los datos recabados del ensayo de PCR en tiempo real y empleando el software Applied Biosystems StepOnePlus™ 2.2.3, se obtuvieron los  $C_t$  correspondientes a cada gen. Se realizó la normalización de los datos obtenidos con los 2 genes de referencia (HK) destinados en la placa. Estos fueron *ACTB*, que codifica a la proteína actina y *HPTR1* que codifica a una proteína relacionada al reciclaje de purinas. Con los datos de  $C_t$  normalizados se realizaron correlaciones de las

variables bioquímicas y antropométricas con los 44 genes de interés utilizando el software STATA13 (StataCorp, Texas, EUA.). Los genes que mantuvieron una correlación con las variables bioquímicas glucosa y hemoglobina glicosilada fueron elegidos para determinar diferencias en la expresión relativa entre los grupos de estudio. La metodología empleada fue el cálculo de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Esta operación nos arroja la medida en la que aumenta o disminuye el gen de interés respecto al grupo control. Para determinar las diferencias significativas entre los grupos de estudio se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney empleando los softwares GraphPad-Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego California, EUA.) y SPSS 25 (IBM Corporation, New York, EUA.).

## RESULTADOS

Se emplearon 32 muestras de las cuales 25 fueron mujeres y 7 hombres con una edad promedio de 43 años. La Tabla 4 muestra los datos antropométricos (edad, peso, talla, índice de masa corporal, cintura, cadera e índice de cintura-cadera), parámetros bioquímicos (glucosa, triglicéridos, colesterol total, HDL, LDL, insulina, hemoglobina glicosilada) recabados de la población estudiada. Algunas variables antropométricas y bioquímicas fueron calculadas en base a los datos obtenidos (Índice de masa corporal, Índice cintura cadera, valor HOMA-IR y la relación AST/ALT).

**Tabla 4.** Características de la población de estudio. Los datos se representan como Mediana [Q1-Q3]. \* IMC (índice de masa corporal), ICC (índice cintura cadera).

GLUCOSA SÉRICA ( Mediana [IQR] y p)					
Parámetros	Población total N=32	Pacientes sin diabetes N=9	Pacientes con diabetes N=23	p	Valores de referencia
<b>Variables antropométricas</b>					
Edad	46.5 [36-50.5]	47 [35-50]	46 [36-51]	0.9665	
Peso (Kg)	107.5 [100-122.5]	106 [100-116]	112 [97.5-123]	0.7691	
Talla (m)	1.58 [1.54-1.69]	1.56 [1.50-1.63]	1.63 [156-1.7]	0.0924	
IMC ( $Kg/m^2$ )	43.15 [38.63-47.08]	45.77 [41.09-47.66]	42.21 [38.62-45.43]	0.3902	
Cintura (cm)	118 [114-126]	121 [114-124]	118 [109-130]	0.8959	
Cadera (cm)	139 [124-142]	140.5 [132-143]	135 [123-140]	0.3598	
ICC	0.88 [0.85-0.93]	0.87 [0.85-0.92]	0.90[0.86-0.93]	0.6015	
<b>Variables bioquímicas</b>					
Glucosa en sangre (mg/dL)	93 [87-123.5]	88 [85-96]	99 [88-132]	0.1476	70-100 mg/dL
HOMA-IR	3.26 [2.50-9.32]	2.66 [2.40-.3.20]	6.44 [2.89-10.31]	<b>0.0464*</b>	< 2.6
HbA1c(%)	5.8 [5.2-6.3]	5.75 [5.3-6.2]	5.8 [5.2-6.3]	0.7597	< 5.7%
Insulina( $\mu$ U/ml)	14.79 [11.22-31.54]	12.72 [9.73-14.45]	24.18 [13.33-33.84]	0.0599	2-15( $\mu$ U/ml)
Colesterol total(mg/dL)	162 [140-184]	182 [167-193]	154 [127-177]	<b>0.0343*</b>	< 200mg/dL
HDL(mg/dL)	42 [31-50]	46.5 [37-53]	41 [31-44]	0.3923	> 40 mg/dL
LDL(mg/dL)	98 [81-114]	111.5 [92-128]	90 [72-109]	0.1072	< 100 mg/dL
Triglicéridos (mg/dL)	111.5 [84.5-152.5]	108 [97-129]	112 [82-156]	0.9833	< 150mg/dL
AST	22 [19-31]	22 [18-25]	23.5 [20-37]	0.2951	7 – 38 UI/L
ALT	24 [19-44]	22 [19-37]	25 [19-48]	0.5854	7- 39 UI/L
AST/ALT	0.89 [0.74-1.14]	0.89 [0.70-1]	0.88 [0.79-1.14]	0.4971	< 1

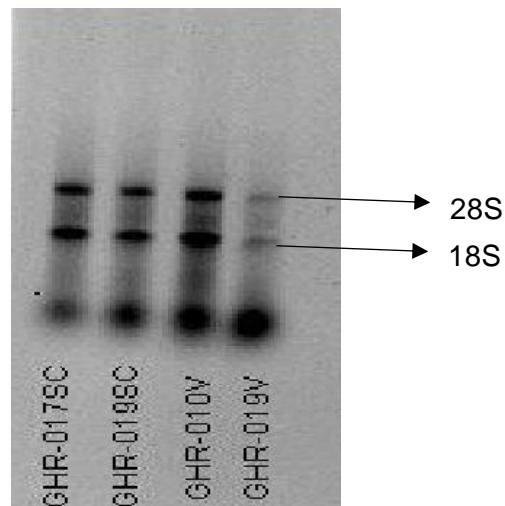
La población total fue dividida en dos grupos de estudio en base a los datos de diagnóstico de diabetes tipo dos proporcionados por la “Clínica de Diabetes y Obesidad” perteneciente al Hospital de Especialidades. Si los participantes no padecían DT2, o si los pacientes si padecían esta patología.

