



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
MORELOS  
FACULTAD DE MEDICINA



---

SECRETARIA DE DOCENCIA

JEFATURA DE POSGRADO

**POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO EN EL SITIO DE UNIÓN AL  
ADN DEL GEN QUE CODIFICA PARA EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN  
FOXO1 EN INDIVIDUOS MEXICANOS CON RESISTENCIA A LA INSULINA**

TESIS

Que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular

Presenta

MC. Gueorgui López Márquez

Director de tesis

Dr. Jesús Santa Olalla Tapia

Cuernavaca, Morelos, México. Junio del 2021

**Lugar y fecha de realización de tesis:**

Cuernavaca, Morelos, México. Junio del 2021

**Miembros del comité tutorial:**

Tutor principal: Dr. Jesús Santa Olalla Tapia

Tutor personal: Dr. Armando Herrera Arellano

1° vocal: Dra. Alma Ethelia López Caudana

2° vocal: Dr. Mario E. Cruz Muñoz

3° vocal: José Luis Montiel Hernández

**Miembros del jurado de examen:**

Presidente: Dr. Armando Herrera Arellano

Secretario: Dr. Juan José Acevedo Fernández

1er vocal: Dra. Alma Ethelia López Caudana

2do vocal: Dr. Ernesto Rodríguez Ayala

3er vocal: Dr. Jesús Santa Olalla Tapia

**Fuente de financiamiento:**



**Proyecto de tesis vinculado a:**

Estudio GEMM (Genética de las Enfermedades Metabólicas en México): Bases Genómicas del Metabolismo Postprandial.

## **Agradecimientos**

Me gustaría agradecerle a mi familia todo el apoyo incondicional que he recibido por parte de ellos. Es gracias a todo el esfuerzo de mi padre y de mi madre que puedo seguir preparándome, estudiando y trabajando en los ámbitos que más me gustan. Un agradecimiento especial a mi hermana Nadja quien tiene formas poco comunes de enseñar y que en más de una manera es un ejemplo para mí.

Quiero agradecer a mis sinodales y profesores de la maestría quienes me brindaron nuevos conocimientos a través de su guía, consejos, revisiones, correcciones y regaños. Sin ellos todo lo realizado en mi proyecto no hubiera sido posible, me han abierto las puertas a un mundo académico y laboral completamente nuevo.

Otro agradecimiento es dirigido particularmente al Dr. Jesús Santa Olalla Tapia quien fue mi asesor de tesis y quien a través de una mano exigente pero comprensiva me abrió las puertas de su laboratorio y me enseñó desde lo más básico para entender y empezar a moverme en este mundo de la ciencia y la investigación. Su conocimiento infinito es una inspiración, descanse en paz doctor.

También quiero agradecer a Melissa quien fue mi compañera de maestría y de mesa de laboratorio y en quien me apoyó para sobrepasar un sinnúmero de dificultades y problemas que el posgrado nos fue tendiendo cual trampa en el bosque. Me mantuvo cuerdo tras las interminables horas de experimentos infructuosos.

Por último, el más grande de mis agradecimientos es dirigido a Amairani, mi más grande tesoro y a quien conocí en el transcurso de la maestría. Se ha convertido en la persona más maravillosa y especial de mi vida. Su carisma y alegría eliminan cualquier duda y aflicción y me mantuvieron sereno durante los momentos más difíciles del posgrado y de la pandemia. Gracias por ser mi compañera de vida.

## Índice

<b>Agradecimientos</b>	<b>3</b>
<b>Índice</b>	<b>4</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>7</b>
<b>Lista de Tablas</b>	<b>8</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>9</b>
<b>1.0 Resumen</b>	<b>15</b>
<b>2.0 Introducción</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Gen FoxO1</b>	<b>17</b>
2.1.1 Factor de transcripción	17
2.1.3 Principales funciones de FOXO1	20
2.1.4 Participación de FOXO1 en estados de alteración metabólica	24
<b>2.2 Insulina</b>	<b>26</b>
2.2.1 Vía de señalización de la insulina	26
2.2.2 Vías de regulación de la insulina	28
<b>2.3 Resistencia a la insulina</b>	<b>29</b>
2.3.1 Concepto	29
2.3.2 Fisiopatología	30
2.3.3 Afección en aparatos y sistemas con Resistencia a la insulina	32
<b>2.4 Diagnóstico de RI</b>	<b>35</b>
<b>2.5 Prevalencia de RI en población mexicana</b>	<b>36</b>
<b>2.6 Sobrepeso y obesidad</b>	<b>37</b>
2.6.1 Concepto, clasificación y epidemiología	37
2.6.2 Fisiopatología	39
2.6.3 Complicaciones	41
<b>2.7 Adipogénesis</b>	<b>42</b>
2.7.1 Hiperplasia e hipertrofia	42
2.7.2 Tejido Adiposo Blanco	43
2.7.3 Tejido Pardo	44
2.7.4 Tejido Beige	45
<b>3.0. Antecedentes</b>	<b>46</b>
<b>3.1 Polimorfismo de Nucleótido Único o SNP</b>	<b>46</b>
<b>3.2 SNP de Factor de Transcripción FOXO1</b>	<b>46</b>
<b>3.3 SNP de Resistencia a la insulina</b>	<b>49</b>

<b>4.0. Planteamiento del problema</b>	<b>50</b>
<b>5.0. Justificación</b>	<b>51</b>
<b>6.0. Pregunta de investigación</b>	<b>53</b>
<b>7.0. Hipótesis</b>	<b>53</b>
<b>8.0. Objetivos</b>	<b>53</b>
8.1 Objetivo general:	53
8.2 Objetivos específicos:	53
<b>9.0. Metodología</b>	<b>54</b>
9.1 Tipo de estudio	54
9.2 Lugar de estudio	54
9.3 Población de estudio, periodo y tamaño de muestra.	54
9.4 Tipo de muestreo	54
9.4.1 Criterios de Inclusión.	55
9.4.2 Criterios de exclusión	55
9.4.3 Criterios de eliminación	¡Error! Marcador no definido.
9.5 Características de variables de interés	56
9.6 Toma de muestras sanguíneas	57
9.7 Procedimientos de laboratorio	58
9.7.1 Medición de niveles de glucosa sérica	58
9.7.2 Medición de niveles de insulina sérica	58
9.7.3 Extracción y purificación de ADN	58
9.7.4 Evaluación de concentración y pureza de ADN	58
9.7.5 Evaluación de integridad del ADN	59
9.7.6 Evaluación de la amplificación: PCR	59
9.7.7 Diseño de oligonucleótidos	59
9.7.8 Estandarización de Oligonucleótidos	60
9.7.9 PCR punto final	61
9.7.10 Purificación de productos de amplificación	62
9.7.11 Evaluación de los productos de amplificación	62
9.7.12 Secuenciación de los productos de amplificación	62
9.8 Evaluación de la calidad de las secuencias de FOXO1	63
9.9 Identificación de SNP	63
9.10 Frecuencia de SNP identificado	64
9.11 Predicción de daño a la proteína de FOXO1	64
9.12 Análisis estadístico	64

9.12.1 Análisis exploratorio	64
9.12.2 Análisis Descriptivo	64
<b>10. Aspectos éticos</b>	<b>66</b>
<b>11. Resultados</b>	<b>67</b>
11.1 Características de la población.	67
11.2 Diseño de oligonucleótidos	69
11.3 Extracción de ADN para estandarización	70
11.4 Estandarización de Oligonucleótidos	73
11.5 Evaluación de Pureza e integridad de las muestras de ADN	77
11.6 Amplificación del segmento de FOXO1 de interés por PCR	79
11.7 Purificación de Productos de PCR	80
11.8 Evaluación de la calidad de las secuencias de ADN	81
11.9 Análisis y alineamiento de las secuencias.	83
11.10 Análisis de la traducción de nucleótido a proteína y predictor de daño proteico	86
<b>12. Discusión</b>	<b>89</b>
12.1 Resistencia a la insulina en individuos sanos.	89
12.2 FOXO1 como un gen relevante en la resistencia la insulina.	89
12.3 SNP relacionados con resistencia a la Insulina.	92
<b>13. Conclusiones</b>	<b>93</b>
<b>14. Fortalezas y limitaciones</b>	<b>93</b>
<b>15. Perspectivas de investigación</b>	<b>93</b>
<b>16. Referencias bibliográficas</b>	<b>94</b>
<b>17. Anexos</b>	<b>105</b>

## Lista de figuras

		<b>Página</b>
Figura 1	Organización de los sitios de interés del gen que codifica para FOXO1.....	18
Figura 2	Mecanismo molecular de RI en hepatocito y en músculo esquelético.....	32
Figura 3	Clasificación de IMC según la OMS .....	38
Figura 4	Flujo de obtención y selección de voluntarios .....	52
Figura 5	Distribución por edad de la población de estudio.....	63
Figura 6	Distribución por rango de valores de glucemia en sangre en la población de estudio .....	64
Figura 7	Distribución por valores de insulina en sangre en la población de estudio....	64
Figura 8	Pareja de oligonucleótidos a utilizar y sus especificaciones.....	66
Figura 9	Secuencia del amplicon con los sitios de interés .....	66
Figura 10	Evaluación de integridad de muestras de ADN en gel de agarosa al 1.2%....	68
Figura 11	Curvas por ciclos de 4 muestras (A1, A2, A8 y M3) purificadas de ADN....	69
Figura 12	Curva de estandarización de oligonucleótidos.....	71
Figura 13	PCR por curva de ciclos.....	72
Figura 14	Mapeo por enzima de restricción EcoR1 del fragmento amplificado.....	73
Figura 15	Gel de agarosa al 1.5% representativo en la evaluación de la integridad y tabla con la frecuencia de ADN integro o degradado .....	75
Figura 16	Gel de agarosa al 2% corroborando la amplificación del producto de PCR...	76
Figura 17	Gel de agarosa al 2% de los productos de PCR purificados.....	77
Figura 18	Electroferograma de la secuencia C-UDMM-245.....	79

Figura 19	Alineamiento múltiple entre secuencia C-UDMM-245 contra secuencia de referencia de FOXO1 del NCBI.....	80
-----------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

### Lista de Tablas

		<b>Página</b>
Tabla 1	SNP de FOXO1 y su asociación con alteraciones metabólicas y sus complicaciones .....	47
Tabla 2	Valores de glucemia, insulina en sangre e índice HOMA-IR de la población de estudio .....	65
Tabla 3	Valores de pureza y concentración de muestras de ADN .....	67
Tabla 4	Promedios y frecuencias de los valores de pureza y contaminación.....	74
Tabla 5	Promedios y frecuencias relativas de los valores de calidad $QV \geq 20$ .....	78
Tabla 6	SNP identificados en la región FH/DBD del exón 2 del gen que codifica para FOXO1.....	80
Tabla 7	SNP identificados en el intrón 2 y en la región del exón 2 que no corresponde al FH/DBD del gen que codifica para FOXO1.....	81
Tabla 8	Predicción de la estructura, estabilidad y función de la proteína a partir del cambio de aminoácido producido por el cambio de nucleótido único.....	83
Tabla 9	SNP identificados por voluntario.....	84



## Abreviaturas

ABCA1	Proteína de ABCA (del inglés ATP-binding cassette transporter 1)
ADN	Acido Desoxirribonucleico
AgRP	Proteína r-agouti (del inglés agouti-related protein)
ALAD	Asociación LatinoAmericana de Diabetes
APOC3	Apolipoproteina C-III
AQP7	Acuaporina 7
ATF4	Factor de transcripción activador 4 (del inglés Activating Transcription Factor 4)
ATF-6	Factor de transcripción activador 6 (del inglés factor de transcripción activador 6)
ATG7	Proteína 7 relacionada con la autofagia (del inglés Autophagy Related 7)
ATP	Adenosin Trifosfato (del inglés Adenosine TriPhosphate)
BGLAP	Osteocalcina (del inglés Bone Gamma-Carboxyglutamate Protein)
CDK2	Cinasa dependiente de ciclina 1 (del inglés Cell Division Control Protein)
C/EBPs	Proteína C/EBP (del inglés CCAAT-enhancer binding proteins)
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina (Chromatin immunoprecipitation)
CHK1	Serina/treonina cinasa CHK1 (del inglés Checkpoint Kinase 1)
CHOP10	Factor de transcripción DDIT3 (del inglés C/EBP homologous protein)
CRM1	Proteína de mantenimiento de la región cromosómica 1 (del inglés Chromosomal Region Maintenance 1)
CRTC2	Coactivador Transcripcional regulado pro CREB 2 (del inglés CREB regulated transcription coactivator 2)
DT2	Diabetes Mellitus Tipo 2

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (del inglés Ethylenediaminetetraacetic acid)
ENOS	Óxido Nítrico Sintasa endotelial (del inglés Endotelial Nitric Oxide Synthase)
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
EST1	proteína EST1 (del inglés Telomere Elongation Protein 1)
FABP4	Proteína aP2 (del inglés fatty acid binding protein 4)
FATP1	Proteína 1 de transporte de ácidos grasos de cadena larga (del inglés Long-chain fatty acid transport protein 1)
FOXO1	Proteína FOXO1 (del inglés Forkhead box protein class O type 1)
FT	Factor de Transcripción
FTO	Proteína asociada a la masa grasa y la obesidad (del inglés Fat mass and obesity-associated protein)
G6PC	Subunidad catalítica de glucosa-6-fosfatasa (del inglés Glucose 6 phosphatase catalytic subunit)
GLUT-4	Proteína transportadora de glucosa (del inglés Glucose transporter type 4)
GRB2	Proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento (del inglés Growth factor receptor-bound protein 2)
GREM1	Proteína Gremlin
GSK-3 $\beta$	Glucógeno sintasa quinasa 3 (del inglés Glycogen synthase kinase 3)
GWAS	Estudio de asociación de genoma completo (del inglés Genome-wide association study)
HAS	Hipertensión Arterial Sistémica
HDAC-I	Histonas de acetilasas (del inglés Histone deacetylase)
HDL	Lipoproteína de Alta Densidad (del inglés High Density Lipoprotein)

Hmox1	Hemo oxigenasa 1 (del inglés Heme oxygenase 1)
HOMA-IR	Índice de Resistencia a la Insulina (del inglés homeostatic model assessment insuline resistance)
HUVEC	Células endoteliales de vena umbilical humana (del inglés Human Umbilical Vein Endothelial Cells)
IDF	Federación Internacional de Diabetes (del inglés International Diabetes Federation)
IGF-1	Factor de crecimiento parecido a insulina 1 (del inglés insulin-like growth factor)
IMC	Índice de Masa Corporal
IRE-1	Enzima 1 $\alpha$ (del inglés serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$ )
IRS	Substrato Receptor Insulina (del inglés Insuline Receptor Substrate)
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (del inglés International Union of Pure and Applied Chemistry)
KLF2	Factor 2 Kruppel-like (del inglés Krüppel-like Factor 2)
KRIT1	Proteína atrapada en la interacción Krev (del inglés Krev interaction trapped protein)
LPL	Lipoproteinlipasa
MED1	Proteína mediadora de la transcripción de la subunidad (del inglés Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1)
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero (del inglés Messenger Ribonucleic Acid)
MTHFR	Metilentetrahidrofolato reductasa (del inglés Methylene tetrahydrofolate reductase)
mTORC2	Complejo mTOR 2 (del inglés mTOR Complex 2)

MYF5	Factor miogénico 5 (del inglés Myogenic factor 5)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina (del inglés Nicotinamide Adenine Dinucleotide)
NES	Sitio de Exportación Nuclear (del inglés Nuclear Export Signal)
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B (del inglés nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
NLK	Cinasa tipo Nemo (del inglés Nemo Like Kinase)
NLS	Sitio de Localización Nuclear (del inglés Nuclear Localización Site)
OR	Razón de momios (del inglés odd ratio)
PCK1	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1 (del inglés Phosphoenolpyruvate carboxykinase)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés Polymerase Chain Reaction)
PDK1	Quinasa dependiente de fosfoinositol-1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1)
PDK4	Piruvato deshidrogenasa lipoamida quinasa isoenzima 4 (del inglés Pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 4)
PERK	Proteína quinasa de retículo endoplásmico (del inglés protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase)
PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	Prostaglandina F <sub>2<math>\alpha</math></sub>
PI3K	Fosfoinositol 3quinasa (del inglés Phosphoinositide 3-kinase)
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (del inglés Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5- trifosfato (del inglés Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate)

PKA	Proteína quinasa A (del inglés Protein Kinase A)
PKB	Proteína quinasa B (del inglés Protein kinase B)
PLK	Serina/treonina proteína quinasa PLK1 (del inglés Polo-like Kinase 1)
POMC	Proopiomelanocortina
PP2A	Proteína fosfatasa 2 (del inglés Protein Phosphatase 2)
PPAR	Receptor Activador de la proliferación de Peroxisomas (del inglés Peroxisome Proliferator-Activated Receptor)
PPARGC1	Coactivador del receptor gamma 1 alfa activado (del inglés Peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 alpha)
PPP2R1	Proteína PPP2R1 (del inglés Protein Phosphatase 2)
PRMT1	Proteína Arginina N-metiltransferasa 1 (del inglés Protein Arginine Methyltransferase 1)
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (del inglés Phosphatase and tensin homolog)
RFU	Unidades de Florecencia Relativa (del inglés relative fluorescence units)
RI	Resistencia a la Insulina
ROS	Especies de oxígeno reactivo (del inglés Reactive oxygen species)
RUNX2	Proteína RUNX2 (del inglés Runt-related Transcription Factor)
RXR	Receptor X Retinoide (del inglés Retinoid X Receptor)
SH2	Dominio SH2 (del inglés Src Homology 2)
siRNA	ARN pequeña de interferencia (del inglés Small interfering RNA)
SIRT1	Sirtuina 1 (del inglés Silent mating type information regulation 1 homolog)

SKP2	Proteína Cinasa 2 (del inglés S-phase Kinase-associated protein 2)
SM	Síndrome Metabólico
SMAD1	Proteína de la familia SMAD (del inglés Mothers Against Decantaplegic homolog)
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Polimorfismo de nucleótido único (del inglés Single Nucleotide Polymorphism)
SOCS	Complejo proteico SOCS (del inglés suppressor of cytokine signaling)
SOS	Complejo proteico SOS (del inglés Son Of Sevenless)
SREBP1	Factor 1 de transcripción de unión a elementos reguladores de esteroides (del inglés Sterol regulatory element-binding transcription factor 1)
TGFβ	Factor de crecimiento transformante beta (del inglés transforming growth factor beta)
TLR	Receptor de tipo Toll (del inglés <i>Toll-like receptor</i> )
TNFα	Factor de necrosis tumoral (del inglés tumor necrosis factor)
TSC2	Complejo de esclerosis tuberosa 2 (del inglés Tuberous Sclerosis Complex 2)
UCP1	Termogenina (Uncoupling protein one)
UPR	Respuesta a proteínas desplegadas (del inglés unfolded protein response)
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad (del inglés very low density lipoprotein)
XBP1	Proteína de unión a la caja X (del inglés X-box Binding Protein 1)

## 1.0 Resumen

**Introducción:** FOXO1 es un factor de transcripción vinculado a la regulación de la expresión de genes involucrados en el crecimiento celular, proliferación y diferenciación. Este Factor de transcripción es un blanco dentro de la vía de señalización de la insulina, el cual regula la homeostasis de glucosa ya que en su forma activa aumenta o reprime la expresión de diferentes genes que actúan por distintas vías metabólicas. La resistencia a la insulina, condición bioquímica en la cual el efecto de la insulina a nivel celular se ve disminuida como resultado de alteraciones moleculares que involucran la inactivación de la vía de señalización de la insulina, que progresivamente lleva al organismo al estado de resistencia, se encuentra implicada en el desarrollo de los elementos constitutivos del síndrome metabólico, de alta prevalencia en población mexicana. **Objetivo:** Identificar nuevos polimorfismos de nucleótido único en el sitio de unión al ADN del gen que codifica para el factor de transcripción FOXO1 en individuos mexicanos con resistencia a la insulina. **Métodos:** Se analizaron muestras sanguíneas de 30 voluntarios donadores de sangre provenientes del centro de transfusión sanguínea de Cuernavaca y del Hospital ISSSTE de Cuautla, Morelos en el periodo 2008 a 2014, con resistencia a la insulina documentada por HOMA-IR. Se obtuvo ADN por purificación de fenol cloroformo y se evaluó su purificación, integridad y amplificación por PCR. Se diseñaron los oligonucleótidos para amplificar el segmento FH/DBD que se encuentra en el exón 2. Posterior a su estandarización se realizó PCR punto final sobre cada una de las muestras de ADN. Se realizó purificación de los productos de PCR por método de fenol y se secuenciaron por el método Sanger para posteriormente ser analizados en el programa Snapgene v. 5.2.4 y DNA Dynamo Demo. El análisis estadístico fue de tipo descriptivo con el programa Stata v.13 **Resultados:** El 57% de la población fue de sexo masculino; la edad promedio fue de 34 años (DE± 12.0). La media de los valores de insulina fue de 21.6 UI/ml (DE± 13.2). de glucosa 99 mg/dl (DE± 13.5). y de HOMA-IR 5.5 (DE± 4.3). Se identificaron 13 SNP con frecuencias de entre 3.33% a 33.33%, 3 correspondían al sitio FH/DBD del exón 2, 6 variantes correspondían al exón 2 fuera del segmento FH/DBD y 4 SNP correspondían al intrón 2 **Conclusión:** Se identificaron 3 nuevos SNP en el FH/DBD del exón 2 de FOXO1 que no contaban con reportes previos y 9 nuevos SNP en el resto del segmento secuenciado que no pertenecía al sitio FH/DBD en el intrón 2 y exón 2 de FOXO1.