Se realizó la prueba de rangos con signo de Wilcoxon para comparar los datos antropométricos y bioquímicos recabados de los de dos grupos de estudios mediante el Software STATA 13 (StataCorp, Texas, EUA.). Los resultados se muestran en la Tabla 4. Las variables que obtuvieron una diferencia significativa entre ambos grupos ( $p \leq 0.05$ ), fueron la concentración sérica de Colesterol Total y el índice HOMA-IR, el cual hace referencia a la resistencia a insulina.

El valor de la mediana del índice HOMA-IR para el grupo control fue de 2.66, mientras que el grupo de casos fue de 6.44. El valor el índice HOMA-IR en el grupo de los pacientes diabéticos se encontraba superior al valor de referencia (<2.6) (31). El significado o utilidad del índice HOMA-IR es para evaluar la resistencia a la insulina, por lo tanto, el valor de la mediana en el grupo perteneciente a los pacientes diabéticos arroja un resultado correlacionado hacia esta patología (DT2).

Mediante la biopsia de tejido adiposo realizada, se extrajo satisfactoriamente el RNA de las 32 muestras seleccionadas para el estudio. Se verificó la pureza del RNA extraído mediante las relaciones 260/280 y 260/230. El valor de la relación 260/280 estaban dentro del valor esperado; superiores a 1.8, esto significa que no había contaminación por proteínas. El índice 260/230 se encontraba superior a 2.0, descartando de esta forma una contaminación por trazas de fenol o sales pertenecientes al proceso de extracción.

Para evaluar la integridad del RNA, se realizó un gel de agarosa al 2% (Figura 4). En donde se observan las 2 subunidades características de 28S y 18S. También se observa que no hay contaminación de DNA genómico y que el material de RNA obtenido no se encuentra degradado.

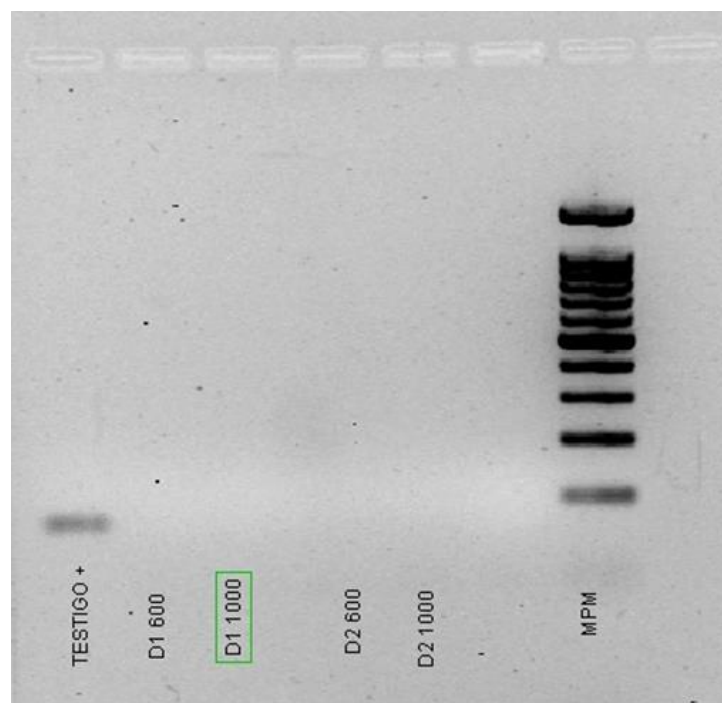


**Figura 4.** Gel de agarosa al 2% para observar el RNA extraído del tejido adiposo visceral. Se observan las dos subunidades características del RNA en forma de bandas (18s y 28s) y no se visualiza presencia de DNA genómico.

Se realizó un tratamiento con DNasa para eliminar posibles residuos de DNA que no fueron visibles en el gel de agarosa. Se corroboró mediante una PCR en punto final, que el tratamiento con DNasa hubiera eliminado trazas de DNA contaminante. El resultado de la reacción fue evaluado con un gel de agarosa al 2% corrido a 80V por 1 hora en una cámara de electroforesis, con TAE 1X como solución buffer, 3 $\mu$ L de SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen™, Carlsbad, California, EUA) para