## 2.0 Introducción

La resistencia a la insulina (RI) es una condición bioquímica en la cual el efecto de la insulina a nivel celular se ve disminuida. Se considera como una condición que precede el desarrollo de diabetes mellitus y está íntimamente implicada en los elementos que componen al síndrome metabólico (SM).<sup>1</sup>

Las enfermedades o condiciones clínicas que integran el SM son un problema de salud pública a nivel mundial. Dichos componentes representan una serie de riesgos para desarrollar enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus tipo 2 (DT2). En 2009 se estableció por parte de la IDF y AHA/NHLBI (ATP III), el diagnóstico clínico del SM, en el cual deben existir tres de cinco criterios: 1) obesidad abdominal o circunferencia de cintura elevada (para centro y sudamérica se utilizan valores propuestos por la IDF: sexo masculino  $\geq 90$ cm y femenino  $\geq 80$ cm); 2) triglicéridos elevados  $>150$  mg/dL o en tratamiento para hipertrigliceridemia; 3) disminución de HDL-c (sexo masculino  $<40$ mg/dL y femenino  $<50$  mg/dL) o en tratamiento para hipoalfalipoproteinemia; 4) tensión arterial aumentada  $>130$  mmHg en sistólica y/o  $>85$ mmHg en diastólica o en tratamiento para hipertensión arterial; 5) elevación de glucosa en ayuno  $>110$ mg/dL o en tratamiento para hiperglucemia.<sup>2</sup> Por otra parte la ALAD publicó en el año 2010 sus criterios para el diagnóstico clínico del SM dirigidos principalmente para la población latinoamericana, en el cual las diferencias son las medidas para determinar la obesidad abdominal: circunferencia de cintura en hombres  $>94$  cm y en mujeres  $> 88$  cm, siendo ésta una condición necesaria más dos de los otros cuatro criterios restantes.<sup>3</sup>

Un elemento crucial en el desarrollo de la RI es la inactivación de alguno o varios de los componentes que actúan en la vía de señalización de la insulina, hormona cuya principal función es regular diversas vías metabólicas, específicamente la que participa en la homeostasis de glucosa, la cual tiene un efecto regulatorio directo sobre los tejidos hepático, adiposo y músculo esquelético;<sup>4</sup> es justamente la acción de la insulina en los tejidos blanco la que se ve profundamente afectada. Una molécula que es blanco de dichas funciones es el factor de transcripción conocido como FOXO1, el cual en su forma activa regula la homeostasis de glucosa al aumentar o reprimir la expresión de diferentes genes que actúan por distintas vías metabólicas, dichas acciones se dan principalmente en los tres tejidos previamente mencionados.



Los procesos moleculares de inflamación sistémica de bajo grado, como son lipotoxicidad y glucotoxicidad, que se desarrollan en el organismo por el aumento anormal del tejido adiposo, ocasionan una disfunción del adipocito. La cual favorece, por múltiples mecanismos, las alteraciones moleculares que involucran la inactivación de la vía de señalización de la insulina, que progresivamente lleva al organismo al estado de RI y que de no tratarse adecuadamente culmina con el desarrollo de múltiples enfermedades metabólicas que conllevan a una serie de complicaciones crónicas que amenazan la vida del individuo que las padece.

## **2.1 Gen FoxO1**

### **2.1.1 Factor de transcripción**

*FOXO1* pertenece a la familia de Factores Transcripcionales (FT) con cajas de Forkhead que están principalmente vinculados a la regulación de la expresión de genes involucrados en el crecimiento celular, proliferación y diferenciación. La característica que define a las proteínas FOXO es la presencia de la caja “forkhead”, que es un dominio para unirse al ADN (Ácido Desorribonucleico), este dominio es también llamado hélice alada por la apariencia de mariposa de los dominios en la estructura proteica del FT. Los genes de Forkhead son un subgrupo de proteínas de la familia de hélice-giro-hélice.<sup>5</sup>

Específicamente *FOXO1* se encuentra en el locus 13q14.11 del cromosoma 13, siendo un gen de 117,934 pares de bases, conformado por 3 exones y 4 intrones. El exón 1 inicia en la posición 4,957 y termina en la posición 6,015, el exón 2 va de la posición 110,738 a la 112, 089, y el exón 3 del 112,564 a la 115,931. El sitio de interés para el presente estudio es el Dominio de Unión al ADN del ForkHead que se encuentra codificado por una región en el exón 1 y otra en el exón 2, mismas que se encuentran a 104,723 nucleótidos de distancia entre uno y otro. En el Exón 2 también hay otras regiones de interés; dentro de la región que codifica para el Dominio de Unión al ADN se encuentran los sitios de unión al ADN 1 y 2, más adelante, río arriba, se encuentra el NLS, el NES y el Dominio de Transactivación. El exón 3 ya no forma parte de la región codificante para el mRNA de *FOXO1*.<sup>6</sup> Lo anterior se esquematiza en la figura 1.

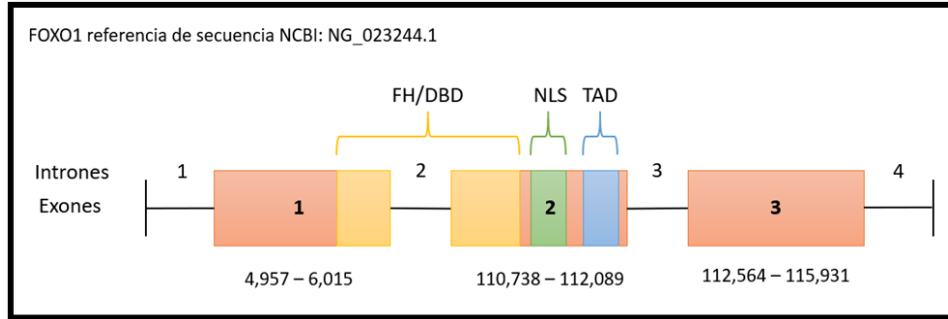


Figura 1. Organización de los sitios de interés en el gen que codifica para FOXO1. Se representa la organización general del gen que codifica para la proteína FOXO1, en las líneas negras representan los intrones que se encuentran numerados del 1 al 4, los exones se representan por los rectángulos, los cuales tiene diferente color de acuerdo con los dominios presentes en la proteína ya madura, los números se encuentran dentro de los rectángulos y van del 1 al 3. FH (Forkhead); DBD (DNA Binding Domain); NLS (Nuclear Localization Site); TAD (Transactivation Domain).

### 2.1.2 Proteína e interacciones

FOXO1 es un FT ubicado tanto en el núcleo como en citoplasma de las células, presente principalmente en el núcleo de las células no estimuladas, donde se encuentra ejerciendo su actividad transcripcional represora sobre el gen de PPAR $\gamma$ , en su configuración desfosforilada. La actividad transcripcional de FOXO1 esta principalmente mediada por la unión al motivo de reconocimiento conservado TTGTTTAC en la región reguladora de los genes blanco y su actividad se ve inhibida por la activación de la vía de señalización de la insulina y del IGF-1.<sup>7</sup>

FOXO1 funge como un regulador del metabolismo de la glucosa en respuesta al estrés oxidativo, la proteína consta de 655 aminoácidos. La estructura secundaria de FOXO1 contiene 4 alfa hélices representadas como H1, H2, H3 y H4, 3 beta plegamientos representados como S1, S2 y S3 y dos hélices representadas como W1 y W2.<sup>8</sup>

Cuenta con dos sitios de unión al ADN dentro de Dominio de unión al ADN, una región que interactúa con NLK y otra región que se requiere para la interacción con RUNX2; dicha interacción inhibe la actividad transcripcional de RUNX2 y media la expresión de BGLAP, que es dependiente de IGF1 e insulina. Interactúa también con PPP2R1, interacción que regula la desfosforilación de FOXO1 en el residuo de Treonina 24 y Serina 256, lo que lleva a su importación nuclear. Interactúa con PPAR $\gamma$ , regulando procesos en la adipogénesis. Interactúa con la isoforma 2 de, lo cual lleva a la ubiquitinación y degradación de FOXO1 por la vía del proteosoma. También interactúa con SIRT1 resultando en la deacetilación de FOXO1, activándolo, lo que lleva a la transcripción de genes involucrados en la reparación del DNA y

resistencia al estrés y acción en la vía de la gluconeogénesis. Existe una interacción con las proteínas 14-3-3, YWHAG y YWHAZ, para la que se requiere la fosforilación estimulada por insulina de Treonina 24 y/o Serina 256, lo que al final termina promoviendo la salida del núcleo y la pérdida de la actividad transcripcional. Interactúa con SKP2, interacción para la que se necesita la presencia de KRIT1 y en la que ubiquitina a FOXO1, ocasionando su degradación proteosomal. En los osteoblastos, interactúa con ATF4 por vía del Dominio de Unión al ADN, y regula la homeostasis de glucosa vía supresión de la proliferación de la célula beta con subsecuente disminución en la producción de insulina. Otra interacción importante que ocurre es con PRMT1, la cual metila a FOXO1 previniendo la fosforilación ocasionada por PKB/AKT1, lo que retiene a FOXO1 en el núcleo. También interactúa con ATG7, interacción que aumenta la respuesta al estrés oxidativo o la deprivación de suero y promueve el proceso de autofagia que conduce a muerte celular.<sup>5, 9, 10</sup>

FOXO1 puede ser acetilado por CBP/P300 mientras que es desacetilado por SIRT1 y SIRT2. Entre los sitios de acetilación de interés se encuentran los residuos de Lisina 245 y 248, ya que su acetilación debilita la habilidad de FOXO1 para unirse al ADN. También la acetilación en Lisina 242, 245 y 262 es suficiente para reducir su actividad transcripcional.<sup>11</sup>

Por el momento se conocen tres mecanismos por los que la acetilación de FOXO1 regula su actividad: 1. La acetilación en los residuos de Lisina en el FH/DBD reduce su habilidad para unirse al ADN. 2. La acetilación de FOXO1 promueve su fosforilación en Serina 256 (fosforilación que es mediada por AKT en la vía de señalización de la insulina) lo que lleva a la exportación nuclear de FOXO1. 3. La acetilación de FOXO1 puede llevar a exportación nuclear independientemente de si ha sido fosforilado o no; la desacetilación de FOXO1 promueve su retención nuclear.<sup>12</sup>

### **2.1.2.1 FOXO1 y 14-3-3.**

Una de las interacciones más importantes que suceden sobre FOXO1 es con la proteína 14-3-3, la cual reconoce la fosforilación sobre los residuos de Treonina 24 o Serina 256 con lo que se promueve su unión al factor FOXO1. Dicha interacción causa un cambio conformacional de FOXO1, lo que ocasiona la exposición del dominio NES a la exportina CRM1 lo que promueve la exclusión nuclear del complejo FOXO1/14-3-3.<sup>13</sup>

Como dicha interacción es dependiente de la fosforilación de FOXO1, al bloquear la fosforilación en el residuo de Serina 256 de FOXO1 se impide su unión a la proteína 14-3-3.<sup>14</sup> Entonces 14-3-3 previene la desfosforilación de FOXO1 por lo que determina el destino de FOXO1; al permitir su translocación entre el núcleo y el citoplasma al asociarse con NLS y NES, ocasiona ya sea la degradación o el reciclaje de FOXO1.<sup>15</sup>

### **2.1.3 Principales funciones de FOXO1**

Dentro de las múltiples funciones en las que se ve involucrado FOXO1 se describen las de mayor importancia y con relación para el estudio actual.

#### **2.1.3.1 Regulación durante el ciclo celular**

Se ha demostrado que la fosforilación de FOXO1 en el residuo de Serina 249 resulta en su localización citoplásmica; por ende, inhibición de la actividad de FOXO1 como FT. CDK2 fosforila a FOXO1 específicamente en dicho sitio, dicha fosforilación se ve abolida cuando existe daño al ADN que se reconoce a través de la vía dependiente de las proteincinasas CHK1 y CHK2 del ciclo celular. Al silenciar a FOXO1 con un siRNA se disminuyó la muerte inducida por daño al ADN, tanto en células con deficiencia en p53 como en células con p53 proficiente, lo que habla de una vía independiente a este regulador. Dicho efecto se revirtió al restaurarse la expresión de FOXO1 de manera dependiente a la fosforilación de Serina 249, por lo que existe una interacción funcional entre CDK2 y FOXO1 que provee un mecanismo que regula la apoptosis celular tras el daño a la hebra del ADN.<sup>16</sup>

Otro estudio señaló que la fosforilación de FOXO1 en el residuo de Serina 249 ocasionado por CDK1 interrumpía la unión de FOXO1 con las proteínas 14-3-3, por lo que se promovía la estancia nuclear de FOXO1 y su actividad transcripcional llevando a la muerte celular en las neuronas. En las células proliferantes, CDK1 induce a FOXO1 en la fase G2/M del ciclo celular, resultando en la expresión dependiente de FOXO1 del regulador mitótico PLK.<sup>17</sup>

En otros experimentos se ha demostrado que FOXO1 suprime la expresión de ciclina D1 y ciclina D2, proteínas expresadas en las células proliferativas y que regulan la progresión del ciclo celular. Por ensayos de ChIP se demostró la asociación de FOXO1 con el promotor de ciclina D1.<sup>18</sup>

### **2.1.3.2 Participación en angiogénesis**

FOXO1 es un importante regulador del crecimiento vascular. Se ha demostrado en ratones que al realizar una delección específica de FOXO1 en tejido endotelial, se induce un aumento en la proliferación de las células endoteliales causando hiperplasia y engrosamiento de la vascularidad. Contrariamente, la expresión forzada de FOXO1 restringe la expansión vascular y lleva al adelgazamiento de los vasos sanguíneos y a una menor ramificación vascular; se puede concluir entonces que FOXO1 actúa como un guardián en la quiescencia endotelial. FOXO1 suprime la señalización de proteínas Myc, que son una familia de protooncogenes con una función poderosa de conductores del metabolismo anabólico y del crecimiento. La ablación de Myc perjudica la glucólisis, la función mitocondrial y la proliferación de células endoteliales, mientras que la sobreexpresión específica de FOXO1 en células endoteliales alimenta estos procesos. Al restaurar la señalización de Myc en endotelio con FOXO1 sobre expresado se normaliza la actividad metabólica y el comportamiento de las ramificaciones vasculares.<sup>19</sup>

### **2.1.3.3 Participación en señalización de la Insulina y homeostasis de glucosa**

En presencia de insulina, al interactuar esta hormona con su receptor y causar la cascada de eventos río abajo como consecuencia del acoplamiento de IRS y la activación de PI3K hasta la fosforilación y activación de AKT, se llega a la fosforilación del factor de transcripción FOXO1 en tres residuos de aminoácidos, lo que facilita su interacción con las proteínas 14-3-3. Esta interacción exporta a FOXO1 del núcleo celular,; ya fosforilado, FOXO1 es entonces ubiquitinizado y degradado por el proteosoma, lo que impide su actividad transcripcional. En el caso contrario, en ausencia de insulina como en el caso de ayuno prolongado, no hay activación de la vía de señalización dependiente de la insulina por PI3K/AKT por lo que FOXO1 no se fosforila, se importa al núcleo en donde se une a la región promotora del receptor de insulina y de las enzimas que actúan en procesos clave de la gluconeogénesis, como la subunidad catalítica de la G6PC y del PCK1 estimulando su transcripción.<sup>20</sup>

Específicamente hablando de la gluconeogénesis, durante periodos de ayuno FOXO1 es el principal regulador de la G6PC y de la PCK1, por la acción de FOXO1 sobre los promotores de los genes que codifican para las enzimas antes mencionadas. Además de la vía que regula a FOXO1 por fosforilación, su actividad también se regula por acetilación y desacetilación. La desacetilación se regula por HDAC-I y HDAC-II también conocidas como SIRT, lo que permite

inactivar la transcripción de los genes que participan en la gluconeogénesis. En un estado de ingesta por la vía de ERK aumenta la actividad de EST1, el cual interactúa con FOXO1 cumpliendo una tarea de cofactor con CBP el cual, junto con p300, poseen actividad intrínseca de acetiltransferasa por lo que sFOXO1 se acetila.<sup>21</sup> De esta manera se forma un complejo EST1, CBP, FOXO1 acetilado y se inhibe la transcripción de genes que participan en la gluconeogénesis.<sup>22</sup>

PGC-1 $\alpha$ , se une y coactiva a FOXO1 de la misma manera que puede ser inhibido por la fosforilación mediada por AKT, por lo que se observa una gluconeogénesis estimulada por PPARGC1 suprimida por insulina, pero que al crearse un alelo mutante de FOXO1 que es insensible a la insulina se revierte completamente esta supresión en el hepatocito, por lo que FOXO1 y PPARGC1 interactúan en la vía de la insulina que regula la gluconeogénesis.<sup>23</sup>

Se ha demostrado la acción de un “switch” inducido por el ayuno, que se encuentra constituido por la histona acetiltransferasa p300 y por SIRT1, que juntos mantienen un equilibrio del metabolismo bajo la inducción de CRTC2 y FOXO1. Al asociarse CRTC2 con p300, el cual lo acetila en el residuo de lisina 628, estimula la expresión de genes gluconeogénicos tras la activación de la vía de señalización de glucagon, mismos efectos que se ven disminuidos durante un estado de ayuno más prolongado donde SIRT1 desacetila a CRTC2 regulándolo a la baja, situación que también aumenta la expresión de FOXO1 al ser desacetilado por SIRT1, actuando con su coactivador PPARGC1 en la acción de la gluconeogénesis. Cuando SIRT1 es abolido o antagonizado de manera específica en los hepatocitos se observa un aumento en la actividad gluconeogénica de CRTC2, aumentando la producción y salida de glucosa. De esta manera existe un intercambio entre las configuraciones activas e inhibidas de 2 reguladores gluconeogénicos durante el ayuno, que mantienen el balance del metabolismo de los carbohidratos.<sup>24</sup>

Se ha propuesto un mecanismo alternativo por el cual el glucagon también regula a FOXO1 promoviendo la translocación nuclear y estabilidad por medio de la vía de AMPc y la fosforilación en el residuo de Serina 276 dependiente de la proteína quinasa A. En un estudio se reemplazó el residuo de serina en la posición 276 por alanina, esto imitó el bloqueo de la fosforilación mediada por Akt y al reemplazar la misma serina en la posición 276 por aspartato se

imitó la función de fosforilación mediada por Akt, por lo que se regula de manera muy marcada la estabilidad y localización nuclear de FOXO1 en hepatocitos humanos que finalmente, en el caso del remplazo por aspartato, aumenta la producción hepática de glucosa por la vía de la gluconeogénesis y en el caso de la pérdida de la serina por alanina disminuye. La misma respuesta se observa en modelos murinos en los cuales se realiza el “Knock in” con los mismos cambios previamente comentados. Esta actividad es opuesta a lo observado bajo la activación de la vía de señalización de la insulina.<sup>25</sup>

Uno de los genes blancos de FOXO1 es *Hmox1*, que dentro de sus funciones al verse aumentado desmedidamente como en caso de una supresión de IRS1 y 2, interrumpe el funcionamiento del Complejo III y Complejo IV de la cadena respiratoria, disminuyendo la proporción de NAD<sup>+</sup>/NADH y la producción de ATP, situación que se ve revertida al abolir FOXO1 hepático, normalizando los niveles de *Hmox1*, reduciendo la acetilación de PPARGC1 y restaurando el metabolismo oxidativo en la mitocondria.<sup>26</sup>

Cuando se realizó la ablación somática de FOXO1 en células progenitoras enteroendocrinas Neurog3<sup>+</sup> se observó un aumento en células intestinales que son sensibles a la insulina y que expresan marcadores de células beta maduras, secretando insulina y péptido C bioactivos en respuesta a la glucosa y sulfonilureas; al realizarse la ablación de las células beta con estreptozocina, las células intestinales positivas a insulina se regeneraron y produjeron insulina revirtiendo la hiperglucemia. Dichos experimentos nos demuestran que los progenitores enteroendocrinos Neurog3<sup>+</sup> requieren de FOXO1 para evitar su diferenciación en células positivas a insulina.<sup>27</sup>

#### **2.1.3.4 Participación en adipogénesis y metabolismo lipídico**

*FOXO1* juega un papel clave en la adipogénesis durante la diferenciación del preadipocito comprometido hasta el adipocito maduro.<sup>28</sup> FOXO1 interactúa con PPAR $\gamma$ , el cual regula la diferenciación terminal y el metabolismo lipídico en el adipocito maduro. Su actividad es principalmente antagónica al suprimir la actividad de PPAR $\gamma$ . En su configuración activa, FOXO1 se une al promotor PPAR $\gamma$  inhibiendo su actividad transcripcional, suprimiendo competitivamente la formación del complejo funcional PPAR $\gamma$ /RXR, lo que establece la inhibición de la diferenciación del adipocito.<sup>29</sup> La desacetilación de FOXO1 mediada por SIRT2 aumenta la afinidad de FOXO1 con PPAR $\gamma$  llevando a la inhibición de la diferenciación del

adipocito. FOXO1 inhibe la diferenciación de la línea celular de preadipocitos 3T3- F442A al detener el ciclo celular requerido en las etapas tempranas de la diferenciación del adipocito.<sup>30</sup>

FOXO1 también regula a las proteínas de unión y potenciadores de CCAAT, al regular su expresión y actividad transcripcional, que al igual que PPAR $\gamma$ , son factores de transcripción esenciales en la diferenciación terminal del adipocito durante la adipogénesis. Se ha demostrado que la rápida activación de CEBP $\beta$  y CEBP $\delta$  regulan al alza la expresión de PPAR $\gamma$  en las etapas tempranas de diferenciación. Aparte PPAR $\gamma$  modula la expresión de genes involucrados en el metabolismo glucolípídico como lo es GLUT-4, el cual se encarga de regular el consumo de glucosa en tejido adiposo y músculo esquelético.<sup>31, 32</sup>

Cuando se tiene a FOXO1 constitutivamente activo se previene la maduración del preadipocito. Cuando se tiene una mutante negativa dominante se restaura la diferenciación del fibroblasto en adipocitos, por lo que la haploinsuficiencia de FOXO1 también protege de diabetes inducida por la dieta.<sup>33</sup>

FOXO1 realiza acciones opuestas a la activación de STAT3 referente a la expresión proteína r-agouti y pro-opiomelanocortina, las cuales juegan un papel importante en la regulación del comportamiento alimenticio, la primera estimulando el apetito y la segunda provocando la sensación de saciedad. FOXO1 mantiene la función de coactivador de Argp y de correpressor de POMC, por lo que media los efectos de la leptina dependientes de Argp referente al consumo de alimentos.<sup>34</sup>

#### **2.1.4 Participación de FOXO1 en estados de alteración metabólica**

En un estudio realizado en modelos murinos con dieta alta en grasa se observó que FOXO1 reprime la expresión de genes de la glucólisis en células endoteliales, lo cual impide el crecimiento de la célula endotelial. Este efecto provoca que exista una angiogénesis alterada durante la expansión del tejido adiposo, lo que favorece una disfunción del mismo tejido que en consecuencia lleva a disminución en la tolerancia a la glucosa y aumento de los niveles de triglicéridos en suero y en los tejidos del organismo. En ese mismo estudio se observó que en modelos murinos con “Knock Out” de FOXO1 en células endoteliales se observa un aumento en la glucólisis, que aumenta el metabolismo celular, su crecimiento y proliferación. El aumento en



el crecimiento de la célula endotelial preserva las funciones del tejido adiposo y promueve la tolerancia sistémica a la glucosa y el metabolismo de lípidos.<sup>35</sup>

Otro estudio, en tejido hepático y hepatocitos de modelos murinos expuestos a ayuno y estrés diabético, dilucidó la participación de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en el aumento de la producción de glucosa hepática. En dichos modelos se observaron valores elevados de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  circulante, así como un aumento en la expresión del receptor FP en hepatocitos. La unión de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  al FP activa la vía de  $\text{CaMKII}\gamma$  y p38 mediado por la liberación de calcio intracelular,  $\text{pCaMKII}\gamma$  fosforila p38 el cual interactúa de alguna manera con FOXO1 facilitando su nucleación, donde FOXO1 aumentará la expresión de genes de la gluconeogénesis como lo son PCK1 y G6Pasa. Esto ocasionará el aumento en los niveles de glucosa circulante. Dicha vía se ve exacerbada en estados de ayuno y de obesidad.<sup>36</sup>

Dentro del estudio de las complicaciones cardiovasculares de la diabetes, un grupo de estudio de la Universidad de Texas descubrió la participación de FOXO1 en el desarrollo de cardiomiopatía diabética en modelos murinos expuestos a una dieta alta en grasas. Específicamente mostraron que FOXO1 se encontraba activo de manera continua en tejido cardíaco de ratones con diabetes ya fuera inducidos genéticamente o con dieta rica en grasa. A través de varios experimentos determinaron que la expresión forzada de FOXO en cardiomiocitos primarios ocasiona fosforilación de Akt vía calcineurina/PP2A, que culmina en sensibilidad a la insulina reducida y alteración del metabolismo de glucosa. La activación persistente de FOXO1 bajo condiciones de DM2 provoca alteraciones en el metabolismo cardíaco que pueden ser provocadas por PDK4 en la utilización del sustrato metabólico y aumento en el consumo de lípidos. Esto se exagera en la atenuación de la señalización de insulina a través de la inhibición dependiente de FOXO1 de protein fosfatasa e inactivación de IRS1, que culmina en cardiomiopatía, falla cardíaca y muerte. Los principales eventos que se observan en la célula cardíaca tras esta activación persistente son aumento en el consumo y de la acumulación de lípidos intracelulares, lo que lleva a un aumento en la lipotoxicidad, así como una disminución en la actividad del IRS1 que lleva a una disminución en la sensibilidad a la insulina, lo cual culmina en favorecer significativamente el desarrollo de cardiomiopatía diabética.<sup>37</sup>

Se ha demostrado que tanto en enterocitos como en hepatocitos FOXO1 estimula a APOC3 una apolipoproteína presente en las VLDL, al mutar o eliminar el sitio de unión al ADN de FOXO1 se abolió la estimulación mediada por el mismo y la respuesta de APOC3 a insulina. En ratones en los que se expresa constitutivamente FOXO1 se observó un estado de hipertrigliceridemia, en ratones diabéticos la expresión de FOXO1 se encuentra desregulada, culminando en una producción elevada y distribución nuclear sesgada de FOXO1, por lo que existe un enlace molecular entre la deficiencia de insulina, o resistencias a la insulina y una aberrante producción de apoC-III en la hipertrigliceridemia diabética.<sup>38</sup>

## **2.2 Insulina**

La insulina es un péptido de 51 aminoácidos constituido de dos cadenas polipeptídicas (A y B), de 21 y 30 aminoácidos, respectivamente, estabilizados por puentes disulfuro. La insulina es miembro de la familia de péptidos denominada IGF. Su principal función yace en regular la homeostasis de glucosa, específicamente en el tejido hepático, adiposo y músculo esquelético, donde realiza diferentes funciones. En el tejido muscular esquelético la insulina promueve la utilización de glucosa y su almacenamiento al incrementar el transporte de glucosa al interior de las células, así como la síntesis de glucógeno. En el tejido hepático la insulina activa la síntesis de glucógeno, aumenta la expresión de genes lipogénicos y disminuye la expresión de genes de la gluconeogénesis. En el tejido adiposo blanco, suprime la lipólisis y aumenta el transporte de glucosa y la adipogénesis.<sup>39</sup> El receptor de insulina pertenece a la familia de receptores con actividad intrínseca de cinasas de tirosina, es una glucoproteína integral de membrana formada por dos subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$ . La subunidad  $\alpha$  contiene el sitio de unión a la insulina mientras que la subunidad  $\beta$  se compone de un dominio extracelular, uno transmembrana y uno intracelular que posee la actividad de cinasa. El receptor de insulina está presente en todas las células de los mamíferos, aunque sus niveles son más altos en el hígado, músculo y tejido adiposo.<sup>20,40</sup>

### **2.2.1 Vía de señalización de la insulina**

Cuando la insulina se une a la subunidad  $\alpha$  genera cambios conformacionales dimerizando al receptor y formando el complejo  $\alpha_2\beta_2$  en la membrana celular causando la autofosforilación en los residuos de tirosina 1158, 1162 y 1163 de la subunidad  $\beta$ , los cuales son reconocidos por proteínas adaptadoras que incluyen miembros de la familia del IRS (Shc, Gab1,

Dock1 y Cbl), los cuales funcionan como moléculas acopladoras que reclutan a otras subunidades para constituir un complejo macromolecular que impacta en diferentes cascadas de señalización. La insulina actúa por dos vías principales, la activación de Ras-MAPK y la vía de PI3K Akt.<sup>40, 41</sup>

Las proteínas IRS están caracterizadas por la presencia de un dominio de unión a fosfotirosina, al cual le sigue una cola carboxilo terminal que contiene múltiples sitios de fosforilación en residuos de serina y treonina.<sup>42</sup> La porción carboxilo terminal de cada IRS tiene 20 sitios potenciales de fosforilación en tirosina que actúan como interruptor de prendido y apagado para transducir la acción de la insulina, reclutando río abajo proteínas señalizadoras, entre las cuales se incluye la subunidad de PI3K.<sup>43</sup>

La vía de PI3K/AKT es responsable de las acciones metabólicas de la insulina en la célula, mientras que la vía de las MAPK/RAS regula la expresión génica y los efectos mitogénicos asociados a la insulina. La vía PI3K/AKT inicia cuando el IRS activa la fosfatidilinositol-3-cinasa que fosforila PIP2 y produce PIP3 que es un segundo mensajero, el cual activa a la PDK1y a PDK2, las cuales activan a PKB al inducir la fosforilación en residuo de treonina 308 y residuo de serina 473.<sup>44</sup> La AKT tiene 3 isoformas (AKT 1-3) con diferentes funciones, activadores, substratos y localizaciones en los compartimentos celulares. La isoforma AKT2 tiene como blancos varias moléculas que participan en el control del metabolismo, al favorecer la incorporación de glucosa en músculo y tejido adiposo, debido a la translocación de GLUT4 del compartimento intracelular a la membrana celular. También AKT participa en la síntesis de glucógeno por la inhibición de GSK-3. Participa en la síntesis de proteínas al inhibir TSC2, la cual activa mTORC1 y S6K. La AKT2 también fosforila e inhibe CRTC2, un coactivador de CREB que aumenta la gluconeogénesis hepática y la síntesis de lípidos al regular SREBP1c. Por último, AKT 2 fosforila a FOXO1 en el residuo de treonina 24 y serina 256 lo cual inhibe la actividad transcripcional del mismo que lleva a la supresión de la producción hepática de glucosa y aumenta la sobrevivencia celular en el miocardio.<sup>20,40, 44</sup>

Cuando se activa la AKT 2, por la acción de la insulina, se fosforila a FOXO1 en estos sitios se promueve la exportación nuclear del factor de transcripción, con lo que inhibe su actividad transcripcional sobre su gen; ya en el citoplasma promueve la interacción con Skp2, la

cual es una subunidad del complejo proteico Skip1/Cul1/F-box, que establece la ubiquitinación de FOXO1.<sup>45</sup>

Por otro lado, los efectos promotores de proliferación mediados por la insulina son por la vía de la MAPK/Ras. Esta vía inicia con la fosforilación de tirosina de las IRS que facilita el reclutamiento de las proteínas con dominio SH2 como GRB2, que a su vez incorpora el factor GEF para activar la proteína pequeña Ras, catalizando el intercambio de GDP por GTP. Ya activa Ras-GTP opera como un interruptor molecular, iniciando la cascada de MAPK al activar Raf, que a su vez activa a MEK, el cual actúa sobre ERK1/2 activándolos. ERK1/2 son trasladados al núcleo en donde catalizan la fosforilación de factores de transcripción que regulan la expresión génica, la proliferación y diferenciación celular. ERK1 también es necesaria para la adipogénesis.<sup>40</sup>

### **2.2.2 Vías de regulación de la insulina**

Existen mecanismos de autorregulación y mecanismos no relacionados con los activados por la insulina, conocidos como mecanismos de regulación homólogos o heterólogos, respectivamente.

La inactivación del receptor de insulina se induce por la acción de fosfatasas de fosfotirosinas que desfosforilan residuos específicos de tirosina del receptor activo. Otro mecanismo asociado al receptor de insulina es la fosforilación de la subunidad  $\beta$  en residuos de serina y treonina, esta fosforilación afecta negativamente la actividad cinasa del receptor. La principal cinasa asociada a la fosforilación del receptor es la proteína cinasa C que fosforila en diferentes serinas o treoninas a la subunidad  $\beta$ . Otras cinasas que fosforilan al receptor y ocasionan disminución en su actividad son: proteína cinasa A; cinasa aminoterminal de c-JUN y MAP. Otro mecanismo es la regulación de la expresión del receptor, por lo que en presencia de insulina la cinasa AKT fosforila el factor de transcripción FOXO1 por lo que se excluye del núcleo y de esta forma se impide la transcripción del gen de receptor de insulina.<sup>20,40</sup>

La regulación de los IRS por medio de la fosforilación en residuos de serina y treonina es de los mecanismos principales para su inhibición. La fosforilación de estos residuos se asocia con la atenuación de la señal de la insulina ya que se disminuye la capacidad del IRS para activar PI3K. Existen también diversas proteínas adaptadoras que requieren interactuar con IRS, lo que

disminuye la posibilidad de transducir la señal de insulina hacia el interior celular, lo que sucede cuando éste se encuentra fosforilado. Una de ellas son las proteínas SOCS, que interactúan tanto con el receptor como con el sustrato, lo que inhibe la fosforilación de tirosinas del IRS, promoviendo la degradación por el proteosoma del IRS e inhibiendo la actividad de cinasa del receptor. Otras proteínas adaptadoras son Grb10 y Grb14 que se unen a las fosfotirosinas del receptor de insulina impidiendo su interacción con IRS.<sup>40</sup>

También existen fosfatasas de lípidos que pueden regular la señalización de insulina modulando los niveles de PIP3. PTEN desfosforila PIP3 por lo que se antagoniza la vía de PI3K/AKT. PTEN también puede desfosforilar IRS-1 alterando la misma vía por estos dos mecanismos. Otra enzima, es la fosfatasa-2 del inositol, que desfosforila PIP3.<sup>40</sup>

En un estado posprandial las células  $\beta$  del páncreas secretan insulina para regular la homeostasis sistémica de nutrientes. La insulina estimula el consumo de glucosa al interior del tejido muscular y adiposo, la síntesis de glucógeno en el hígado y de proteínas en el músculo, la síntesis lipídica y el almacenamiento de estos en tejido hepático y adiposo, a la vez inhibe la oxidación de los ácidos grasos, la glucogenólisis y la gluconeogénesis, así como la apoptosis y autofagia en los tejidos que son sensibles a la insulina. En un estado de ayuno, la secreción de la insulina disminuye y aumenta la acción de diferentes hormonas contrarreguladoras, como el glucagon, el uso de ácidos grasos derivados de la lipólisis de adipocitos para la generación de ATP y la regulación de la homeostasis de glucosa. La acción, regulación y efectos transitorios de la insulina se ven comprometidos en los tejidos con resistencia a la misma, que se ha asociado al desarrollo de DT2.<sup>46</sup>

## **2.3 Resistencia a la insulina**

### **2.3.1 Concepto**

La RI puede definirse como la disminución de la eficacia de la insulina, ya sea exógena o endógena, en el tejido muscular, hepático y adiposo.<sup>47</sup> Otra forma de comprender esta situación, es teniendo en cuenta las funciones de la insulina en estado fisiológico y que en la condición de RI se ve disminuida a nivel celular, lo que causa un aumento en la secreción de la hormona, con la finalidad de compensar el defecto que existe en la actividad tisular y lograr mantener la homeostasis en la glucemia. Ante este fenómeno es que se suscita el estado hiperinsulinémico que caracteriza dicha condición.<sup>1</sup>

### 2.3.2 Fisiopatología

El proceso inflamatorio se liga directamente al desarrollo de RI, la cual se induce a través de múltiples mecanismos. El estado de obesidad provoca hipertrofia de los adipocitos, ocasionando un incremento en la secreción de adipocinas y citosinas proinflamatorias, además de liberación desregulada de ácidos grasos libres, lo que contribuye a un estado local y sistémico de inflamación.

Los agentes proinflamatorios de los que se ha hablado anteriormente como las interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-6, el TNF $\alpha$ , los ácidos grasos saturados, la endotelina 1 y la angiotensina II aumentan la actividad de las cinasas que fosforilan al IRS1. La hiperfosforilación de residuos de serina y treonina del IRS disminuye su fosforilación en tirosina por lo que reduce la interacción con PI3K, lo que a su vez altera la fosforilación y activación de AKT. Además de que la fosforilación de serina y treonina acelera la degradación de IRS.<sup>20</sup>

Al inhibirse IRS1 e IRS2 se inactiva PI3K lo que altera la homeostasis nutricional y prolonga la activación de las MAP cinasas como ERK1/2, p38 y JNK lo que promueve a mitogénesis y el sobrecrecimiento, que de forma crónica y a largo plazo resulta en obesidad. Experimentalmente se ha visto en modelos murinos que ratones que carecen ya sea de la subunidad catalítica de PI3K o AKT2 presentan resistencia a la insulina y DT2.<sup>48</sup>

La inactivación hepática de PI3K, PDK1 y mTORC2 o de las dos isoformas de AKT: AKT1 y AKT2, es suficiente para inducir hiperglucemia, hiperinsulinemia e hipolipidemia. Mediante la mutación a alanina de los tres sitios que fosforila AKT, se bloquea la fosforilación de FOXO1 lo cual ocasiona la expresión de FOXO1 constitutivamente activo, en hígado causa resistencia a la insulina y en miocardio se ha observado que causa la muerte embrionaria en ratones. Por el contrario, la inactivación de FOXO1 en hígado de ratones con DT2 revierte el estado de hiperglucemia, o en miocardio de ratones con DT2 previene el desarrollo de falla cardíaca, sugiriendo que la activación de FOXO1 es suficiente para la inducción de hiperglucemia y falla orgánica consecuentes de la resistencia a la insulina o DT2.<sup>49, 50, 51, 37</sup>

Otro factor que participa en la inflamación asociada a la obesidad son los TLR, principalmente el TLR4. Esta familia de receptores se activa por patrones moleculares asociados a lipopolisacáridos e inducen inflamación por la vía de NF- $\kappa$ B. En respuesta a una señal

inflamatoria como la de  $\text{TNF}\alpha$  se activa la cinasa del inhibidor de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  (IKK) induciendo la degradación de  $\text{I}\kappa\text{B}$ , que es el inhibidor de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , por lo que este último queda libre, migra al núcleo donde promueve la activación de varios genes como  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  y  $\text{IL-6}$ , las cuales activan cinasas de serina como JNK,  $\text{IKK-}\beta$  y PKC, que fosforilan los residuos de serina del receptor de insulina y de IRS-1.<sup>20</sup>

Los ácidos grasos saturados son agonistas del TLR4, lo que incrementa la activación de la expresión de enzimas que participan en la biosíntesis de ceramidas. Las ceramidas pueden regular la actividad de la AKT al modular la actividad de la fosfatasa de fosfoproteína 2<sup>a</sup>, que la desfosforila e inactiva, al igual que modula a la proteína cinasa C  $\zeta$  que la fosforila en serina inhibiendo la translocación a la membrana para estar disponible y ser activada.<sup>20</sup> Todos estos eventos son consecuencia de la inflamación, e inhiben la transducción de la señal de insulina ocasionando una menor translocación del GLUT4, disminuyendo la captación de glucosa sanguínea y ocasionando una hipersecreción de insulina como respuesta compensatoria.<sup>52</sup>

Existe una asociación estrecha entre la respuesta inflamatoria y el estrés del retículo endoplásmico. En condiciones de estrés celular que incrementan la sobrecarga del retículo endoplásmico se generan alteraciones funcionales, como mal plegamiento de proteínas, disminución del transporte de proteínas al aparato de Golgi, y depleción de calcio. De manera compensatoria se activa un mecanismo conocido como UPR. La UPR activa 3 cinasas que detectan el estrés: PERK, IRE-1 y ATF-6. PERK promueve la activación de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ . IRE-1 interactúa con el factor 2 asociado al  $\text{TNF}\alpha$  que lleva a la activación de  $\text{IKK}\beta$  y JNK. ATF-6 activa  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ .<sup>20</sup>

En DT2, la RI probablemente se relaciona con disfunción mitocondrial, debido a que la mitocondria se encarga de la oxidación y metabolismo de ácidos grasos y glucosa. Su función puede ser disminuida por alteraciones lipídicas que causan cambios estructurales y dinámicos en la membrana mitocondrial, condicionando una disminución en el transporte del sustrato, como el glutatión (GSH) que es el principal antioxidante celular. Aunado al aumento del estrés oxidativo que a su vez ocasiona un aumento de ROS mitocondriales se crea un círculo vicioso que ocasiona disfunción mitocondrial e incluso muerte celular, lo cual también se encuentra favorecido por el estado alterado del organismo en el que se van acumulando los ácidos grasos libres, con un incremento en los niveles de diacilglicerol y de ceramidas, los cuales inhibirán la

transducción de señales activadas por insulina. El diacilglicerol por medio de la activación de PKC y las ceramidas regulan negativamente la vía de AKT.<sup>20</sup>

En la figura 2 se muestran esquematizados ejemplos de los mecanismos moleculares que llevan al desarrollo de RI en el hepatocito y en célula del músculo esquelético.