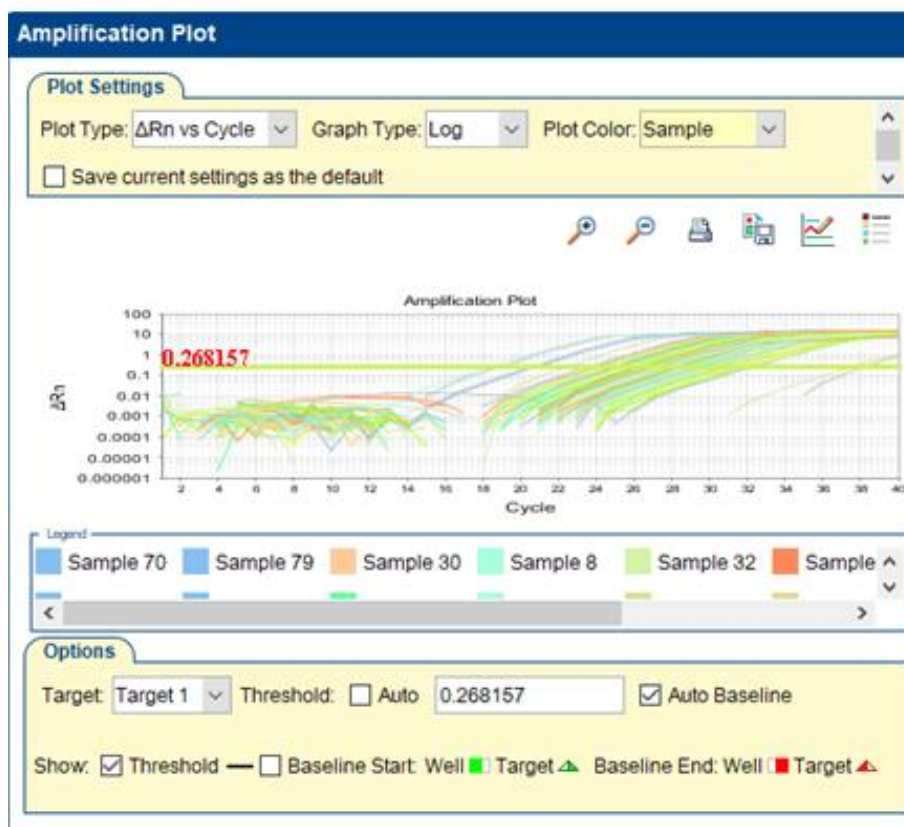


visualizar alguna amplificación y un marcador de peso molecular de 100 bp DNA Ladder (Invitrogen™, Carlsbad, California, EUA). No se observó ninguna amplificación, esto porque las muestras obtenidas de RNA no tenían trazas de DNA genómico, y por lo tanto no hubo amplificación con los oligonucleótidos específicos para DNA empleados (Figura 5).



**Figura 5.** Gel de agarosa al 2% para observar el resultado del tratamiento con DNasa. El testigo positivo para DNA fue el gen *PGK1* (68pb). No se observaron bandas de amplificación en ninguna de las muestras (D1600, D1 1000, D2 600 y D2 1000). Por tanto, el RNA total obtenido no presentaba DNA genómico. Se empleó un marcador de peso molecular (MPM) de 100 pb (Invitrogen™, Carlsbad, California, EUA.)

Para el análisis de expresión génica de las muestras de cDNA sintetizado se ocuparon placas de 96 pozos, las cuales tenían oligonucleótidos específicos de 44 genes de interés relacionados con obesidad y DT2 (30). Una vez realizados los ensayos de PCR en tiempo real y mediante el software Step One v2.3, se obtuvieron curvas de amplificación las cuales permitieron evaluar la expresión génica independiente de cada muestra Figura 6.



**Figura 6.** Curvas de amplificación de una placa de 96 pozos. La línea amarilla corresponde al umbral que se estableció para determinar los  $C_t$  de las muestras.

De los datos recabados de cada ciclo umbral se calcularon los  $\Delta Ct$  para realizar las correlaciones entre los 44 genes y las variables bioquímicas de glucosa y hemoglobina glicosilada. Se decidió como primer paso del estudio realizar las correlaciones con estas dos variables bioquímicas cuantitativas, debido a que el valor de la concentración sérica de glucosa en ayunas es el primer parámetro evaluado para esta patología. Por otra parte, hemoglobina glicosilada es el mejor dato bioquímico disponible para el diagnóstico y para un correcto control glucémico en este tipo de pacientes (32). De manera complementaria para evaluar la expresión relativa de los genes en el estudio se realizaron dos “nuevos” grupos respecto a los valores de referencia de Hemoglobina glicosilada. Los pacientes que tenían valores menores a 6.5% pertenecían al grupo control y los pacientes con valor mayor o igual al grupo de casos. Cabe mencionar que los pacientes que eran diabéticos, pero tenían un valor de hemoglobina glicosilada menor a 6.5% no fueron tomados en cuenta para realizar los cálculos de expresión relativa.

Los genes que mostraron una correlación significativa ( $p \leq 0.05$ ) con glucosa sérica en ayunas fueron *PSMD6*, *PTEN*, *TLR4*, *TLR2*, y *SIRT1* (Tabla 5). Mientras que los genes que se encontraban correlacionados con valores de hemoglobina glicosilada fueron *VEGFA*, *NAMPT*, *CCL2*, *IL1R1*, *ADAMTS9*, *GRK5*, *TP53INP1*, *IL1B*, *HP* e *ICAM*. (Tabla 6).

A pesar de que el punto de corte de  $p$  considerado para una correlación es de menor o igual a  $0.05$  ( $p \leq 0.05$ ) se tomó en cuenta el gen *TLR4*, este mostraba un valor de  $p$  nominal (cerca del punto de corte) (33,34). *TLR4* es un gen que ha encontrado relación con la resistencia a la insulina, está expresado en diferentes tejidos

diana para la insulina y su activación puede amortiguar la acción de esta hormona (35).

Por otra parte, los genes que mostraron correlación con hemoglobina glicosilada se muestran en la Tabla 6. Se tomó en cuenta adicionalmente a *GRK5* debido a su valor *p* nominal (0.0667) (33,34). *GRK5* es un gen que codifica al receptor acoplado a proteína G y se encuentra expresado altamente en tejido adiposo. Existen datos que indican su actividad como regulador en obesidad y DT2 actuando como un regulador positivo de la sensibilidad a la insulina (36).

**Tabla 5.** Genes que se encontraron correlacionados con glucosa sérica en ayunas.

GEN	Coefficiente De Correlación	<i>p</i>
<i>PSMD6</i>	0.3783	0.0328
<i>PTEN</i>	0.4266	0.0149
<i>TLR4</i>	0.3251	0.0695
<i>TLR2</i>	0.4664	0.0080
<i>SIRT1</i>	0.4035	0.0220

**Tabla 6.** Genes que se encontraron correlacionados con hemoglobina glicosilada.

GEN	Coefficiente De Correlación	<i>p</i>
<i>VEGFA</i>	0.4084	0.0251
<i>NAMPT</i>	0.5142	0.0037
<i>CCL2</i>	0.4271	0.0186
<i>IL1R1</i>	0.4881	0.0062
<i>ADAMTS9</i>	0.4912	0.0058
<i>GRK5</i>	-0.3391	0.0667
<i>TP53INP1</i>	-0.4519	0.0122
<i>IL1B</i>	0.3628	0.0488
<i>HP</i>	0.4637	0.0098
<i>ICAM</i>	0.4595	0.0106

Para los ensayos de correlación con ambas variables bioquímicas se utilizó la prueba de correlación de Spearman con el software STATA13 (StataCorp, Texas, EUA.).

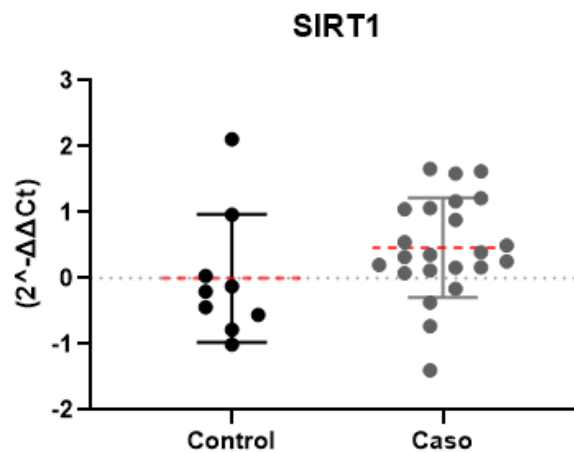
Se realizó el cálculo de la expresión relativa de los genes que presentaron correlación con ambas variables bioquímicas. El cálculo se hizo mediante la metodología de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  y con este se observó la diferencia en la expresión génica entre los grupos de estudio (controles vs casos) mediante la prueba estadística U de Mann-Whitney. El gen que presentó diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) se muestran en la Tabla 7. Esta tabla también contiene el valor de *fold-change* calculado, valor que representa el número de veces se encuentra expresado el gen en comparación del grupo control. Partiendo de este dato para interpretar como una sobreexpresión o bajaexpresión en el grupo denominado como casos (37). En la Figuras 7, se encuentran representado de forma gráfica los resultados mostrados en la Tabla 7. El único gen que mostró diferencias significativas en relación al diagnóstico de DT2 fue *SIRT1*.

En referencia a la variable bioquímica hemoglobina glicosilada no se encontraron diferencias significativas en la expresión relativa de los genes correlacionados con ella. Se esperaba encontrar algún gen que resultara relevante debido a la importancia de este dato bioquímico, sin embargo, puede que el resultado obtenido esté relacionado con las pocas muestras que fueron tomadas en cuenta para este análisis de expresión relativa.

**Tabla 7.** Gen con diferencia significativa en la expresión en relación al diagnóstico de DT2. El valor de  $p$  tomado como corte para determinar si existían diferencias significativas en la expresión génica entre los grupos fue  $p \leq 0.05$ . Los datos del fold change se muestran con sus máximos y mínimos al calcular el  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

GEN	FOLD CHANGE	$p$
<i>SIRT1</i>	0.72 (0.43 - 1.22)	0.0475

**Figura 7.** Expresión relativa de *SIRT1*, gen que mostro diferencias significativas entre los grupos de estudio. El grupo de controles pertenece a las muestras con los pacientes sin diabetes tipo 2. Mientras que el grupo casos pertenece a las muestras con el diagnostico positivo para diabetes tipo 2.



## DISCUSIÓN

La acumulación desmedida de tejido adiposo (TA) causada por un desbalance energético proveniente de la alimentación (gasto-consumo calórico) conlleva al desarrollo de sobrepeso y obesidad. Este padecimiento es de gran interés debido a sus alarmantes cifras mostradas a nivel mundial. La OMS reportó en 2017 a México con el mayor número de obesos adultos en América Latina (11). Este padecimiento es un factor de riesgo importante para el desarrollo de síndrome metabólico y de enfermedades crónicas degenerativas no transmisibles, tales como la diabetes tipo 2 (DT2).

En el presente estudio se evaluó la expresión génica en tejido adiposo visceral de pacientes con obesidad severa ( $IMC \geq 35$ ). Los grupos de casos y controles se dividieron en base al diagnóstico previo de DT2, datos proporcionados por la “Clínica de Diabetes y Obesidad” perteneciente al Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda” del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. El grupo control englobaba a los pacientes que no padecían esta patología, mientras que el grupo de casos pertenecían los pacientes declarados como diabéticos. La Tabla 4 muestra todos los datos de las variables antropométricas y bioquímicas evaluadas. Mediante la prueba estadística no paramétrica de signos de Wilcoxon (38) se realizó la comparación de estos datos entre los dos grupos de estudio, obteniendo diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) únicamente en las variables bioquímicas colesterol total ( $p=0.0343$ ) y el índice de HOMA-IR ( $p=0.0464$ ).

El valor de las medianas de Colesterol total, fue inferior al valor de referencia en ambos grupos (39). Para el grupo de controles el valor de la mediana de Colesterol

total fue de (182 mg/dL), mientras que el valor en el grupo de casos fue de (154 mg/dL). A pesar de que no mostraron diferencias significativas los valores de las lipoproteínas HDL y LDL, es importante resaltar las medianas poblacionales de estos datos bioquímicos. El valor de HDL es muy cercano al valor mínimo reportado. Por otra parte, la concentración de LDL se encuentra cercano al punto superior de corte (32). Estos datos sobre el perfil lipídico son característicos de los individuos que padecen obesidad severa, esta dislipidemia se denomina aterogénica (40). En donde el aumento de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y la disminución de las de alta densidad (HDL), fungen como marcadores asociados a síndrome metabólico, diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares (40).

Tras realizar las correlaciones de los ciclos umbrales de cada muestra con dos variables bioquímicas de importancia clínica para DT2 (glucosa y hemoglobina glicosilada), se obtuvieron 16 genes correlacionados (Tabla 5 y 6). Con estos genes se realizaron los cálculos de expresión relativa, para evaluar sus diferencias en los grupos de estudio. La metodología empleada para la expresión génica fue  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Se esperaba que la mayoría de estos genes mostraran diferencias significativas entre los grupos de estudio, esto basándonos en la información reportada sobre su relación DT2. Sin embargo, solo uno resultó con diferencias significativas.