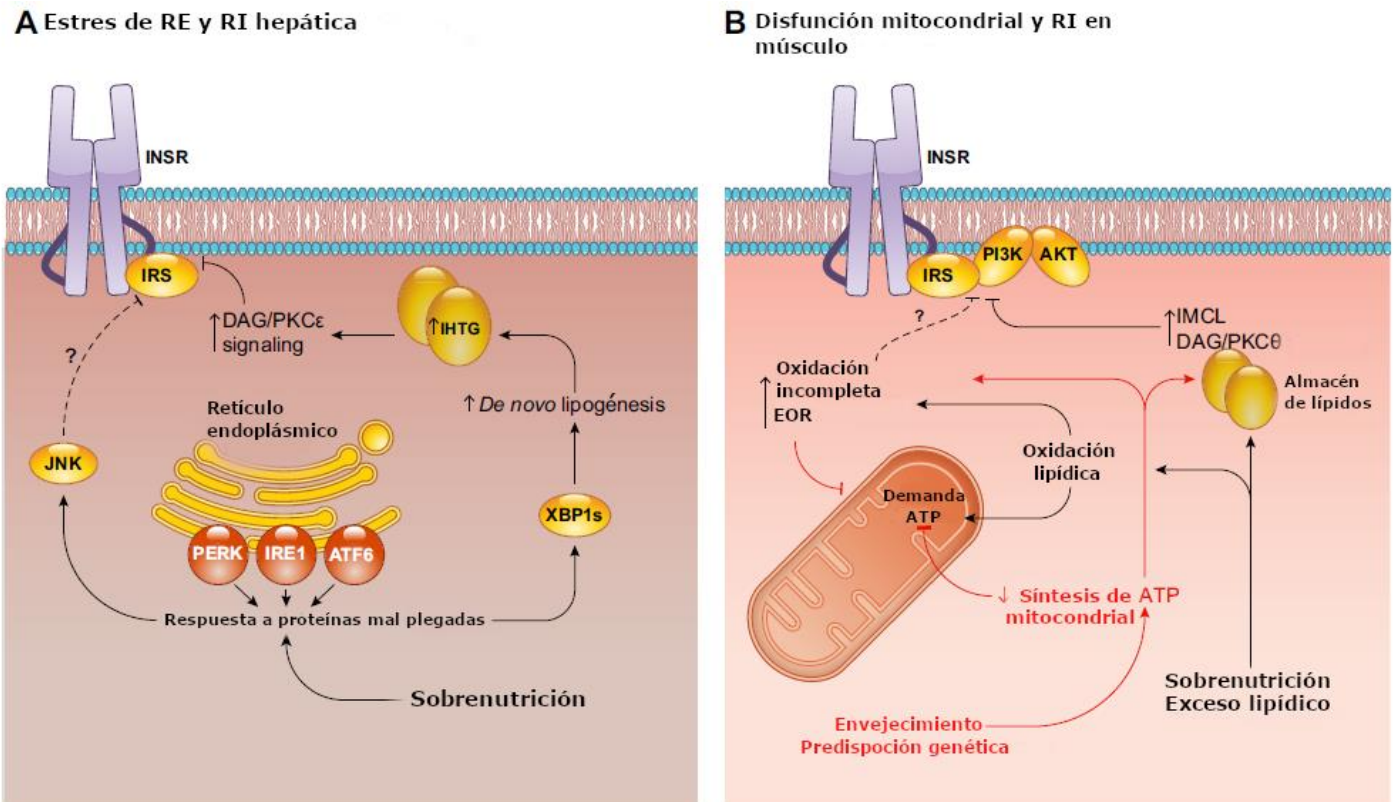


Figura 2. Mecanismo molecular de RI en hepatocito y en célula de músculo esquelético. En A estrés de retículo endoplásmico por estrés nutricional y en B afección mitocondrial y estrés nutricional en célula músculo esquelética. Modificado de: Petersen et al; 2018.<sup>53</sup>

### 2.3.3 Afección en aparatos y sistemas con Resistencia a la insulina

#### 2.3.3.1 Resistencia a la insulina en Sistema nervioso central (SNC)

El apetito en el ser humano es controlado por la acción de la insulina en el SNC, el hipotálamo está compuesto por diferentes núcleos neuronales con distintas conexiones y neuroquímica entre las que se observa la regulación del consumo alimenticio, liberación hormonal, entre otras funciones que no conciernen al presente estudio. Cuando existe una dosificación leve de insulina por infusión intracerebroventricular, disminuye el consumo alimenticio y la producción hepática de glucosa, mismos efectos que se ven bloqueados al aplicar inhibidores de PI3K.<sup>54</sup>



De manera muy similar a la leptina, hormona secretada por los adipocitos, que inhibe el consumo de comida a través de activar neuronas que poseen receptores para leptina en el sistema nervioso central, activando la cascada de Jak3 a Stat3, la insulina en el cerebro reduce el consumo de comida por activación del PI3K vía IRS2 e inactivando FOXO1. Tanto la leptina como la insulina promueve la fosforilación de IRS2 en residuo de tirosina. Al eliminar IRS2 de neuronas que expresan el receptor de leptina se desarrolló diabetes y obesidad, estados que fueron revertidos al inactivar a FOXO1.<sup>55, 56, 57</sup>

### **2.3.3.2 Resistencia a la insulina en tejido adiposo**

Cuando la vía de señalización activada por la insulina se ve disminuida en el tejido adiposo, el desarrollo de los adipocitos se ve retrasado y no se pueden convertir en lípidos a los carbohidratos para su almacenamiento, por lo que la glucosa y los lípidos son redistribuidos a la circulación y a otros órganos, lo que resulta en hiperlipidemia y la acumulación de ácidos grasos en otros órganos.<sup>58</sup>

En el estado de obesidad se ve afectado el balance entre la generación de hormonas y de adipocinas del tejido adiposo, promoviendo la resistencia a la insulina. TNF- $\alpha$ , IL-6 y leptina incrementan su concentración circulante en la obesidad, siendo las 3 proinflamatorias, mientras que la adiponectina que tiene tanto un efecto antiinflamatorio, como de potenciador de la sensibilidad a la insulina se ve marcadamente reducida su concentración circulante.

### **2.3.3.3 Resistencia a la insulina hepática**

La sobreexpresión de IKKb para la activación de NF $\kappa$ B en el hígado de ratones, es más que suficiente para inducir el desarrollo de RI y DT2. Por último, el TNF-a reduce la presencia de la proteína de IRS1 por activación de JNK y de S6K, lo que también resulta en el desarrollo de RI.<sup>59, 60</sup>

Se ha visto que los ácidos grasos saturados inducen apoptosis en hepatocitos y en células b pancreáticas al activar PKC $\xi$ , JNK y estrés oxidativo inhibiendo la fosforilación en tirosina de IRS1/2 lo que bloquea la señalización de la insulina. En contraste los ácidos grasos insaturados interactúan con el receptor GRP120 inhibiendo la inflamación y aumentando la sensibilidad a la insulina.<sup>61, 62</sup>

Al eliminar ambos IRS1 e IRS2 se bloquea la inducción de la insulina sobre AKT y la fosforilación de FOXO1, lo que resulta en gluconeogénesis sin restricción para la producción hepática de glucosa, con hiperglucemia y reducción de lipogénesis hepática. Una dieta alta en

comida grasosa afecta la expresión de IRS2 y la fosforilación en tirosina de hepatocitos de ratones sin IRS1 específico de hígado, desarrollando diabetes severa.<sup>63</sup>

Esto último también le da mayor soporte al papel que juega FOXO1 en el desarrollo de DT2, ya que en otros estudios en los cuales se realizó un triple “knock-out” específico a hígado de IRS1, IRS2 y FOXO1, se observó una inversión significativa de los niveles elevados de glucosa plasmática, de intolerancia a la glucosa y del efecto de ayuno-alimentación en la expresión hepática de genes que se habían observado en el doble “knock-out” descrito en el párrafo anterior, como lo es la supresión de genes de PEPCK y G6Pasa al nivel similar en un grupo de controles.<sup>64</sup>

La RI hepática es suficiente para producir dislipidemia y aumentar los factores de riesgo para producir aterosclerosis. Ratones con ausencia del receptor de insulina en hígado presentaron perfiles pro-aterogénico de las lipoproteínas, con un HDL reducido y VLDL, que al ser expuestos a una dieta aterogénica durante 12 semanas desarrollaron hipercolesterolemia.<sup>65</sup>

#### **2.3.3.4 Resistencia a la insulina cardiaca**

Al eliminar tanto IRS1 como IRS2 específicamente en tejido cardiaco (H-DKO) se observa la disminución de AKT en tejido cardiaco y la fosforilación de FOXO1, lo que da como resultado falla cardiaca y la muerte de los ratones. El músculo cardiaco requiere de IRS1 o IRS2 para mantener la actividad endógena de AKT e inactivar FOXO1, lo que promueve la función cardiaca y la sobrevivencia. La sobreexpresión de FOXO1 cardiaco que causa falla cardiaca en ratones también se ha observado en los humanos.<sup>66, 67</sup>

Durante el estado de RI, el corazón trabaja bajo respuestas adaptativas que limitan la utilización de glucosa y responde a la oxidación lipídica. El corazón es capaz de generar ATP para la contracción cardiaca y cambia los patrones de expresión génicos, sin que se altere la morfología cardiaca. Con la continua resistencia a la insulina resultando en hiperinsulinemia y otros mecanismos de estrés metabólico, se desarrolla insuficiencia cardiaca, lo que da una pérdida del 60 al 70% de IRS1 y 2 cardiacos. Crónicamente, cuando la mala adaptación del remodelamiento metabólico ocurre, hay una falta de compensación para la demanda energética cardiaca, secundaria a la pérdida de IRS1 y 2 con inactivación de AKT, con la utilización restringida tanto de glucosa y ácidos grasos, resultando en hiperlipidemia, deficiencia de ATP cardiaco y muerte súbita.<sup>66</sup>

### 2.3.3.5 Resistencia a la insulina en endotelio vascular

La RI en el endotelio vascular estimula la vasoconstricción, promueve hipertensión y aterosclerosis, así como también perjudica la sensibilidad a la insulina sistémica y la homeostasis de la glucosa. Al ser inactivado el receptor de insulina en el endotelio vascular se ve disminuida la fosforilación de eNOS inducida por insulina y se afectan las respuestas vaso-relajantes a la acetilcolina a nivel aórtico. El endotelio vascular deficiente en IRS2 o en ambos, IRS1 y 2, reduce el AKT endotelial y la fosforilación eNOS, perjudica el consumo de glucosa en el músculo esquelético y lleva a la resistencia a la insulina a nivel sistémico.<sup>68, 69</sup>

En un estudio realizado en modelos murinos se creó un triple KO de FOXO1, FOXO3a y FOXO4 en células endoteliales lo que potenció la fosforilación de eNOS, se redujo la inflamación y estrés oxidativo de las células endoteliales y se previno la aterosclerosis en ratones con dieta rica en grasa. En ratones con el triple KO y en ausencia del receptor de LDL se previno el desarrollo de lesión aortica. El eliminar los receptores de insulina del endotelio o los genes de FOXO en los ratones apenas y modificó la homeostasis de glucosa, pero también se demostró que al eliminar RTEF-1 aumentaron los niveles de glucosa y de resistencia a la insulina, por lo que se sospecha que RTEF-1 tiene el potencial de interactuar con FOXO1 en las células.<sup>70, 71</sup>

## 2.4 Diagnóstico de RI

El método más utilizado para la evaluación de RI es el cálculo del índice HOMA-IR, el cual consiste en multiplicar los valores de glucemia sérica en ayuno por los valores de insulina basal y dividirlo entre 405.<sup>72</sup>

$$\text{HOMA-IR} = \text{glucemia en ayuno (mg/dl)} \times \text{insulinemia basal } (\mu\text{U/ml}) / 405$$

El punto de corte propuesto para definir resistencia a la insulina de acuerdo con este índice es de 2.5, por lo que un índice HOMA-IR  $\geq 2.6$  corresponde a RI.<sup>73</sup>

También se ha planteado que la sola medición de la insulina basal puede ser un buen y fiel indicador de RI. El punto de corte más utilizado en la práctica clínica es de 12  $\mu\text{U/ml}$ , el cual tiene cierta relación fisiológica que concuerda con la operación matemática que realiza el HOMA-IR; así, la insulina basal elevada nos podría indicar un estado de hiperinsulinemia. Sin embargo, es mucho más confiable utilizar el corte del índice HOMA-IR de 2.5.<sup>73</sup>

## **2.5 Prevalencia de RI en población mexicana**

En México no se cuenta con información nacional relativa al comportamiento epidemiológico de la RI. Existen estudios que reportan de forma individual la incidencia o prevalencia del estado de RI en pacientes o voluntarios, lo que brinda información sobre la frecuencia de esta condición metabólica.

En un estudio de asociación entre variantes genéticas y RI en una población de 317 niños mayas de la península de Yucatán realizado en el año 2018, 39.4% tuvieron RI por el método HOMA-IR.<sup>74</sup>

En la Clínica de Metabolismo y control de peso del Centro Integral de Diagnóstico y Tratamiento del Hospital Médica Sur de la Ciudad de México, entre el periodo de enero 2014 y marzo 2017, en 38 voluntarios mayores de edad con sobrepeso y obesidad se encontró RI en 50% de ellos.<sup>75</sup> En este mismo hospital, otro estudio realizado con un laboratorio privado en 708 pacientes mayores de 18 años entre enero 2016 y marzo 2017 identificó a 349 con RI por el método HOMA-IR equivalente al 49% del total. En ese mismo estudio, 554 de los 708 participantes (78%) presentaron RI por el método QUANTOSE.<sup>76</sup>

Un estudio que se realizó entre enero 2016 y abril 2018 en el Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinoza de los Reyes” de la Ciudad de México, buscó la prevalencia de resistencia a la insulina en 332 pacientes varones, mayores de edad, con diagnóstico de infertilidad; de esos pacientes, en 183 (55%) se encontró la condición de RI por el índice HOMA-IR.<sup>77</sup>

En Sonora México, otro estudio que se llevó a cabo en la Clínica de Obesidad y Nutrición del Hospital Infantil determinó la prevalencia de RI en 204 adolescentes con obesidad en 85%, con el índice HOMA-IR.<sup>78</sup>

En 2004, en 86 adolescentes entre 11 y 16 años de nivel medio básico de educación del estado de Nuevo León, se reportó una prevalencia de RI de 34% por el mismo método.<sup>79</sup>

## 2.6 Sobrepeso y obesidad

### 2.6.1 Concepto, clasificación y epidemiología

El sobrepeso se define como la condición de aumento de masa corporal a expensas de la acumulación excesiva de grasa que supone un riesgo para el desarrollo de obesidad; mientras que la obesidad se define como la enfermedad caracterizada por el exceso de tejido adiposo en el organismo.<sup>80</sup> Otra definición pertinente y que toma mayor consideración clínica sobre la obesidad es la de Pasca y Montero quienes establecen que la obesidad es una enfermedad sistémica, multiorgánica, metabólica e inflamatoria crónica, multideterminada por la interrelación entre lo genómico y lo ambiental, fenotípicamente expresada por un exceso de grasa corporal que conlleva mayor riesgo de morbimortalidad.<sup>81</sup>

El sobrepeso y la obesidad se evalúan a través de su clasificación, la cual se establece a partir del Índice de Masa Corporal (IMC), un indicador antropométrico del estado de nutrición, que se obtiene dividiendo el peso de una persona en kilogramos entre su talla en metros cuadrados ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ), lo que permite determinar peso bajo, peso normal, sobrepeso y obesidad.<sup>17</sup> Personas cuyo IMC sea igual o superior a 25 y hasta 29.9  $\text{kg}/\text{m}^2$  entran dentro del rango de sobrepeso, mientras que las personas con un IMC igual o mayor a 30  $\text{kg}/\text{m}^2$  se consideran obesas. Dentro de la obesidad existen subdivisiones las cuales está estrechamente relacionada con el aumento de riesgo asociado a la salud. Se considera obesidad grado I o moderada a la persona cuyo IMC va de 30 a 34.9  $\text{kg}/\text{m}^2$  que se traduce como un aumento de riesgo moderado a la salud, obesidad grado II o severa cuando el IMC va de 35 a 39.9  $\text{kg}/\text{m}^2$  con un aumento de riesgo severo a la salud y por último cuando el IMC es mayor o igual a 40  $\text{kg}/\text{m}^2$  se considera obesidad grado III o mórbida con un aumento de riesgo muy severo a la salud.<sup>82</sup>

Clasificación del IMC	
Insuficiencia ponderal	< 18.5
Intervalo normal	18.5 - 24.9
Sobrepeso	≥ 25.0
Preobesidad	25.0 - 29.9
Obesidad	≥ 30.0
Obesidad de clase I	30.0 - 34.9
Obesidad de clase II	35.0 - 39.9
Obesidad de clase III	≥ 40.0

Figura 3. Clasificación de IMC según la OMS.<sup>83</sup>

Actualmente México se encuentra en los primeros lugares de obesidad a nivel mundial, disputándose continuamente el primer y segundo lugar con los Estados Unidos. La alta prevalencia que hay para el desarrollo de los componentes del SM y que llevan al desarrollo de la hipertensión arterial sistémica y DT2 es de gran importancia debido a que las complicaciones de éstas representan una disminución en la calidad de vida del paciente y es unas de las principales causas de muerte en el país.