*SIRT1* fue el único gen que mostro diferencias significativas en la expresión relativa de los grupos de estudio, el valor de *p value* obtenido tras realizar la prueba estadística U de Mann-Whitney fue de 0.0475. En el grafico mostrado en la Figura 7, se visualiza una menor expresión relativa en el grupo de casos. Su valor promedio



de *fold-change* obtenido fue de 0.72, representando una baja expresión en el grupo de casos comparando su media con el grupo control (*fold-change* = 1).

*SIRT1* es un gen que codifica a una proteína perteneciente a la familia de las sirtuinas, proteínas dependientes de NAD (Dinucleótido de Nicotinamida y adenina), (41). Su actividad se encuentra controlada por diferentes señales y cambios ambientales, como el ejercicio, la disponibilidad de nutrientes (restricción calórica) y tipo de dieta (41). En los seres humanos existen 7 tipos de sirtuinas (*SIRT1-SIRT7*), debido a su diversa ubicación celular sus funciones están estrechamente ligadas al metabolismo celular en general (42). *SIRT1* (sirtuína-1 desacetilasa dependiente de NAD) es la proteína más conservada en mamíferos. De forma general su activación está vinculada con metabolismo energético, envejecimiento, inflamación, respuesta al estrés y el metabolismo de glucosa y lípidos (43). Esta proteína es considerada un regulador metabólico maestro, por su capacidad de modificar y controlar numerosos factores de transcripción y cofactores involucrados en la homeostasis metabólica (43).

Debido a que la actividad de este gen se encuentra controlado por diferentes señales ambientales, que pueden cambiar la disponibilidad de NAD en las células. En estados de energía bajos (ayuno, restricción calórica y ejercicio), se ven aumentados los niveles de NAD y con esto la actividad de *SIRT1*. Por el contrario, con el aumento de energía, dietas altas en grasa, o respuestas inflamatorias agudas disminuyen las funciones de este gen (43).

Existen pocos estudios sobre la expresión de este gen de manera específica en tejido adiposo visceral (TAV). Este tejido es de alta importancia porque su

acumulación o expansión, es un factor de riesgo para padecer síndrome metabólico y desarrollar DT2. Perrini S. et al. (44), mencionan que en personas obesas el número de adipocitos agregados por año en tejido adiposo visceral es dos veces mayor en comparación a los sanos. También, en sus resultados de expresión génica observaron que, una reducción en la expresión de *SIRT1* en TAV aumentaba la adipogénesis en pacientes obesos. Esta expresión reducida fue observada desde las células madre hasta los adipocitos diferenciados a TAV. Concluyendo que *SIRT1* es un regulador importante de la adipogénesis. La relación de *SIRT1* con la adipogénesis se da porque la actividad de este gen suprime a PPAR- $\gamma$ , factor involucrado en la diferenciación de tejido adiposo (45).

En nuestro estudio todos cursan con obesidad severa, sin embargo, al comparar la expresión de *SIRT1* entre obesos sin DT2 contra obesos con DT2, encontramos diferencias en su expresión. Esto puede estar relacionado con una mejor respuesta del tejido adiposo de cada grupo. Recordando que la diferencia entre los obesos metabólicamente sanos (MHO) y no sanos, se encuentra en la forma que acumulan TAV y recalando su alta actividad metabólica (16). Los resultados disminuidos en la expresión de *SIRT1* obtenidos en la población diabética (obesos metabólicamente no sanos), tienen más sentido.

Se sabe con anterioridad que el tejido adiposo es un órgano metabólicamente activo (3). Este tiene la capacidad de secretar hormonas como: leptina, adiponectina y resistina. A su vez estas hormonas controlan el equilibrio energético, la regulación de glucosa y ácidos grasos (43).

Por otra parte, la disminución en la expresión de *SIRT1* en tejido adiposo se encuentra relacionado con una mayor resistencia a la insulina (43). Con los datos proporcionados por Perrini S. et al. (44), podemos relacionar que la población estudiada de obesos metabólicamente no sanos (diabéticos), tienen una mayor cantidad de tejido adiposo visceral a diferencia de los obesos metabólicamente sanos (no diabéticos). Que a su vez también tienden a seguir formando adipocitos, ocasionando una disminución en la expresión de *SIRT1*.

Hablando de forma general sobre las funciones que tiene *SIRT1* en todo el organismo, la expresión de *SIRT1* desempeña un papel importante en la reducción de la inflamación y estrés oxidativo. También mejora de la función mitocondrial, resultando como factor protector de las células  $\beta$  pancreáticas. Mejorando la resistencia a la insulina en los tejidos sensibles a la insulina, como el músculo esquelético y el tejido adiposo (46). *SIRT1*, también se encuentra relacionada en los procesos enzimáticos de varios tejidos metabólicos como: hígado, músculo esquelético (47). Relacionado su actividad con la homeostasis de glucosa y la señalización de la insulina. Su sobreexpresión en las células  $\beta$  pancreáticas mejora la producción de energía (ATP) a partir de glucosa y está relacionada con la vía de señalización  $PI_3K$ -AKT, mejorando la sensibilidad a la insulina (47). A su vez, el efecto beneficioso de *SIRT1* sobre los trastornos metabólicos se debe en parte a la capacidad de suprimir la actividad de NF- $\kappa$ B, el regulador maestro de la respuesta inflamatoria celular (48). Cao Y. et al. (49), menciona que la sobreexpresión *SIRT1* tiene un papel protector hacia el funcionamiento de las células  $\beta$  pancreáticas y una mejor sensibilidad a la insulina.