En la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016 (ENSANUT MC 2016) se reportó que la prevalencia de obesidad abdominal en adultos de 20 años o más de edad fue 76.6%, representando un aumento en todas las categorías con respecto a la ENSANUT 2012, en donde se reportó que los valores totales de obesidad abdominal fueron de 74%.<sup>84</sup>

Respecto a las cifras de sobrepeso y obesidad en adultos de 20 años, la encuesta mostró una prevalencia combinada de 72.5%, lo que significa un aumento al ser comparado con las cifras combinadas de sobrepeso y obesidad de ENSANUT 2012, que fueron de 71.2%. Al dividir los resultados entre sobrepeso y obesidad, la ENSANUT MC 2016 reportó 39.2% de sobrepeso y 33.3% de prevalencia de obesidad lo que representa un incremento de 0.4% y 0.9% en comparación de lo reportado en el 2012 (38.8% en sobrepeso, 32.4% en obesidad). Al seguir el curso natural de la enfermedad, se puede proponer que hubo un aumento del IMC, el 0.9% de la población que disminuyó en la clasificación de sobrepeso, guardó un mismo porcentaje de incremento en la clasificación de obesidad.<sup>84</sup>

En cuanto a lo reportado por la ENSANUT 2018-19, la prevalencia de obesidad abdominal en adultos de 20 años o más, fue de 88.4%, un incremento de más del 10% con respecto a lo reportado en años anteriores. Al referirse a los valores de Sobrepeso y obesidad, esta encuesta reporta la prevalencia de sobrepeso en 39.5%, un incremento del 0.3% mientras que la de obesidad fue 35.3% que representa un aumento de 2%.<sup>85</sup>

### **2.6.2 Fisiopatología**

La causa más importante para el desarrollo de sobrepeso y obesidad es un desequilibrio energético entre las calorías consumidas y las gastadas. Actualmente existe una tendencia a nivel global por consumir alimentos ricos en sal, grasas y azúcares, esto ligado a la disminución de la actividad física, o mantener un estilo de vida sedentario, siendo estas las principales causas que favorecen un incremento en el almacenamiento de grasa en el tejido adiposo.<sup>82</sup>

El tejido adiposo se compone de adipocitos, estroma y otras células que componen el microambiente celular como macrófagos, fibroblastos, células T, células endoteliales y los precursores de cada una de estas estirpes. El adipocito es el principal constituyente celular, el cual se especializa en almacenar el exceso de energía en forma de triglicéridos (es la única célula que no sufre lipotoxicidad), los cuales se liberan en situaciones que requieran de un mayor consumo energético. También se considera una célula del sistema endocrino, ya que se ha demostrado que secreta más de 600 factores bioactivos conocidos como adipoquinas, de las cuales la adiponectina y la leptina son las más estudiadas por el momento, se incluyen también otras citosinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, entre otras.<sup>86</sup>

El adipocito es capaz de incrementar el volumen del tejido adiposo, mediante dos maneras, la primera de ellas es por hipertrofia, donde alcanzará un umbral de tamaño crítico en el cual se dará el segundo proceso que es la hiperplasia. En el estado de sobrepeso y obesidad se perpetúa esta situación en la cual el adipocito hipertrofiado en exceso modifica su comportamiento metabólico que en últimas instancias lo lleva a la apoptosis y en casos extremos incluso necrosis (por mal aporte de irrigación). Es entonces cuando se favorece una infiltración de células inmunes de perfil proinflamatorio, que generan un estado de lipo-inflamación. La mayoría de las citoquinas proinflamatorias son secretadas por macrófagos M1 del tejido adiposo, los cuales aumentan su número por la infiltración de monocitos circulantes, lo cual lleva a la acumulación de macrófagos en el tejido. Este fenómeno ocasiona que se liberen factores

inflamatorios que llegan a la circulación general lo que favorece que en otros tejidos se generen alteraciones inflamatorias, lo que da una condición inflamatoria sistémica de bajo grado.<sup>86</sup>

En situaciones de obesidad no mórbida los macrófagos M2 que se encuentran en el tejido adiposo secretan cantidades suficientes de arginasa e IL-10 con lo que logran proteger parcialmente al adipocito de los factores de inflamación secretados por el macrófago M1 y bloquean la polarización de estos. Pero al existir un aumento en la adiposidad por situaciones de obesidad severa o mórbida, aumenta el reclutamiento de macrófagos M1 y la secreción de citocinas proinflamatorias por lo que sobrepasan el efecto protector de los macrófagos M2 que lleva a un predominio en los efectos de iNOS y TNF- $\alpha$ , estos factores llevan a la RI en adipocitos, activan JNK y NF-kB, alteran la secreción de adipocinas y llevan a un exceso en los niveles circulatorios de ácidos grasos libres consecuencia de la lipólisis y la adipogénesis alterada.<sup>87</sup>

El estado hipertrófico anormal del adipocito y el estado inflamatorio lo llevan a alterar su perfil de secreción aumentando la producción de leptina, ocasionando hiperleptinemia lo que genera una sobre estimulación de la señalización leptinérgica que culmina con una condición de resistencia a la leptina, que lleva a un mayor consumo de alimento y una condición que de manera continua favorece el desarrollo de obesidad. También se ve disminuida la secreción de adiponectina por los factores inflamatorios, lo que lleva a una menor sensibilidad a la insulina, que a su vez da lugar a un mal funcionamiento mitocondrial y un mayor estrés del retículo endoplásmico ocasionado por sobrecarga de su capacidad funcional al tener que compensar la ineficiencia en el ciclo insulina-glucosa que se está desencadenando por los procesos inflamatorios y de desensibilización que se han comentado. Todo esto produce una mayor lipólisis basal, alteración del citoesqueleto con menor lipogénesis *de novo*. En la lipólisis basal el adipocito ha saturado su capacidad para almacenar triglicéridos por lo que los ácidos grasos se dirigen a otros tejidos donde se depositarán ectópicamente generando lipotoxicidad y RI.<sup>86, 88</sup>

El tejido adiposo visceral se convierte en el primer tejido blanco para almacenar triglicéridos ante la incompetencia del tejido adiposo subcutáneo, el cual presenta limitada capacidad para proliferar (capacidad hiperplásica), o desarrollar hipertrofia, por lo que no genera inflamación.<sup>86</sup>



### 2.6.3 Complicaciones

Las complicaciones del sobrepeso y la obesidad son variadas y la mayoría de ellas llevan a la disminución de la calidad de vida del paciente y cuando no se atiende adecuadamente, pueden desencadenar la muerte.

Un aumento del 10% de sobrepeso conlleva en un impacto negativo en el sistema músculo esquelético, favoreciendo osteoartritis de rodilla que es la complicación más frecuente. En el aparato digestivo aumenta la prevalencia de enfermedad hepática grasa no alcohólica, así como esófago de Barrett, y enfermedad ácido péptica. En obesidad mórbida la presencia de Síndrome de Pickwick o Síndrome de apnea obstructiva del sueño, donde al menos 44% de pacientes obesos presentan restricción respiratoria.<sup>89</sup>

Como se explicó anteriormente, en el estado de obesidad coexisten resistencia a la leptina y RI. Este estado de RI repercute a nivel sistémico, ocasionando un estado de hiperglucemia, que al mantenerse de manera crónica afectará la función celular de diversos tejidos, lo que se conoce como glucotoxicidad. La glucotoxicidad, por *feedback* negativo disminuirá la producción del transportador de glucosa GLUT2 en la célula  $\beta$  pancreática, con menor actividad de la fosfolipasa C, enzima para formar fosfoinosítidos que apoyan en la secreción de insulina, que se suma al aumentar el calcio intracelular. Esto conduce primeramente a una desensibilización de la célula  $\beta$  pancreática debido a los niveles disminuidos de Inositol 3 fosfato (IP3) y de GLUT2. El estado de hiperglucemia también ocasiona una disminución de la síntesis y actividad del GLUT 4, por la misma acción de *feedback* negativo del organismo, también se produce una glucosilación de los mismos transportadores cambiando su estructura y alterando su función.<sup>90</sup> La condición de RI y de hiperglucemia crónica encaminan a la aparición de diabetes mellitus tipo 2 y a un estado de disfunción endotelial y estado proinflamatorio vascular.

La Hipertensión Arterial Sistémica (HAS) es otra complicación que se presenta debido al efecto simpaticomimético de la hiperleptinemia en combinación a la contrarregulación de la hiperinsulinemia.<sup>77</sup> Por otra parte, la glucotoxicidad conduce a disfunción endotelial con la consiguiente baja en la producción de óxido nítrico.

Otra de las complicaciones metabólicas que se presentan son las dislipidemias, que se definen como la alteración de la concentración normal de los lípidos en la sangre. De mayor

importancia es el HDL-C, colesterol presente en las lipoproteínas de alta densidad, el cual participa en el transporte reverso del colesterol porque favorece el retorno del colesterol de los tejidos hacia el hígado para su excreción o reciclaje, mismo que se encuentra disminuido. De forma contraria, hay un aumento de triglicéridos circulantes. A estas dos situaciones se les conoce medicamente como hipoalfalipoproteinemia e hipertrigliceridemia respectivamente.<sup>91</sup>

La complicación más frecuente que se presenta en asociación a hipercolesterolemia, hipertensión arterial y diabetes mellitus tipo 2 es la aterosclerosis, condición que afecta inicialmente la capa íntima de las arterias, con daño endotelial e inflamación, caracterizado por un depósito de lípidos y proliferación de tejido fibroso, con la capacidad para la obstrucción de la luz del vaso, ya sea por el crecimiento de la placa o por su ruptura y trombosis.<sup>91</sup>

## **2.7 Adipogénesis**

### **2.7.1 Hiperplasia e hipertrofia**

El crecimiento del tejido adiposo es un proceso biológico delicadamente regulado. La masa del mismo tejido está determinada por dos mecanismos: hipertrofia, que es el aumento del tamaño de una célula, y la hiperplasia, que es el aumento en el número de células.

El preadipocito se diferencia a adipocito en respuesta al IGF-I, a los lípidos, glucocorticoides y grelina. Estos factores estimulan una cascada de señalización intracelular en la que se ven involucrados C/EBP, PPAR $\gamma$ , SREBP1 y otros factores de transcripción que van regulando la expresión de genes específicos del adipocito durante su paso por los diferentes estadios de la adipogénesis.<sup>92</sup>

El volumen del adipocito incrementa por un aumento en la concentración de triglicéridos, el transporte transmembrana de los ácidos grasos libres se produce en “balsas” ricas en colesterol y esfingolípidos de la membrana plasmática de los adipocitos que tienen caveolas enriquecidas con FABP4, FAT/CD36 y FATP1. La lipoproteinlipasa (LPL) localizada en la superficie de los adipocitos remueve los ácidos grasos libres de los quilomicrones y de las VLDL y favorece su unión al glicerol para formar triglicéridos. Éstos se forman a partir del glicerol 3-fosfato, el cual deriva de tres fuentes metabólicas distintas: 1. De la glucosa, ya que es un intermediario de la glucólisis, 2. De la lipólisis y 3. De la incorporación intracelular de glicerol mediado por la aquaglicerolporina (AQP7 considerada como la principal). De esta manera se obtiene los

componentes necesarios para la formación de los triglicéridos. La insulina es un regulador importante de la hipertrofia, pero no así de la hiperplasia. Algunos mecanismos que contribuyen a la acumulación de triglicéridos inducido por insulina son el aumento de la introducción a las células de glucosa por GLUT4, que utiliza un intermediario de la glucólisis, la dihidroxiacetona-fosfato, que es sintetizado por la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa obteniendo como producto L-glicerol-3-fosfato, el cual es un componente para la formación de triglicéridos. La activación de LPL y la estimulación del consumo de glicerol por AQP3, 7 y 9 son otros mecanismos que contribuyen a la acumulación de triglicéridos. La proliferación de adipocitos comienza a disminuir durante la adolescencia y se mantiene estable durante la etapa adulta, cuando se empieza a expandir al aumentar su tamaño.<sup>92</sup>

### **2.7.2 Tejido Adiposo Blanco**

Las principales funciones de los adipocitos blancos son el almacenamiento de energía en forma de grasa, lipólisis y secreción de adipocinas.<sup>92</sup> Durante la gastrulación, la célula troncal mesenquimal del mesodermo lateral no expresa el factor de transcripción MYF5, por lo que se diferencian en el linaje que dará adipocitos blanco y pericitos del endotelio. Los BMP son factores de crecimiento de la superfamilia del factor de crecimiento tumoral  $\beta$  (TGF $\beta$ ) que están involucrados en la determinación de la célula troncal multipotente al linaje de adipocito. La modificación del adipoblasto para convertirse en preadipocito y de ahí a adipocito blanco está determinada por BMP 2 y 4 que se unen a receptores de superficie celular, BMP $\text{r1}$  y BMP $\text{r2}$ , esto induce la fosforilación de SMAD1, 5 y 8, formando un complejo con SMAD4 que se transloca al núcleo y regula la expresión de genes específicos. Este complejo también estimula las vías de MKK3/p38 MAPK y TAK1 activando otros genes. También existe factores de transcripción que reprimen e inhiben la determinación como son GATA, Dominio Intracelular de Notch (NIC),  $\beta$ -catetina, KLF2 y KLF7. Los preadipocitos comprometidos expresan GREM1, que es un inhibidor de BMP4.<sup>92</sup>

Se han realizado algunos estudios en los que se analiza la participación de *FOXO1* en la adipogénesis. Se ha aportado evidencias de que FOXO1 está principalmente dirigido a la diferenciación terminal y no está presente durante el inicio de la diferenciación, sin embargo, en etapas tempranas su activación transcripcional precede a la expansión clonal. Interactuando positivamente con CEBP $\alpha$  y PPAR $\gamma$ , ya que al ser inhibido FOXO1 los niveles de CEBP $\alpha$ ,

PPAR $\gamma$  y GLUT4 también disminuyen suprimiendo la incorporación de glucosa y ácidos grasos.<sup>73</sup> Así entonces el papel de FOXO1 parece ser el de funcionar como mediador para inducir la transición de la expansión clonal a la diferenciación terminal. Otros estudios demuestran que la sobreexpresión de FOXO1 induce la expresión de factores de arresto celular como p21 y ser el inhibidor de CEBP $\alpha$ , CHOP10, aparte de reprimir a PPAR $\gamma$ , lo que altera la progresión de la expansión clonal inhibiendo la diferenciación de adipocitos. Esto último parece estar en contradicción con lo mencionado previamente, pero en otro estudio se ha demostrado que la función de *FOXO1* está ligada a una cinética tipo curva sigmoidea donde la activación y expresión de FOXO1 durante la diferenciación de adipocitos es dinámica y no estable, por lo que existe una regulación compleja de *FOXO1* al tener múltiples estados de transición de activación-inactivación durante la etapa de diferenciación terminal.<sup>33,93,94</sup>

### 2.7.3 Tejido Pardo

La función principal del adipocito pardo es la termogénesis, además de almacenar energía en forma de grasa y secretar adipocinas, aunque en menor proporción que el adipocito blanco. La capacidad termogénica del adipocito pardo deriva de la expresión de la UCP1, proteína mitocondrial que induce producción de calor por el desacoplamiento de la cadena respiratoria en la síntesis de ATP.<sup>92</sup>

El adipocito pardo también proviene de la célula troncal mesenquimal, pero ésta es del mesodermo paraxial y expresa MYF5 guiando al linaje del adipocito pardo o el miocito. BMP7 y PRDM16 juegan un papel clave en la determinación del progenitor MYF5+ en preadipocito pardo comprometido para iniciar la diferenciación en adipocito pardo.<sup>90</sup>

PRDM16 estimula la adipogénesis parda al unirse a PPAR $\gamma$  y PGC-1 $\alpha$  activando la actividad de factor transcripcional de estos. También interactúa con MED1 para amplificar la transcripción de UCP1. PGC-1 es un coactivador transcripcional que ayuda en la inducción de la expresión de genes específicos del adipocito pardo como lo son UCP1 y UCP3.<sup>90</sup>

Al participar PPAR $\gamma$  y CEBP $\alpha$  en la diferenciación del adipocito pardo, el mecanismo explicado anteriormente sobre el posible eje PPAR $\gamma$ -FOXO1 también está presente en este segmento del linaje celular. Aunque los eventos moleculares de estas transiciones en las que se ve envuelto *FOXO1* aún requieren más estudios.

#### **2.7.4 Tejido Beige**

Los adipocitos beige son Myf5- como los adipocitos blancos, pero tienen una firma genética que es única y diferente a la del adipocito blanco o pardo. El adipocito beige expresa bajos niveles de UCP1, pero bajo estimulación  $\beta$ -adrenérgica inducida por la exposición al frío o por el ejercicio, los adipocitos beige producen altas cantidades de UCP1 y obtienen propiedades termogénicas. Es entonces que, debido a la estimulación de catecolaminas, exposición a frío y ejercicio se cree que hay un proceso de transdiferenciación en sentido bidireccional de adipocito blanco a beige y viceversa. También se cree que existe un mecanismo de transdiferenciación de adipocito pardo a beige principalmente por la participación de la irisina y del FGF21.<sup>90</sup>

### 3.0. Antecedentes

#### 3.1 Polimorfismo de Nucleótido Único o SNP

Un polimorfismo de nucleótido único o SNP es una variación en la secuencia de ADN que afecta un solo nucleótido de una secuencia del genoma. La mayoría de los SNP no son de mayor importancia, porque se encuentran en una parte del genoma que no tiene una función crítica. Sin embargo, algunos SNP confieren un riesgo o una protección para una enfermedad.<sup>95</sup> Estas variaciones deben de estar presentes en al menos 1% de la población para ser considerado como un SNP. En caso de que no se presente en al menos 1% de la población se consideran más bien una mutación puntual.<sup>96</sup>

La variación de nucleótido único se asocia a otro término conocido como SNV o variante de nucleótido único, la principal diferencia es que éste carece de limitaciones de frecuencia.<sup>96</sup>

#### 3.2 SNP de Factor de Transcripción FOXO1

En un GWAS para FOXO1 realizado en amerindios Pima se reporta el SNP intrónico rs2297627 asociado con desarrollo temprano de DT2 y secreción de insulina disminuida con OR=1.19 (IC 95% 1.09-1.30,  $p=1 \times 10^{-4}$ ).<sup>97</sup> Aunque comúnmente se relacionan las poblaciones amerindias con las indígenas mexicanas, la población de amerindios Pima ha reportado muchas particularidades y especificaciones que no se repiten en otras etnias, por lo que representan un fondo genético distinto al de nuestra población de estudio.

Otro estudio realizado en población alemana reportó SNP rs2721068 significativamente asociado con disfunción de células  $\beta$ , con OR=1.53 (IC 95% 1.17–1.99,  $p=0.005$ ), mientras que SNP rs2297627 se asoció con Diabetes tipo 2, con OR=1.37 (IC 95% 1.10-1.71,  $p=0.0008$ ). En otro estudio realizado en población finlandesa, se reportó al SNP rs2721068 significativamente asociado al desarrollo de DMT2 con OR=1.22 (IC 95% 1.05-1.41).<sup>98</sup> Los SNP se reportaron en poblaciones completamente caucásicas por lo que no coinciden con el fondo genético mestizo de la población mexicana; sin embargo, sería relevante conocer su frecuencia en población española para tener en consideración como parte del fondo caucásico en nuestra población.

En un análisis de GWAS se reportaron SNP rs10507486 y rs7323267 asociados a la presencia de DT2, con OR=1.18 (IC 95% 1.07-1.29,  $p=0.00149$ ) y OR=1.19 (IC 95% 1.08-1.3,  $p=0.0014$ ) respectivamente, de manera acumulada en ambos SNP.<sup>99</sup> El estudio se realizó a partir

de una base de datos de población escandinava por lo que sería necesario conocer si hubo migraciones en la península ibérica que permitieran la transferencia a los españoles y dar pauta a estudios de asociación a casos de población latina.

En un estudio en población Han de China se reportó el SNP rs17446614 significativamente relacionado al riesgo elevado y desarrollo de nefropatía diabética con OR=5.41 (IC 95% 1.10-26.55, p=0.037), y con un OR en mujeres de 8.70 (IC 95% 1.00-75.06). El haplotipo A-C SNP rs17446614 y rs17592236 se asociaron con riesgo elevado de desarrollar nefropatía diabética con OR=1.85 (IC 95% 1.14-2.98 p=0.011).<sup>100</sup> Las variantes reportadas se centran en una complicación de la diabetes mellitus, caso en el que el padecimiento ya está bien establecido, aparte de ser en pacientes de población china con alimentación, factores de riesgo y antecedente genético muy diferente al de la población mexicana.

En la Tabla 1 se enlistan algunos de los estudios de asociación más importantes realizados sobre diferentes SNP de FOXO1 y su relación con patologías y complicaciones relacionadas con el estado metabólico.