Con los datos e información que se ha mencionado con anterioridad, se puede interpretar de mejor manera los resultados obtenidos de la expresión relativa de *SIRT1* en nuestros grupos de estudio. En primera instancia, la expresión de *SIRT1* se encontró correlacionada con la concentración sérica de glucosa en ayunas de toda la población de estudio. Su expresión relativa resultó disminuida en el grupo de los pacientes obesos diagnosticados como diabéticos. Sumado a esto, los participantes de este grupo también confirman su resistencia a la insulina, mediante los datos del índice HOMA-IR (Tabla 4).

De todas las funciones que cumple *SIRT1* en el organismo, podemos observar que al encontrarse disminuido existe una mayor disposición de TAV. Ocasionando una mayor resistencia a la insulina, debido a la alteración en la vía de señalización de insulina PI<sub>3</sub>K-AKT y a la activación de la respuesta inflamatoria de bajo grado que es ocasionada por el padecimiento de la obesidad.

La obesidad es considerada como un factor de riesgo para desarrollar resistencia a la insulina (25). Con claridad sabemos que a la larga el presentar resistencia a la insulina desencadena el desarrollo de DT2. Con los resultados de expresión génica obtenidos se observó que el grupo control, a pesar de tener obesidad presenta una aparente protección hacia el desarrollo de resistencia a la insulina. Debido a que la expresión de *SIRT1* se encuentra relacionada con una adecuada sensibilidad a la insulina.

El haber obtenido una baja expresión en TAV de este gen, únicamente proporciona una pauta para seguir indagando su expresión en otros tejidos relacionados con la sensibilidad de la insulina. Comparándolos con un grupo de estudio que no presente

factores de riesgo, como el padecer obesidad. Y controlando o considerando variables que podrían afectar su expresión.

## CONCLUSIONES

De los 44 genes de interés probados en el ensayo de expresión génica, se encontraron 16 genes correlacionados con la concentración sérica de glucosa y hemoglobina glicosilada (*VEGFA*, *IL1R1*, *PSMD6*, *PTEN*, *TLR4*, *TLR2*, *SIRT1*, *LEPR*, *NAMPT*, *CCL2*, *ADAMTS9*, *GRK5*, *TP53INP1*, *IL1B*, *HP* e *ICAM*). A pesar de que estos genes se encontraron correlacionados con parámetros bioquímicos relacionados con el diagnóstico y control de DT2, el único gen que mostró diferencias significativas entre los grupos de estudio fue *SIRT1*. Mostrando una disminución en la expresión génica en tejido adiposo visceral de *SIRT1* en los pacientes que padecían diabetes tipo 2.

## PERSPECTIVAS

- Incrementar el número de participantes de obesos metabólicamente sanos para observar si los genes que resultaron correlacionados con las variables bioquímicas glucosa y hemoglobina glicosilada, resultan significativas entre los grupos de estudio.
- Analizar la expresión de *SIRT1* en diferentes tejidos relacionados con la sensibilidad a la insulina. En pacientes obesos metabólicamente sanos y no sanos, para obtener más datos sobre este gen y su actividad relacionada a la regulación de la concentración de glucosa.
- Comparar los resultados de expresión con un grupo de participantes que no presente obesidad severa.

## REFERENCIAS.

- (1) Barroso Camiade, Cristina La obesidad, un problema de salud pública Espacios Públicos. 2012;15(3):200-215 Universidad Autónoma del Estado de México Toluca, México.
- (2) Moreno Manuel. Definición y clasificación de la obesidad. Rev. Med. Clin.Condes-2012; 23(2) 124-128.
- (3) Olatz Izaola, Daniel de Luis, Ignacio Sajou, Joan Carles Domingo, Montserrat Vidal. Inflamación y obesidad (lipoinflamación). Nutr. Hosp. 2015;31(6):2352-2358.
- (4) Hermsdorff A. Zulet A, Bressan J, Martínez A. Efecto de la dieta en la inflamación crónica y de bajo grado relacionada con la obesidad y el síndrome metabólico. Endocrinol Nutr. 2008;55(9):409-419.
- (5) Rodelo CR, Roura GA, Olivares RL. Mecanismos Moleculares de la Resistencia a la Insulina: Una Actualización. Gac Med Mex. 2017; 153:214-228.
- (6) Hernández-Ávila M, Gutiérrez JP, Reynoso-Noverón N. Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia. Salud Publica Mex 2013;55 (2):S129-S136.
- (7) Cervantes RV, Presno BJ. Fisiopatología de la diabetes y los mecanismos de muerte de las células  $\beta$  pancreáticas. Revista de Endocrinología y Nutrición. 2013;21(3):98-106.
- (8) Cano R, Castillo S, Merino TJ, Francisco J. Causas y tratamiento de la obesidad. Nutr. clín. diet. hosp. 2017;37(4):87-92.



- (9) OMS.10 Datos sobre la Obesidad [Internet]. [citado el 3 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/features/factfiles/obesity/es/>
- (10) OMS. Obesidad y Sobrepeso, datos y Cifras [Internet]. [citado el 3 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- (11) Alianza por la salud. México, líder en obesidad en América Latina:OMS. [Internet]. [citado el 3 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://alianzasalud.org.mx/2017/10/mexico-lider-en-obesidad-en-america-latina-oms/>.
- (12) Hernández AM, Rivera DJ, Shamah LT, Cuevas NL, Gómez AL, Gaona PE, Romero MM, Gómez HI, Hernández SP, Villalpando H, Gutiérrez JP, Ávila AM, Mauricio LE, Martínez DJ, García LE. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. Informe final de Resultados. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX);2016.
- (13) Dávila TJ, González IJ, Barrera CA, Panorama de la obesidad en México. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2015;53(2):240-249.
- (14) Carbajo CM, García CM, Solórzano OJ, et al. Bypass gástrico laparoscópico-robótico de una sola anastomosis: Resultados preliminares sobre 300 casos, Rev. Méx. De Cirugía Endoscópica,2004;6(1)5-10.
- (15) Martínez A.M.L. Obesidad y salud,¿ En realidad existe el paciente obeso metabólicamente sano? ResPyN.2017;16(2):44-55.