Código SNP	Cambio de Nucleótido	Efecto o Causa	Resultados	Posición en gen	Población de estudio	OR	Frecuencia	p	Referencia
rs1334241	A>G	Máximo IMC en adultez	En 5918 amerindios se asocia SNP con un IMC máximo en la adultez lo que confiere un factor de riesgo para el desarrollo de obesidad.	17,669	Ameriindios Pima	1.1	20%	p = 0.0003	97
rs2297627	C>T	Asociado a Diabetes y obesidad	En 7,710 amerindios, grupo con DT2 de 2,549 y grupo control de 5,161; se asocia SNP con desarrollo temprano de DT2 y como factor de riesgo al desarrollo de DT2 y obesidad a cualquier edad.	6,848	Ameriindios Pima	1.19	42%	p = 0.001	97
rs10507486	C>T	Asociación con DT2	2 GWAs, DGI en 3000 individuos escandinavos, 1464 con DT2 y 1467 grupo control. WTCCC en población británica: 2000 con DT2 y 3000 control. 2 SNP asociados a DT2 con p significativas.	54,278	Población escandinava y británica	1.27	15%	p = 0.00149	99
rs7323267	C>T	Asociado a DT2	2 GWAs, DGI en 3000 individuos escandinavos, 1464 con DT2 y 1467 grupo control. WTCCC en población británica: 2000 con DT2 y 3000 control. 2 SNP asociados a DT2 con p significativas.	36,764	Población escandinava y británica	1.27	13%	p = 0.00139	99
rs2721068	C>T	Asociado a disfunción cel. B, tolerancia a la glucosa y DT2	En 941 alemanes con factores de riesgo para DT2, pero no diabéticos, con edad promedio de 39 años y promedio de IMC de 29 (sobrepeso) se asocia SNP con p significativa para desarrollo de DT2. Nominalmente significativa la asociación para disfunción de células B y para una tolerancia a la glucosa afectada.	101,067	Alemanes	1.53	39%	P = 0.0045	98
rs17446614	A>G	Asociado a riesgo de Nefropatía diabética	En 138 individuos con Nefropatía Diabética y 149 sanos se realiza PCR-RFLP, con asociación significativa al riesgo de ND en homocigoto AA, especialmente en mujeres (OR=8.7 p=0.021).	100,902	Chinos Han	5.41	5.80%	P = 0.037	98
rs17592236	C>T	Asociado a riesgo de Nefropatía diabética	En 138 individuos con Nefropatía Diabética y 149 sanos se realiza PCR-RFLP, con asociación significativa al riesgo de ND.	108,847	Chinos Han	1.85	13%	P = 0.011	100
rs2297627	C>T	Asociado a aterosclerosis en carótida	En cohorte SAPHIR de 1742 individuos se midió el grosor de la intima media de carótida común e interna, se genotipan y se obtiene asociación con grosor de carótida común. Al realizarse ajuste para factores de riesgo y biomarcadores cardiovasculares se refuerza la significancia de la asociación (p=0.0002) de ambos SNP.	6,848	Caucásicos de Salzburg, Austria (SAPHIR)	NA	NA	p = 0.0008	101
rs10507486	C>T	Asociado a aterosclerosis en carótida	En cohorte SAPHIR de 1742 individuos se midió el grosor de la intima media de la carótida común e interna, se genotipan y se obtiene asociación al grosor de carótida común. Al realizarse ajuste para factores de riesgo y biomarcadores cardiovasculares se refuerza la significancia de la asociación (p=0.0002) de ambos SNP.	54,278	Caucásicos de Salzburg, Austria (SAPHIR)	NA	NA	p = 0.0007	101

*Tabla 1. SNP de FOXO1 y su asociación con alteraciones metabólicas y sus complicaciones*



### 3.3 SNP de Resistencia a la insulina

Un estudio de asociación realizado en población iraní estudió a 83 voluntarios con diagnóstico reciente de diabetes mellitus tipo 2 relacionando el SNP rs2274907 de Omentina y el SNP rs9939609 de FTO con el desarrollo de DT2 a través de RI. El polimorfismo rs2274907 con OR=1.98, CI 95% 1.35-2.64, p=0.001 y el polimorfismo rs9939609 con OR=2.57, IC 95% 1.87-3.04, p=0.0001.<sup>102</sup>

En un estudio realizado en niños mexicanos del estado de Guerrero (6 a 11 años) se relacionó el polimorfismo -2518 A>G MCP1 con el posible desarrollo de RI en edad pediátrica, con un OR=2.2, IC 95% 1.1-4.5, p=0.03.<sup>103</sup>

En mujeres egipcias con síndrome de ovario poliquístico, el polimorfismo MTHFR 677C>T se asoció significativamente con RI.<sup>104</sup> En población pakistaní con diabetes, el SNP rs1801278 del IRS-1 se asoció con RI DT2 (OR=17.61, p<0.001).<sup>105</sup>

#### 4.0. Planteamiento del problema

En las últimas décadas ha existido un aumento en la prevalencia e incidencia de enfermedades metabólicas en México. Los datos presentados por la ENSANUT 2018-19 colocan a más del 70% de la población mayor de 20 años en estado de sobrepeso u obesidad y a más del 10% ya padeciendo DT2, para cuyo desarrollo la RI, condición bioquímica de los participantes en este estudio, tiene un papel fundamental. Por otra parte, se ha documentado que la actividad transcripcional de FOXO1 se encuentra directamente relacionada con la homeostasis de la glucosa y la RI, al ser el último blanco de la compleja vía de señalización de la insulina, encargada principalmente de activar enzimas de la gluconeogénesis e inhibir enzimas de la glucólisis, ligado al control de la adipogénesis y al control y regulación de la homeostasis de la glucosa en tejido músculo esquelético, adiposo y hepático. Si bien existen múltiples estudios sobre este factor, donde se reportan SNP en intrones, asociados con el desarrollo temprano de DMT2, disfunción de la célula  $\beta$  pancreática, disminución en la secreción de insulina y aumento de grasa corporal total, así como con sobrepeso y obesidad, al momento no se han publicado estudios de búsqueda de polimorfismos en exones de *Foxo1*, menos aún en regiones específicas como los sitios de unión al ADN presentes en el Dominio de Unión al ADN, también conocido como la porción Forkhead; o en el Sitio de Localización Nuclear, los cuales le permiten llevar a cabo su actividad transcripcional, por lo que se ha considerado conveniente proponer a FOXO1 como un candidato prometedor para identificar SNP propios de la población mexicana que puedan estar presentes con mayor frecuencia en voluntarios con RI.

## 5.0. Justificación

Debido a la magnitud del problema que actualmente representan las alteraciones metabólicas en nuestro país, que llevan a la disminución en la calidad de vida de los individuos afectados y cuyas complicaciones llevan a la muerte, con cifras en constante aumento, el realizar nuevos estudios de investigación que ayuden a dilucidar los mecanismos por los cuales estas alteraciones y patologías inician y se desarrollan es más que necesario. Múltiples estudios de investigación tanto de especialidad, maestría y doctorado realizados en México han arrojado datos epidemiológicos alarmantes sobre la frecuencia y prevalencia de RI, que, por su característica de ser un proceso ligado directamente con el desarrollo de enfermedades crónicas, es susceptible de ser considerada en la búsqueda de posibles estrategias de atención de esos problemas de salud, de muy alta prevalencia en población mexicana. Estudios previos desarrollados en este grupo de trabajo han identificado polimorfismos en dos genes, *ABCA1* y *PPAR $\gamma$* , los cuales muestran una alta frecuencia y pronóstico de daño a la funcionalidad y estructura proteica, sugiriendo que pueden estar potencialmente asociados a la presentación de obesidad, sobrepeso y dislipidemias en población mexicana. Los SNP identificados en dichos estudios también se han reportado con una frecuencia mayor en población mestizo-mexicana en comparación con estudios realizados en poblaciones de otras etnias. Lo anterior permite retomar la experiencia obtenida, en la documentación de la presencia de posibles polimorfismos aún no identificados, cuya evaluación se propuso realizar este estudio.

Teniendo en cuenta lo ya mencionado, se propone a FOXO1 como un candidato prometedor para identificar SNP propios de la población mexicana que puedan estar presentes con mayor frecuencia en voluntarios con RI; específicamente, identificando dichos SNP en el Dominio de Unión al ADN, de suma importancia para la función de la actividad transcripcional del factor.

La información obtenida permitirá identificar nuevos eventos que se encuentran participando en la fisiopatología de las enfermedades metabólicas crónicas degenerativas que afectan con mayor frecuencia a población mexicana y en un futuro, la realización de estudios enfocados no únicamente en la identificación de variantes específicas, sino también en la evaluación de su posible asociación con RI y con algunas de las patologías crónicas ya

mencionadas para nuestra población, lo que permitiría dirigir el esfuerzo y los recursos de mejor manera para la atención de dichas enfermedades.

Finalmente, el presente estudio hace posible identificar nuevos eventos que se encuentran participando en la fisiopatología de las enfermedades metabólicas crónicas degenerativas que afectan con mayor frecuencia a población mexicana.

## **6.0. Pregunta de investigación**

¿Existen nuevos polimorfismos de nucleótido único en el sitio de unión al ADN del factor de transcripción FOXO1 en individuos mexicanos que presentan resistencia a la insulina?

## **7.0. Hipótesis**

Existen nuevos polimorfismos de nucleótido único en el sitio de unión al ADN del factor de transcripción FOXO1 en individuos mexicanos con resistencia a la insulina.

## **8.0. Objetivos**

### **8.1 Objetivo general:**

Identificar nuevos polimorfismos de nucleótido único en el sitio de unión al ADN del gen que codifica para el factor de transcripción FOXO1 en individuos mexicanos con resistencia a la insulina.

### **8.2 Objetivos específicos:**

1. Identificar voluntarios con resistencia a la insulina en la base de datos de voluntarios del proyecto “Genoma Diabesogénico del Estado de Morelos”.
2. Secuenciar el segmento de ADN que codifica para el sitio de unión al ADN de FOXO1 en individuos mexicanos con resistencia a la insulina.
3. Identificar nuevos SNP en la secuencia del segmento de ADN que codifica para el sitio de unión al ADN de FOXO1.
4. Calcular la frecuencia de polimorfismos de nucleótido único detectados en el sitio de unión al ADN de FOXO1.

## **9.0. Metodología**

### **9.1 Tipo de estudio**

El presente proyecto es un estudio transversal observacional descriptivo y retrospectivo.

### **9.2 Lugar de estudio**

Las muestras y datos generales de los voluntarios se obtuvieron de voluntarios donadores de sangre del Hospital “Dr. Rafael Barba Ocampo” del ISSSTE en Cuautla, Morelos y de donadores de sangre del Centro Estatal de Transfusión Sanguínea en Cuernavaca, Morelos, pertenecientes al proyecto “Genoma Diabesogénico del Estado de Morelos”.

La búsqueda de polimorfismos en las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio 11 de Biología de células troncales de la Facultad de Medicina de la UAEM en Cuernavaca, Morelos y en la Unidad de Diagnóstico de Medicina Molecular “Dr. Ruy Pérez Tamayo” del Hospital del Niño y del Adolescente Morelense ubicado en Zapata, Morelos.

### **9.3 Población de estudio, periodo y tamaño de muestra.**

La población de estudio constó de individuos con RI que cumplieron con los criterios de inclusión. De 173 voluntarios con esta condición, se planteó la inclusión de 100 muestras sanguíneas al estudio de variantes alélicas, de las cuales finalmente 30 fueron sometidas a la identificación de posibles polimorfismos.

Inicialmente, 46 voluntarios fueron donadores de sangre provenientes del Centro Estatal de Transfusión Sanguínea en Cuernavaca en el periodo de agosto 2008 a enero 2012, el resto fueron donadores de sangre que acudieron al Hospital “Dr. Rafael Barba Ocampo” del ISSSTE en Cuautla, Morelos, los cuales fueron reclutados para el estudio en el transcurso del año 2014. Se muestra la obtención y selección de voluntarios a estudiar en la figura 4.

### **9.4 Tipo de muestreo**

Muestreo aleatorio simple aplicado a la base de datos que contenía información de los voluntarios referidos en población cerrada y acotada.

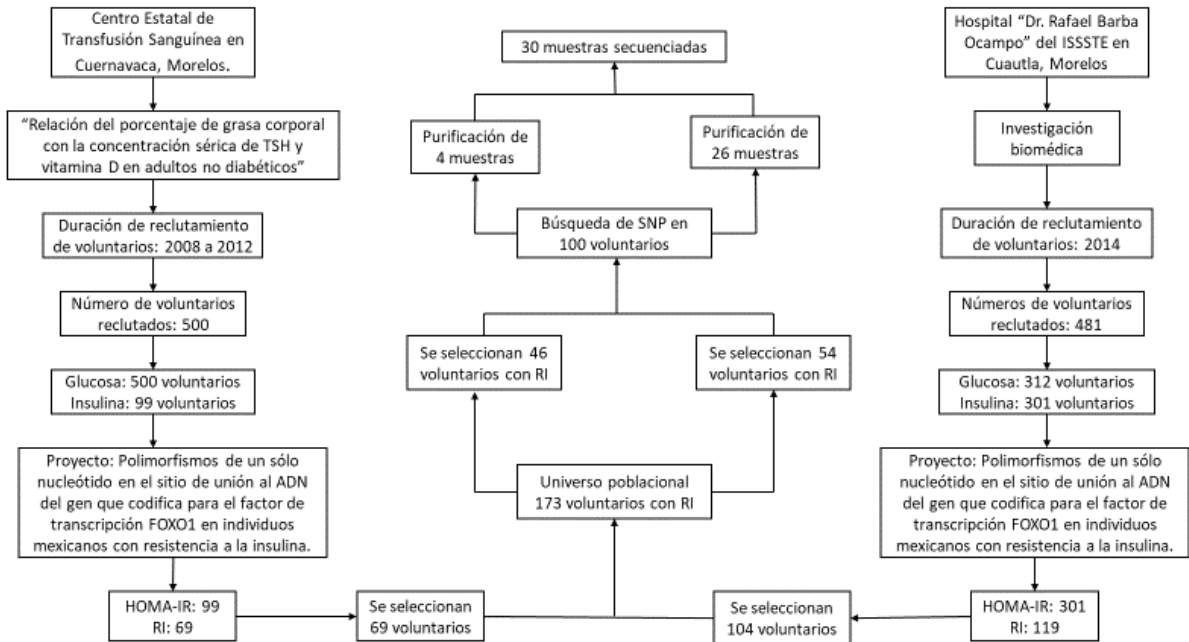


Figura 4. Flujo de obtención y selección de voluntarios para toma de muestras, purificación de ADN y secuenciación del segmento deseado para inclusión en el estudio actual.

#### 9.4.1 Criterios de Inclusión.

- Contar con el consentimiento de los voluntarios, que incluyó toma de muestras y autorización para proyectos de investigación. (Anexo 1 y 2).
- Voluntarios mayores de edad de ambos sexos.
- Residentes en el Estado de Morelos.
- Con valores de glucemia e insulina en ayuno.
- Diagnóstico de resistencia a la insulina.
- Muestras de ADN de voluntarios con cantidad suficiente para su uso en técnicas de biología molecular.

#### 9.4.2 Criterios de exclusión

- Participantes con registros incompletos.
- Aquellas muestras de ADN de mala calidad que impidieron establecer su secuenciación.

### 9.5 Características de variables de interés

Variable	Tipo de variable	Definición operacional	Escala de medición	Unidad de medida
Polimorfismo de nucleótido único	Cualitativa	SNP identificados por alineamiento múltiple entre la secuencia a estudiar y la secuencia base reportada.	Nominal	Presente / Ausente
Edad	Cuantitativa	Los años reportados en la hoja de registro de información de los voluntarios al momento de la toma de la muestra.	De razón	Años
Sexo	Cualitativa	El sexo reportado en la hoja de registro de información de los voluntarios al momento de la toma de la muestra.	Nominal	Femenino / Masculino
Glucemia	Cuantitativa	El valor de glucemia reportado en la hoja de registro de información de los voluntarios.	De razón	mg/dl
Insulina en sangre	Cuantitativa	La cantidad de insulina reportada en la hoja de registro de información de los voluntarios.	De razón	$\mu$ U/ml.
HOMA-IR	Cuantitativa	Valor obtenido por la fórmula establecida por D. R. Matthews, donde se multiplica el valor de glucosa en ayuna por el de insulina en ayuna y el resultado se divide entre 405. <sup>72</sup>	De razón	
Hiper glucemia	Cualitativa	Valor de glucemia reportado en el análisis bioquímico de laboratorio mayor o igual a 100 mg/dl. <sup>48</sup>	Nominal	Presente / Ausente



Hiperinsulinemia	Cualitativa	Valor de insulina reportado en el análisis bioquímico de laboratorio mayor o igual a 13 $\mu$ U/ml. <sup>73</sup>	Nominal	Presente / Ausente
Pureza de DNA	Cualitativa	Valor de pureza reportado por el BioDrop. Valor mayor a 1.6 se considera aceptable y mayor a 1.8 óptimo.	Nominal	Contaminación = 0 Pureza aceptable = 1 Pureza óptima = 2
Integridad de DNA	Cualitativa	Se observa banda sin barrido en gel de agarosa al 1.5%	Nominal	Sin DNA = 0 DNA íntegro = 1 DNA degradado = 2
PCR	Cualitativa	Amplificación del segmento del exón 2 que correspondió al dominio de unión al ADN del gen que codifica para FOXO1.	Nominal	Amplificó = 1 No amplificó = 2

## 9.6 Toma de muestras sanguíneas

Para la toma de muestra sanguínea, los voluntarios permanecieron de 8 a 12 horas en ayuno y se tomaron 7 ml de sangre para un tubo sin anticoagulante para la realización de perfil bioquímico y 8 ml para 2 tubos con EDTA para el análisis genético de las muestras. Se procedió a centrifugar las muestras y se alicuotó plasma y suero. Se resguardaron las alícuotas de plasma, suero, “buffy coat” y el remanente eritrocitario, los cuales fueron enviadas por vía terrestre embaladas y mantenidas a temperatura de 2° a 8 °C durante su traslado a la UDMM “Dr. Ruy Pérez Tamayo” del Hospital del niño y del adolescente Morelense, para su resguardo hasta su uso, las alícuotas de plasma y suero se mantuvieron a -20 °C y los tubos con “buffy coat” y eritrocitos a -80 °C. Posteriormente las alícuotas de suero y plasma fueron embaladas y trasladadas al CHRBO-ISSSTE para su proceso analítico del cual se obtuvieron los valores de insulina. Posteriormente, de los tubos almacenados se separó el “buffy coat” del cual se obtuvieron los leucocitos para realizar la extracción y purificación de ADN. El “buffy coat” se separó en 10 crioviales por muestra los cuales fueron almacenados en ultracongelación a -80 °C para ser utilizados en las diferentes investigaciones posteriores.

## **9.7 Procedimientos de laboratorio**

### **9.7.1 Medición de niveles de glucosa sérica**

Para la medición de glucosa sérica se utilizó el suero obtenido de las muestras de los voluntarios y la cuantificación fue realizada en el laboratorio del CHRBO-ISSSTE por espectrofotometría automatizada en el equipo Hitachi 917 de Roche.

### **9.7.2 Medición de niveles de insulina sérica**

Para la medición de insulina sérica se utilizó el suero obtenido de las muestras el cual fue alicuotado y almacenado a -20 °C en la UDMM “Dr. Ruy Pérez Tamayo” del Hospital del niño y del adolescente morelense hasta su traslado al laboratorio del CHRBO-ISSSTE donde se realizó la cuantificación de insulina al utilizar una alícuota de 500 ul de suero. La cuantificación se realizó por quimioluminiscencia en el equipo Elecsys 2010 de Roche. Al sobrante de suero de la alícuota se le dio destino final.

### **9.7.3 Extracción y purificación de ADN**

De las muestras de sangre tomadas se extrajeron 400 µL de la capa leucocitaria (Buffy Coat) y se colocaron en tubo de 15 ml, a este tubo se le agregó 9 ml de buffer de lisis de eritrocitos y se centrifugó el pellet, se resuspendió en PBS 1x. Se realizó el conteo en cámara de Neubauer, con el objetivo de obtener 5 millones de células leucocitarias por muestra. Al pellet de la muestra se le agregó solución TES y proteinasa K. Se incubó 16 horas a 65 °C y con agitación a 50 rpm. Cumpliendo el lapso se inició la purificación con fenol y solución clorofórmica, intercambiando los lavados entre estos dos y con homogenizaciones manuales de 10 minutos cada una. Posterior a la repetición de lavados con fenol/solución clorofórmica se precipitó el ADN con NaCl a 5 M y etanol absoluto frío, para una mejor precipitación se expuso a hielo seco por 30 minutos, se añadió etanol al 70%, se decantó y se dejó secar el pellet a 37 °C por 30 minutos. Una vez seco el tubo y el pellet se resuspendió el último en TE y se calentó a 65 °C por una hora. Las muestras permanecieron a 4°C una noche para su máxima resuspensión, posteriormente se cuantificaron en el BioDrop.

### **9.7.4 Evaluación de concentración y pureza de ADN**

De las muestras seleccionadas se evaluó la concentración y la pureza del ADN por medio del nano espectrofotómetro (Biodrop). Primero se realizó una limpieza del lector del dispositivo con 50 µL de agua estéril, posteriormente se calibró el dispositivo colocando un blanco que

consistía en solución TE, el cual es el vehículo en el que se encuentra diluida la muestra, después se realizaron las lecturas de las muestras seleccionadas. El dispositivo presenta dos relaciones para evaluar la pureza de las muestras. La relación 260/280 nm nos indica la contaminación por proteínas la cual deberá ser mayor a 1.6 para que se considere que hay una pureza de ADN aceptable. La relación 260/230 nm nos indica la contaminación por parte de fenoles y sales de los disolventes que se utilizaron en el proceso de extracción de ADN, éste debía ser mayor a 1.8 para que se considerara aceptable.