- (16) Borrás, J. L. G., & Gilbert, J. C. ¿Existe el obeso sano? Revista de Endocrinología y Nutrición.2014;61(1):47-51.
- (17) Sánchez JC, Romero CR, Muñoz LV, Rivera RA. El órgano adiposo, un arcoiris de regulación metabólica.Rev.Cubana de Endocrinología. 2016;27(1):105-119.
- (18) Gutiérrez JR, Velázquez MP, Prieto BG. El tejido adiposo como órgano maestro en el metabolismo. Rev.de Endocrinología y Nutrición. 2011; 19(4):154-162.
- (19) Nelson D, Cox M. Lehninger, Principios de bioquímica, 5a ed. New York: Omega; 2009.
- (20) García TD, Castellanos GM, Cedeño MR, Benet RM, Ramírez AI. Tejido adiposo como glándula endocrina. Implicaciones fisiopatológicas.Revista Finlay [revista en Internet].2011[citado 2019 Nov 14];1(2):[20p.]Disponible en:<http://www.revfinlay.sld.cu/index.php/finlay/article/view/39>.
- (21) Esteve RM. Tejido adiposo:heterogeneidad celular y diversidad funcional. Endocrinol Nutr. 2014;61(2):100-112.
- (22) Carvajal CC. Tejido adiposo, obesidad e insulino resistencia. ASOCOMEL. Medicina Legal de Costa Rica,20015;32(2).
- (23) Suárez C.W, Sánchez O.J, González J.A. Fisiopatología de la obesidad: Perspectiva actual. Pathophysiology of obesity: Current view. Rev Chil Nutr. 2017;44(3):226-233.

- (24) Ezquerro S., Frühbeck G.,Rodríguez A. El tejido adiposo, protagonista en las alteraciones metabólicas de la obesidad. Rev. Bioquímica de la obesidad.SEBBM [revista en Internet].2019[citado 2019 Dic 10] Disponible en: <https://www.sebbm.es/revista/articulo.php?id=323&url=el-tejido-adiposo-protagonista-en-las-alteraciones-metabolicas-de-la-obesidad>
- (25) Ros PM, Medina GG. Obesidad, abipogénesis y resistencia a la insulina. *Endocrinol Nutr*,2011;58(7):360-369.
- (26) IDF/Federación Internacional de Diabetes. Atlas sobre diabetes,2017 8va. Ed:1-148.
- (27) INEGI." Estadísticas a propósito del día de muertos" (2 de noviembre) Datos Nacionales. [Internet]. [citado el 04 de septiembre de 2019] Disponible en: [https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2017/muertos2017\\_Nal.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2017/muertos2017_Nal.pdf).
- (28) Olivares RA, Arellano PA. Bases Moleculares De las Acciones de la insulina. *REB* 27,2008;1(1): 9-18.
- (29) Chen L, Chen R, Wang H, Liang F. Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. *Int J Edocrinol*,2015;1(1):1-9.
- (30) DIAGRAM Consortium, AGEN-T2D Consortium, SAT2D Consortium, MAT2D Consortium, T2D-GENES Consortium. Genome-wide trans-ancestry meta-analysis provides insight into the genetic architecture of type 2 diabetes susceptibility. *Nat Genet*, 2014;46(3):234-272.

- (31) Hernández Y.A, Tuero I.A, Vargas G.D. Utilidad del índice HOMA-IR con una sola determinación de insulinemia para diagnosticar resistencia insulínica. Rev. Cubana Endocrinol. 2011;22(2):69-77.
- (32) Pereira D.L, Palay D.M, Rodríguez C.A, Neyra B.M, Chia M.M. Hemoglobina glucosilada en pacientes con diabetes mellitus. MEDISAN. 2015; 19(4):555-561.
- (33) Molina AM. ¿Qué significa realmente el valor de  $p$ ? Rev Pediatr Aten Primaria. 2017;19(76):377-381.
- (34) Kain ZN, MacLaren J. Valor de  $p$  inferior a 0.05: ¿qué significa en realidad? Pediatrics.2007;63(3):118-120.
- (35) Kim J. J y Sears D. D. TLR4 and insulin resistance. Gastroenterol Research and Practice. 2010;1(1):1-11.
- (36) Wang L., Shen M., Wang F. GRK5 ablation contributes to insulin resistance. Journal of BBRC,2012;429(12);99-104.
- (37) Parras B.D. Análisis de datos en Bioinformática: Asociación entre mutaciones puntuales y patrones de expresión génica [master's thesis]. Granada,España:Universidad de Granada;2014.86 p.
- (38) Berlanga S. V y Rubio H.MJ. Clasificación de pruebas no paramétricas. Cómo aplicarlas en SPSS.REIRE. 2012;5(2):101-113.
- (39) Aguilar S.C., Gómez P. F, Lerman G. I, Vázquez C.C, Pérez M. O, Posadas R.O. Diagnóstico y tratamiento de las dislipidemias: posición de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología Rev. Endocrinol Nutr. 2004;12 (1):7-41.