#### **9.7.5 Evaluación de integridad del ADN**

Para analizar la integridad de ADN se realizó un gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio y se cargó 2µL de DNA (0.1µg/µL) + 8 µL de TE + 3µL de azul de bromofenol. La corrida electroforética consistió en 180 V durante 45 minutos, al final el gel se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta. Para considerar que el ADN estuvo íntegro se tenía que observar una sola banda por muestra sin existir barrido de esta.

#### **9.7.6 Evaluación de la amplificación: PCR**

Fue necesario evaluar si el ADN podía emplearse en reacciones de amplificación. Esto se realizó con la amplificación del gen Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH), el fragmento de amplificación tiene un tamaño de 307 pares de bases. Primeramente, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) semicuantitativo utilizando un “Mix” en el cual se incluye: agua estéril, buffer de amplificasa al 10x, MgCl<sub>2</sub> al 1.8 mM, dNTP diluidos a 10 mM, oligonucleótido sentido a 0.1µg/µL, oligonucleótido anti sentido a 0.1µg/µL, amplificasa 5U/µL, y muestra de ADN al 0.1µg/µL. El cual se corrió en el termociclador siguiendo las condiciones de 94 °C por 5 minutos, posteriormente 40 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 62 °C y 30 segundos a 72 °C, y finalmente 10 minutos a 72 °C. Se observó en gel de agarosa al 2% las muestras del ciclo 20, 25, 30, 35 y 40 del PCR semicuantitativo. En el gel se observó un fragmento de 307 pb, lo que nos indicó que las muestras podían ser utilizadas como templado para realizar el PCR.

#### **9.7.7 Diseño de oligonucleótidos**

Se seleccionaron los dos sitios de unión a ADN del gen FOXO1, para el diseño de los oligonucleótidos se obtuvo la secuencia del gen FOXO1 de la base de datos de NCBI y se diseñaron los oligonucleótidos que abarcan la mayor parte del sitio ForkHead, en donde se

ubican los dos dominios de unión al ADN que se localizan en el exón 2 en el que se incluye además el sitio de localización nuclear (NLS). El diseño de oligonucleótidos se realizó por medio del programa Primer Blast, buscando que cumpliera con las mejores condiciones, tomando en cuenta que el tamaño del oligonucleótido se encontrara entre 20-25 pb, que la variación de la temperatura de fusión ( $T_m$ ) no rebasará 2°C entre ellos y que estuviera entre 55 y 75°C, sin existir complementariedad entre oligonucleótidos, ni formación de dímeros y que su contenido de Guanina y Citosina fuera entre el 50 y 60%. Posteriormente se analizó con el programa Oligo Analyzer con el cual se obtuvo la formación de horquillas, de auto y heterodímeros, de los que la  $\Delta G$  no fue menor a -10 Kcal/mol. Al final se analizaron en el programa BLAST para descartar que la secuencia seleccionada no presentara un blanco potencial adicional.

### **9.7.8 Estandarización de Oligonucleótidos**

Se realizó una estandarización del PCR con los oligonucleótidos anteriormente diseñados con la finalidad de determinar las condiciones óptimas de amplificación. Dentro de esta estandarización se evaluaron las concentraciones de  $MgCl_2$  y las temperaturas medias de alineación de los oligonucleótidos. La evaluación de las concentraciones de  $MgCl_2$  fue a través de 8 condiciones distintas denominadas: A, B, C, D, E, F, G y H y que correspondieron a las concentraciones de: 0.5 mM, 1 mM, 1.5 mM, 2 mM, 2.5 mM, 3 mM, 3.5 mM y 4 mM respectivamente. Además, se evaluaron 12 condiciones de temperatura distinta para cada condición de  $MgCl_2$  denominadas: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, las cuales van de la siguiente manera: 54.0 °C, 54.9 °C, 55.5 °C, 57.4 °C, 59.4 °C, 61.5 °C, 62.4 °C, 65.8 °C, 67.1 °C, 67.5 °C, 68.0 °C. De esta manera la condición A de  $MgCl_2$  se expuso a las 12 temperaturas descritas anteriormente y lo mismo con cada una de ellas, por lo que al final se colocaron en el termociclador un total de 96 condiciones diferentes marcadas de A1, A2, A3...H11, H12 que representaban las 8 condiciones de  $MgCl_2$  y las 12 de temperatura.

Se corrió el PCR punto final de 40 ciclos y posteriormente las 96 condiciones fueron observadas en un gel de agarosa al 2%, en el cual al ser expuesto en el fototransiluminador UV se observó una banda del tamaño del producto esperado de los oligonucleótidos diseñados. De todas estas se seleccionaron las mejores 3 condiciones basándonos en el grosor e intensidad de la banda y en la que presentó la menor cantidad de amplificaciones inespecíficas y/o dímeros de oligonucleótidos. A estas 3 condiciones se les realizó un PCR semicuantitativo respetando las

características de las condiciones electas como es la temperatura media de alineamiento y las concentraciones de  $MgCl_2$ . Se corrieron las muestras en un gel de agarosa al 2% en el cual se evaluaron los ciclos 20, 25, 30, 35 y 40 de cada condición seleccionada. Para elegir la mejor condición se observó la presencia de una banda del tamaño del producto esperado, no presentó amplificaciones inespecíficas ni dímeros de oligonucleótidos y se seleccionó la que presentó la banda más intensa desde el ciclo 20.

Una vez que se seleccionó la mejor condición, se realizó un PCR punto final de dicha condición la cual se sometió a digestión enzimática. Se buscaron las enzimas necesarias para dicha digestión en programas como CLC Sequence Viewer o SnapGene y de esta manera se seleccionó la enzima de preferencia que cortó el producto a amplificar. Una vez seleccionada la enzima se procedió a realizar el mapeo por enzima de restricción del producto de amplificación, según la enzima (EcoR1) seleccionada se utilizó su buffer correspondiente y se mantuvo a la temperatura específica (37 °C) por la cantidad de tiempo pertinente (2 horas). Al final se inactivó dicho proceso de digestión y se observó el producto en gel de agarosa al 2% donde al ser expuesto al fototransiluminador se observaron las bandas del tamaño de los productos correspondientes.

### **9.7.9 PCR punto final**

Posteriormente se realizó un PCR punto final sobre las muestras de ADN a estudiar, siguiendo las condiciones específicas que se obtuvieron en la estandarización de los oligonucleótidos.

- 1) Desnaturalización inicial de la muestra: 94°C por 5 minutos.
- 2) Desnaturalización: 40 ciclos con 30 segundos a 94°C.
- 3) Alineamiento de los oligonucleótidos: 30 segundos a 67.5°C.
- 4) Elongación: 30 segundos a 72°C.
- 5) Elongación final: 10 minutos a 72°C.

#### **9.7.10 Purificación de productos de amplificación**

Se purificaron los productos de PCR para obtener fragmentos de ADN libres de oligonucleótidos, dNTP, enzimas y demás reactivos utilizados durante el PCR. Se obtuvieron de dos pocillos de gel de agarosa al 1.5% donde se colocaron 30  $\mu$ L de producto de PCR por pozo, se cortaron las bandas previamente identificadas y se colocaron en una caja Petri, para cortarlos en fragmentos más pequeños y añadirlos a un tubo de 1.5 ml que correspondía a la muestra, a dicho tubo se le agregó fenol y NaCl a 5 M, etanol absoluto, y se mantuvo en temperatura de -80° C para posteriormente centrifugarse, se decantó y se lavó el pellet, para finalmente liofilizarlo a 42°C. Los productos fueron almacenados a 4°C por una noche y posteriormente fueron cuantificados en el BioDrop.

#### **9.7.11 Evaluación de los productos de amplificación**

Una vez que se obtuvieron los productos de amplificación purificados se determinó la concentración y la pureza de los fragmentos con el Biodrop, Posteriormente se realizó un gel de agarosa al 2%, se tiñó con bromuro de etidio y se observó el gel en el transiluminador de luz UV corroborándose coincidencia con los fragmentos de amplificación, no se observó degradación o amplificación de dímeros de cebador.

#### **9.7.12 Secuenciación de los productos de amplificación**

Los fragmentos purificados fueron enviados a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las condiciones de entrega incluían un volumen final de 16  $\mu$ l, en tubo de 0.2 ml para PCR, sin que existieran anotaciones en la tapa y la mezcla contenía el producto de PCR purificado por gel, con una concentración de 100 a 120 ng, mezclados con 10 pmolas de oligonucleótido.

El método que se utilizó es el método de secuenciación automática por el método enzimático o de Sanger usando un secuenciador automático de ADN de Applied Biosystems modelo 3130xl, en el cual se dispone de un molde de cadena simple de ADN y un cebador complementario de una región de ADN del molde anterior, donde va a iniciarse la secuencia. El cebador se utiliza como sustrato de la enzima ADN polimerasa 1 que extiende la cadena copiando de forma complementaria el ADN. En la secuenciación automática se marca el oligonucleótido cebador o los terminadores con un compuesto fluorescente y se activa la reacción de secuencia. Los productos de la reacción se detectan directamente durante la

electroforesis al ser pasados frente a un láser que excita los fluoróforos y permite detectar la fluorescencia emitida.

En cuanto se remitió la secuencia se verificó que correspondía al gen *FOXO1* especie *Homo sapiens*, por medio del programa BLAST.<sup>106</sup>

### **9.8 Evaluación de la calidad de las secuencias de FOXO1**

Para la evaluación de la calidad de las secuencias obtenidas se utilizó el programa Sequence Scanner v.2, los parámetros que se tomaron en cuenta para la evaluación de la calidad de las secuencias fueron:

1. Uniformidad de cada pico en su separación y que dichos picos estuvieran bien definidos con una altura por arriba del promedio de picos de ruido, en caso de que existiera ruido en alguna de las secuencias.
2. El RFU (nivel relativo de fluorescencia) de cada pico con valor aceptable de entre 500 y 1000.
3. Valor  $QV \geq 20$  por cada base nitrogenada, el cual es un estimado de la precisión con la que se designa a cada base. Dicho valor es calibrado con la siguiente formula:

$$1. QV = -10 \log_{10}(PE)$$

Donde PE es la probabilidad de error.

Un  $QV=20$  representa una base de alta calidad, por lo cual es confiable.<sup>107</sup>

Una vez evaluada la calidad de todas las secuencias, se realizó el mismo procedimiento tomando en cuenta únicamente el sitio de unión al ADN de todas las secuencias. De ambas evaluaciones se obtuvo un porcentaje de confiabilidad. Posteriormente se realizó la identificación de SNP.

### **9.9 Identificación de SNP**

Para la identificación de SNP se realizó un alineamiento múltiple con el programa CLC Sequence Viewer v8 de QIAGEN, este alineamiento permitió identificar las diferencias entre secuencias, como cambios en una sola base, inserción o supresión de bases. Posteriormente se utilizó el programa DNA Dynamo Demo de Blue Tractor Software, en el cual se realizó una

alineación doble entre las secuencias de los voluntarios y la secuencia base de FOXO1 reportada en Genbank, a la vez que se verificaron en el electroferograma las anomalías reportadas en la alineación. De forma complementaria se utilizó el programa SnapGene versión 5.2.4 de GSL Biotech, el cual permitió analizar con mayor precisión y magnitud el electroferograma de cada una de las secuencias estudiadas. De esta manera se determinó la existencia de SNP en el sitio de unión al DNA de FOXO1.

### **9.10 Frecuencia de SNP identificado**

Una vez identificado el SNP se calculó su frecuencia en el total de la población estudiada.

### **9.11 Predicción de daño a la proteína de FOXO1**

Se realizó la predicción de posible daño en la estructura proteica al existir un cambio de aminoácido producido por el cambio de nucleótido dependiente del SNP. Para dicha predicción se utilizó el programa PolyPhen-2<sup>108</sup> disponible gratuitamente a todo público en la web. Se colocaron los SNP no sinónimos en el programa el cual arrojó uno de dos posibles resultados: “Benigno” o “Probablemente dañino” según fue el caso.

### **9.12 Análisis estadístico**

Se generó una base de datos en un libro del programa Microsoft Excel donde se incluyó el código de cada voluntario, los datos generales de edad y sexo y los datos bioquímicos de interés que fueron los valores de glucosa, insulina y HOMA-IR.

#### **9.12.1 Análisis exploratorio**

Se realizó análisis exploratorio de la base de datos generada con la finalidad de verificar los datos con los que se contaba, asignando los códigos correspondientes a las variables categóricas.

#### **9.12.2 Análisis Descriptivo**

Se identificaron frecuencias absolutas y relativas. Se calcularon proporciones para variables cualitativas (SNP, sexo, hiperglucemia, hiperinsulinemia, pureza de ADN, integridad de ADN y PCR) y para variables cuantitativas (Edad, glucemia, insulina en sangre y HOMA-IR) se estimaron medidas de tendencia central como media y mediana, así como medidas de dispersión, como desviación estándar y rango intercuartil, además de valores mínimo y máximo



y límites del rango intercuartil. Se utilizó el programa Excel para selección aleatoria de las muestras a analizar, y el programa Stata v13 para el análisis propuesto.

Para el análisis de pureza e integridad de las muestras de ADN de los voluntarios se crearon variables politómicas estableciendo “0” para una muestra contaminada, “1” para una muestra aceptable y “2” para una muestra óptima al momento de evaluar la pureza y un “0” para una muestra sin ADN, un “1” para una muestra íntegra y un “2” para una muestra degradada.. Mismo análisis se repitió al momento de evaluar las muestras de productos de PCR purificados y al evaluar la calidad de las muestras que fueron secuenciadas.

## **10. Aspectos éticos**

El estudio se apegó estrictamente a lo estipulado en la Ley General de Salud en Materia de Investigación, lo concerniente a Aspectos Éticos de la investigación en seres humanos y de la bioseguridad de las investigaciones (Título Segundo Capítulo I y Título IV, Capítulo I). Así mismo observa lo pertinente establecido por la Norma Oficial NOM-087- ECOL -SSA 1-2002, protección ambiental -Salud ambiental- Residuos peligrosos biológico-infecciosos. Clasificación y especificaciones de manejo (NOM-087), así como a lo estipulado en la Ley General de Salud, Título Quinto, Investigación para la salud, Artículo 96, Artículo 98 y Artículo 100, Sección IV.

Los voluntarios incluidos en este estudio decidieron libremente su participación y firmaron la carta de consentimiento informado de acuerdo con lo estipulado en el artículo 20 Título segundo capítulo I de la Ley General de Salud en Materia de investigación para la salud. (Se incluye en los Anexos).

También se siguió lo señalado en la NOM-012-SSA3-2012, que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos.

Los procedimientos se realizaron de acuerdo con la declaración de Helsinki y a los lineamientos de la Conferencia Internacional de Armonización.

Los datos obtenidos de los cuestionarios de los voluntarios y de los resultados de las diferentes pruebas que se realizaron en las muestras sanguíneas son resguardados y su nombre no será expuesto, así mismo se les informó a los voluntarios que los resultados podían ser utilizados en diferentes proyectos de investigación y los resultados ser publicados en carteles, exposiciones, tesis o revistas científicas especializadas y que en ningún momento su identidad sería divulgada.

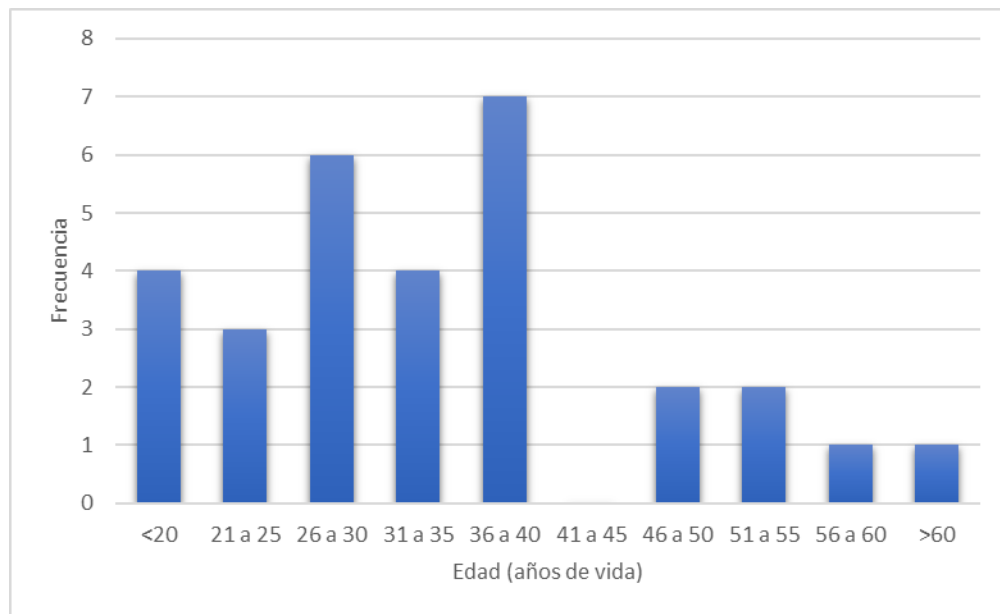
Durante la realización completa del proyecto, selección de voluntarios, y de muestras sanguíneas, no se discriminó a ningún individuo por su sexo, orientación sexual, preferencia religiosa, color de piel, etnia, nivel socioeconómico o apariencia física.

## 11. Resultados

### 11.1 Características de la población.

De los 30 voluntarios con RI que conformaron la población de estudio, 57% fueron de sexo masculino y 43% de sexo femenino.

En la Figura 5 se muestra la frecuencia de la población estudiada según grupo de edad.



*Figura 5. Polimorfismos de un solo nucleótido en el sitio de unión al ADN del gen que codifica para el factor de transcripción FOXO1 en individuos mexicanos con resistencia a la insulina. 2021. Distribución por edad de la población de estudio.*

Con respecto a los niveles de glucosa, 18 (60%) presentaron glucosa normal en ayuno y 12 (40%) de la población presentó niveles alterados; 10 (33%) contaba con glucosa entre los 100 y 125 mg/dl, correspondientes a un estado de prediabetes; 2 (7%) presentó valores por arriba de los 126 mg/dl, compatibles con diagnóstico de diabetes tipo 2 (figura 6).

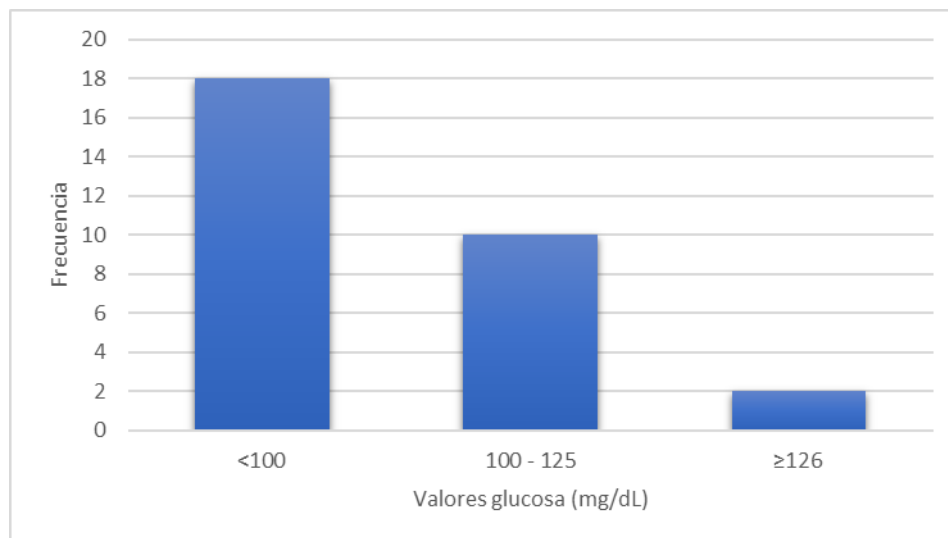


Figura 6. Polimorfismos de un solo nucleótido en el sitio de unión al ADN del gen que codifica para el factor de transcripción FOXO1 en individuos mexicanos con resistencia a la insulina. 2021. Distribución por rango de valores de glucemia en sangre en la población de estudio.

En 5 (17%) voluntarios, los niveles de insulina basal en ayuno correspondieron a la normalidad, de las 25 muestras cuya concentración de insulina correspondió a hiperinsulinemia (83%), 18 voluntarios (60%) presentaron concentraciones entre 13 y 26  $\mu\text{U}/\text{ml}$  y con valores por encima de los 26  $\mu\text{U}/\text{ml}$  se encontraron 7 voluntarios (23%) (figura 7).