- (40) González S. CE, Díaz B. Y, Mendizábal R. AP, Medina D.E, Morales JA. Prevalencia de Obesidad y perfil lipídico alterado en jóvenes universitarios. *Nutr Hosp.* 2014; 29(2): 315-321.
- (41) Serra F.T. Las sirtuinas:posibles dianas terapéuticas e las patologías asociadas al envejecimiento. [master's thesis]. Islas Baleares, España:Universitat de les Balears; 2014.32 p.
- (42) Chun C. H, Guarente L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends Endocrinol. Metab*,2014;25(3):138-145.
- (43) Li. X. SIRT1 and energy metabolism. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2013;45(1):51-60.
- (44) Perrini S, Porro S, Nigro P, Cignarelli A, Caccioppoli C, Genchi VA, Martines G, De Fazio M, Capuano P, Natalicchio A, Laviola L, Giorgino F. Reduce SIRT1 and SIRT2 expression promotes adipogenesis of human visceral adipose stem cells and associates with accumulation of visceral fat in human obesity. *Int J Obes (Lond)*,2020;44(2):307-319.
- (45) Kurylowicz, A. Role of Sirtuins in Adipose Tissue Development and Metabolism. *Adipose Tissue - An Update*,2019;(2):181-197.
- (46) Kitada M, Ogura Y, Monno I, Koya D. Sirtuins and Type 2 Diabetes: Role in Inflammation, Oxidative Stress, and Mitochondrial Function. *Frontiers in Endocrinology*.2019;10(187):1-12.
- (47) Liang, F., Kume, S., & Koya, D. SIRT1 and insulin resistance. *Reviews Endocrinology*. 2009;5(7):367-373.

(48) Kauppinen A, Suuronen T, Ojala J, Kaarniranta K, Salminen A. Antagonistic crosstalk between NF- $\kappa$ B and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders..2013;25(10);1939-1948.

(49) Cao, Y., Jiang, X., Ma, H., Wang, Y., Xue, P., & Liu, Y. SIRT1 and insulin resistance. Journal of Diabetes and Its Complications.2016;30(1):178–183.

## ANEXOS

**Tabla 8.** Descripción detallada de la placa de 96 pozos. Se muestra la posición alfanumérica de los 44 genes de interés, los 2 genes calibradores (HK) y los 2 controles internos de la placa. Se muestra el nombre de los genes y su descripción.

POSICIÓN	GEN	DESCRIPCIÓN
A01, A07	<i>ADIPOQ</i>	Adiponectina, C1Q.
A02,A08	<i>VEGFA</i>	Factor de crecimiento endotelial vascular A
A03,A09	<i>NAMPT</i>	Nicotinamida Fosforibosiltransferasa
A04,A10	<i>TNFRSF1A</i>	Receptor de TNF Superfamilia 1A
A05,A11	<i>CCL2</i>	Quimiocina activante de monocitos ligando 2
A06,A12	<i>IL1R1</i>	Receptor de interleucina 1 tipo 1
B01,B07	<i>PPARG</i>	Receptor activado por proliferadores peroxisómicos $\gamma$
B02,B08	<i>ADIPOR1</i>	Receptor de adiponectina tipo 1
B03,B09	<i>CSF1</i>	Factor estimulante de colonias tipo 1
B04,B10	<i>WFS1</i>	Glicoproteína transmembranal Wolframín (ER)
B05,B11	<i>ADIPOR2</i>	Receptor de adiponectina tipo 2
B06,B12	<i>CDC123</i>	Ciclo de división celular 123
C01,C07	<i>PSMD6</i>	Subunidad del proteasoma 26S, No ATPasa 6
C02,C08	<i>PEPD</i>	Peptidasa D
C03,C09	<i>SLIT3</i>	Ligando de guía tipo 3
C04,C10	<i>PTEN</i>	Homólogo de fosfatasa y tensina
C05,C11	<i>ADAMTS9</i>	ADAM Metalopeptidasa de trombospondina tipo 1M9
C06,C12	<i>GRK5</i>	Receptor de quinasa 5 acoplado a proteína G
D01,D07	<i>TLE1</i>	Corepresor transcripcional familia TLE 1.
D02,D08	<i>SORT1</i>	Sortilin precursor tipo 1
D03,D09	<i>CCND2</i>	Ciclina D2
D04,D10	<i>TCF7L2</i>	Factor de transcripción 7 tipo 2
D05,D11	<i>MAEA</i>	Atacante de eritroblastos de macrófagos
D06,D12	<i>TLR4</i>	Receptor tipo "toll" 4
E01,E07	<i>BCAR1</i>	Proteína de resistencia al estrógeno tipo 1
E02,E08	<i>NOTCH2</i>	Proteína homóloga de corte neurogénico
E03,E09	<i>TLR2</i>	Receptor tipo "toll" 2
E04,E10	<i>UBE2E2</i>	Ubiquitina Conjuganda a enzima E2
E05,E11	<i>TMEM18</i>	Proteína transmembranal 18
E06,E12	<i>LPP</i>	Asociación preferida de lipoma
F01,F07	<i>TP53INP1</i>	Proteína nuclear inducible por p53
F02,F08	<i>NOD1</i>	Proteína 1 con dominio a la oligomerización de unión a nucleótidos
F03,F09	<i>SIRT1</i>	Sirtuina 1
F04,F10	<i>ADCY5</i>	Adenilato ciclasa 5
F05,F11	<i>ATRN</i>	Proteína " Attractin"
F06,F12	<i>LEPR</i>	Receptor de leptina
G01,G07	<i>FTO</i>	$\alpha$ -cetogluturato dependiente de dioxigenasa FTO
G02,G08	<i>NLRP3</i>	Criopirina
G03,G09	<i>IL1B</i>	Interleucina 1 tipo $\beta$
G04,G10	<i>HP</i>	Haptoglobina
G05,G11	<i>IL6</i>	Interleucina 6
G06,G12	<i>CXCL8</i>	Factor quimiotáctico de neutrófilos derivado de monocitos 8
H01,H07	<i>ICAM1</i>	Molécula de adhesión intercelular 1
H02,H08	<i>TNF</i>	Factor de necrosis tumoral
H03,H09	<i>HPRT1**</i>	Hipoxantina Fosforibosiltransferasa 1
H04,H10	<i>ACTB**</i>	B-Actina
H05,H011	<i>PPC</i>	Control de PCR positivo
H06,H12	<i>GDC</i>	Control de DNA genómico.