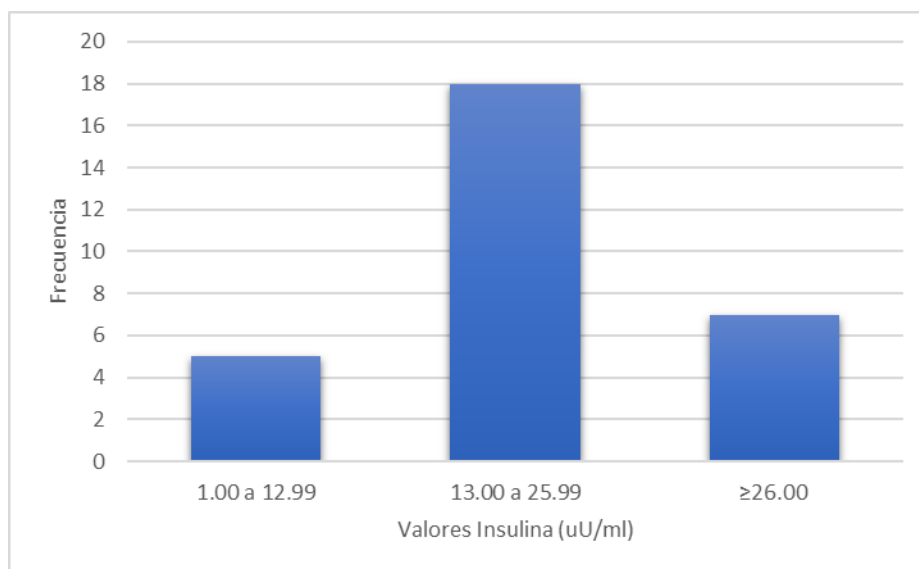


Figura 7. Polimorfismos de un solo nucleótido en el sitio de unión al ADN del gen que codifica para el factor de transcripción FOXO1 en individuos mexicanos con resistencia a la insulina. 2021. Distribución por valores de insulina en sangre en la población de estudio.

La media de concentración de glucosa fue de 99 mg/dL, con valores mínimo y máximo de 80 mg/dl y 138 mg/dl respectivamente, desviación estándar  $\pm 13.5$ , mediana 95.5 mg/dL y rango intercuartil (RIQ) 14.5 mg/dL. La media de concentración de insulina fue 21.6 uUI/ml, con un valor mínimo de 10.9 uUI/ml y un valor máximo de 70.8 uUI/ml, desviación estándar  $\pm 13.2$ , mediana de 16.5 uUI/ml y RIQ de 11.9 uUI/ml. Para HOMA-IR, la media fue 5.5 con un valor mínimo y máximo de 2.7 y 24.1 respectivamente, con desviación estándar  $\pm 4.3$ , mediana de 3.9 y RIQ = 2.7 (tabla 2).

<b>Parámetros bioquímicos y HOMA-IR de la población de estudio.</b>			
	Glucosa (mg/dL)	Insulina (uUI/ml)	HOMA-IR
n	30	30	30
Valor mínimo	80	10.9	2.7
Valor máximo	138	70.8	24.1
Media	99	21.6	5.5
Mediana	95.5	16.5	3.9
Desviación estándar	13.5	13.2	4.3
Rango intercuartil	14.5	11.9	2.7

*Tabla 2. Polimorfismos de un solo nucleótido en el sitio de unión al ADN del gen que codifica para el factor de transcripción FOXO1 en individuos mexicanos con resistencia a la insulina. 2021. Valores de glucemia, insulina en sangre e índice HOMA-IR de la población de estudio.*

## 11.2 Diseño de oligonucleótidos

El Gen FOXO1, el gen que codifica para FOXO1 está conformado por 3 exones y el sitio de interés para el presente estudio fue el dominio de unión al ADN del ForkHead (FH/DBD), por lo que para el diseño de oligonucleótidos se seleccionó como blanco a estudiar principalmente el fragmento de FH/DBD correspondiente al exón 2 que incluye los dos sitios de unión al ADN. El oligonucleótido sentido o “forward” se ubica de la posición 110,517 a la 110,540 constando de 24 nucleótidos mientras que el oligonucleótido anti sentido o “reverse” se encuentra de la posición 111,058 a la posición 111,035 también constando de 24 nucleótidos. Ambos oligonucleótidos cuentan con 50% de guaninas y/o citocinas, teniendo una temperatura promedio de 63.96 °C el sentido y de 63.93 °C el anti sentido, mostrando una diferencia en las temperaturas medias de 0.03 entre los dos oligonucleótidos. El producto de amplificación que se obtuvo con estos dos oligonucleótidos fue de 542 pares de bases. Las características antes descritas de la pareja de oligonucleótidos se observan en la figura 8.

Primer pair 1					
	Sequence (5'>3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	CGCACCCAGCCACAGATATTGTTT	24	63.96	50.00	6.00
Reverse primer	AGTTCGAGGGCGAAATGTACTCCA	24	63.93	50.00	4.00
Products on target templates					
>NC_000013.11 Homo sapiens chromosome 13, GRCh38.p12 Primary Assembly					
product length = 542					
Features associated with this product:					
<a href="#">forkhead_box_protein_O1</a>					

Figura 8. Polimorfismos de un solo nucleótido en el sitio de unión al ADN del gen que codifica para el factor de transcripción FOXO1 en individuos mexicanos con resistencia a la insulina. 2021. Pareja de oligonucleótidos a utilizar y sus especificaciones.

En la figura 9 se observa la secuencia del producto que se amplificó, así como la ubicación de los oligonucleótidos diseñados, también se observan los sitios de interés marcados con código de colores tanto en el color de las bases nitrogenadas como por un círculo superior coloreado.

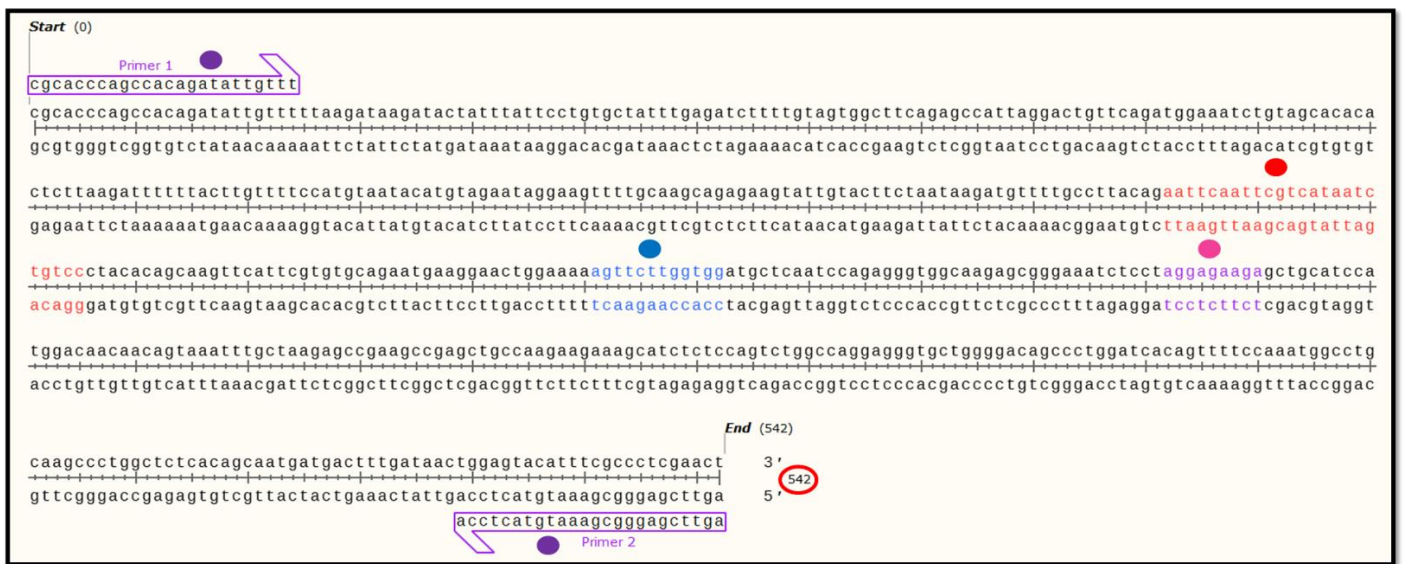


Figura 9. Polimorfismos de un solo nucleótido en el sitio de unión al ADN del gen que codifica para el factor de transcripción FOXO1 en individuos mexicanos con resistencia a la insulina. 2021. Secuencia del amplicon con los sitios de interés y los oligonucleótidos sentido y anti-sentido representados con flechas de colores morado, en rojo la presencia del sitio de unión al ADN 1 y en azul el sitio de Unión al ADN 2, ambos dentro de la región FH/DBD, en lila se remarca el SLN.

### 11.3 Extracción de ADN para estandarización

En cuanto a la formación de complementariedad de los oligonucleótidos diseñados para la formación de homodímeros y heterodímeros, las  $\Delta G$  fueron de -3.91 kcal/ mol y -7.13 kcal/ mol por lo que cumplen con los criterios aceptados. Al ser evaluada la formación de horquillas se

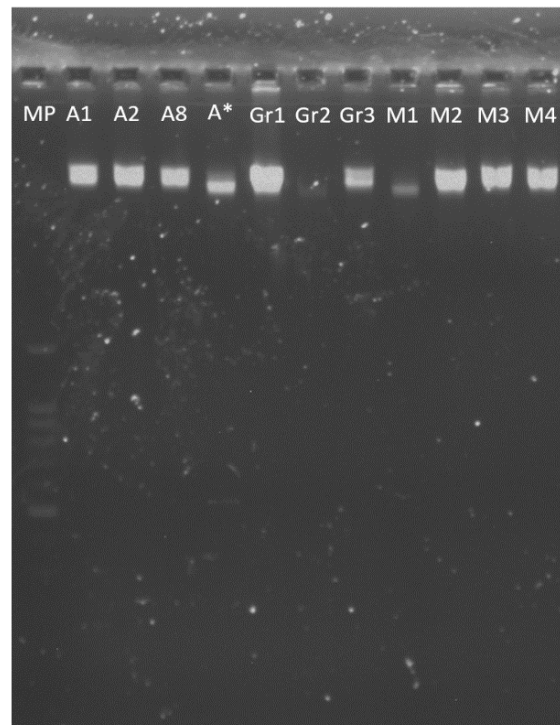
observa que el oligonucleótido sentido tiene una  $\Delta G$  de -1.26 kcal/ mol mientras que el oligonucleótido anti sentido cuenta con una  $\Delta G$  de -2.11 kcal/ mol por lo que ambos oligonucleótidos cumplieron con los criterios aceptados. Contar con  $\Delta G$  mayores a -10kcal/mol permitió fácilmente romper la formación de horquillas, auto y heterodímeros con las temperaturas elegidas a las que fueron expuestas las muestras en el PCR.

Se realizó extracción y purificación de ADN con el objetivo de tener muestras suficientes para llevar a cabo la estandarización de la curva de oligonucleótidos a realizar, así como para ser ocupados en el resto de los experimentos como controles positivos. Se obtuvieron las muestras de tres voluntarios (A, Gr y M) y se siguieron los pasos de acuerdo con el protocolo estandarizado con código: BM004\_UDMM\_V1. De las muestras de dos voluntarios se obtuvieron 4 tubos c/u, mientras que de 1 se obtuvieron 3 (Gr 1 - 3), ya una vez extraído y purificado el ADN se realizó la cuantificación de las muestras en el BioDrop. Dichos valores se pueden observar en la tabla 3. Las muestras con código A\*, Gr1, Gr2 y M1 presentaron valores que coincidieron con ligera contaminación por fenoles y sales, mientras que las muestras A\* y M1 presentaron valores que demuestran contaminación por proteínas. Las muestras presentaron una concentración mayor a 0.100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  con excepción de A\* y M1.

MUESTRA	A260	A260/230	260/280	CONCENTRACION ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
A1	0.140	2.088	1.863	0.138
A2	0.191	2.068	1.847	0.189
A8	0.325	1.878	1.821	0.299
A*	0.091	1.482	1.789	0.086
Gr1	0.173	1.691	1.888	0.170
Gr2	0.188	1.733	1.824	0.174
Gr3	0.173	1.855	1.815	0.169
M1	0.092	1.615	1.776	0.089
M2	0.196	1.810	1.810	0.194
M3	0.200	2.071	1.824	0.199
M4	0.267	1.983	1.820	0.264
<b>X</b>	<b>0.185</b>	<b>1.843</b>	<b>1.825</b>	<b>0.179</b>

Tabla 3. Polimorfismos de un solo nucleótido en el sitio de unión al ADN del gen que codifica para el factor de transcripción FOXO1 en individuos mexicanos con resistencia a la insulina. 2021. Valores de pureza y concentración de muestras de ADN que se usaron para estandarización de oligonucleótidos previamente diseñados.

Posteriormente, las muestras obtenidas se corrieron en gel de agarosa al 1.2% para valorar la integridad, tal como se puede observar en la figura 10. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular y del carril 2 a 12 el resto de las muestras evaluadas, de las cuales se logra observar una banda intensa sin barrido, con excepción de los carriles 7 y 9 que corresponden a la muestra Gr2 y M1. Con los valores obtenidos de la pureza y concentración de las muestras sumado a lo observado en el gel de integridad se pudo concluir que las muestras A1, A2, A8, A\*, Gr1, Gr3, M2, M3 y M4 cumplieron con los criterios de pureza, rendimiento e integridad por lo que fueron utilizados para los posteriores experimentos. Las muestras Gr2 y M1 no cumplieron con la calidad de pureza y rendimiento aceptable, sus bandas fueron mínimamente observables en el gel de integridad, por lo que se desecharon.

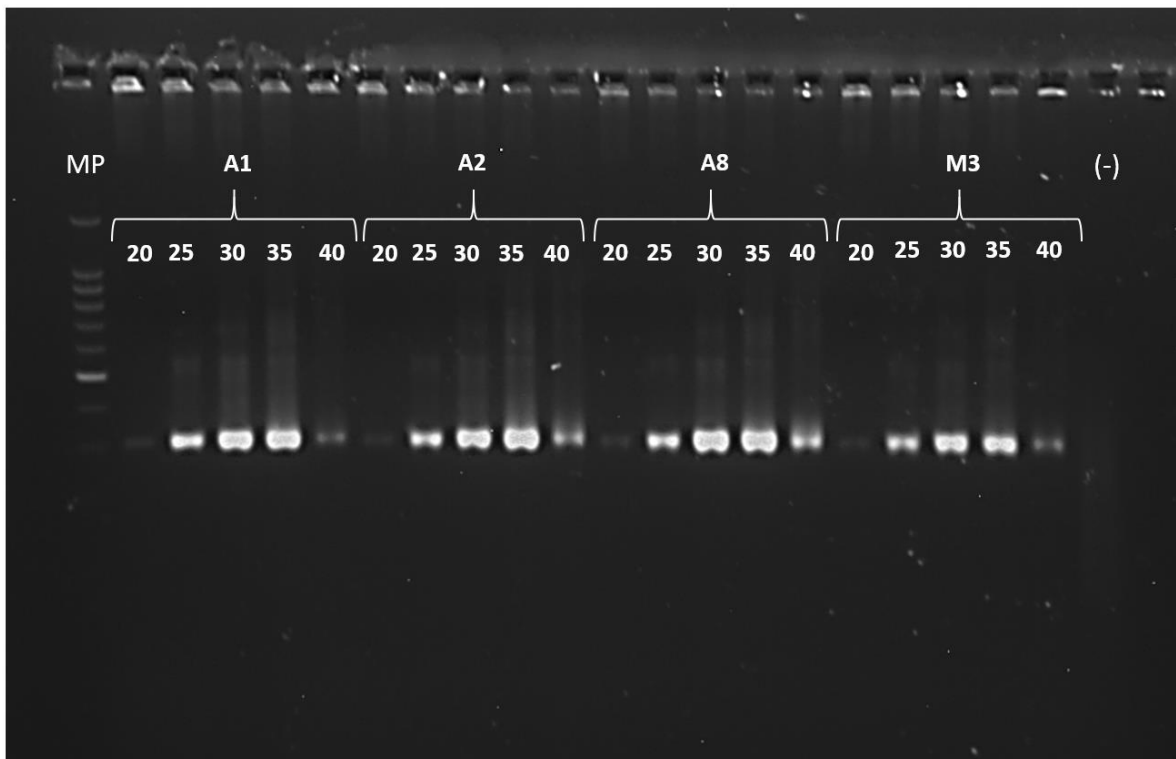


*Figura 10. Polimorfismos de un solo nucleótido en el sitio de unión al ADN del gen que codifica para el factor de transcripción FOXO1 en individuos mexicanos con resistencia a la insulina. 2021. Evaluación de integridad de muestras de ADN en gel de agarosa al 1.2%.*

Se eligieron las muestras A1, A2, A8 y M3 para realizar un PCR semicuantitativo con la finalidad de amplificar GAPDH de las 4 muestras y valorar en cuál de todas fue mayor la amplificación desde ciclo 20 y utilizarla para la curva de estandarización de FOXO1 posteriormente. El PCR semicuantitativo se realizó siguiendo los pasos del protocolo



estandarizado con código: MBM015\_LBCT\_V1. En todas las muestras se observó una banda correspondiente al ciclo 20 pero fue de menor intensidad en la muestra M3. En todas también se observó un incremento en el tamaño, grosor e intensidad de las bandas según correspondió al número de ciclos siguientes, observándose de mayor intensidad y grosor en el ciclo 35. En las cuatro muestras también se observó una disminución de la intensidad de la banda que correspondía al ciclo 40. Pudimos concluir que las cuatro muestras cumplían con criterios aceptables de amplificación, por lo que sirvieron para su posterior uso en la amplificación de fragmentos de ADN; de estos cuatro, se seleccionó la muestra A8 para continuar con el proceso de estandarización, tal como se observa en la figura 11.



*Figura 11. Polimorfismos de un solo nucleótido en el sitio de unión al ADN del gen que codifica para el factor de transcripción FOXO1 en individuos mexicanos con resistencia a la insulina. 2021. Curvas por ciclos de 4 muestras (A1, A2, A8 y M3) purificadas de ADN.*

#### **11.4 Estandarización de Oligonucleótidos**

Se realizó la curva de estandarización de oligonucleótidos por PCR punto final utilizando los oligonucleótidos previamente diseñados de FOXO1, con el objetivo de determinar las condiciones de temperatura y  $MgCl_2$  óptimas de amplificación del fragmento seleccionado para estudio. El proceso se llevó a cabo siguiendo los pasos del protocolo estandarizado con código

BM001\_LBCT\_V0. Se realizó un experimento con las siguientes 4 concentraciones de  $MgCl_2$ : 1 mM, 1.5 mM, 2 mM y 2.5 mM. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2% y se observó en el fotodocumentador, obteniendo la curva de la figura 12, donde se observa una banda gruesa e intensa equivalente a 542 pb en todas las condiciones, sin importar significativamente la concentración de  $MgCl_2$  o la temperatura a la cual fue expuesto.

En los carriles B6 a B10, correspondientes a la concentración de 1 mM de  $MgCl_2$  se observó una banda de inespecificidad de entre los 200 a 300 pb, situación similar se observó en los carriles que correspondían de C5 a C8 que eran de la concentración de  $MgCl_2$  de 1.5 mM y en los carriles que correspondían de D6 a D8 con concentración de 2 mM. En la condición E que corresponde a la concentración de 2.5 mM de  $MgCl_2$  se observó en los carriles que corresponden de E5 a E12. En la condición B correspondiente a 1 mM de  $MgCl_2$  se observó en los primeros 6 carriles un barrido de dímeros de oligonucleótidos de mayor intensidad que en el resto de las condiciones. Sin importar las concentraciones de  $MgCl_2$ , las bandas del producto esperado se observaron más gruesas e intensas a mayor temperatura.

Los resultados obtenidos permiten concluir que en todas las condiciones se obtuvo un producto de amplificación del tamaño esperado, pero fue mayor a mayor temperatura y en los últimos dos valores de temperatura de las condiciones de 1 mM y 1.5 mM de  $MgCl_2$  no se observó la formación de amplificaciones inespecíficas ni dímeros de oligonucleótidos, por lo que las mejores condiciones en toda la curva fueron la de los carriles B11, B12, C11 y C12 que correspondían a la condición de 1 mM de  $MgCl_2$  a 67.5 y 68°C y a la concentración de 1.5 mM con las mismas temperaturas, respectivamente.

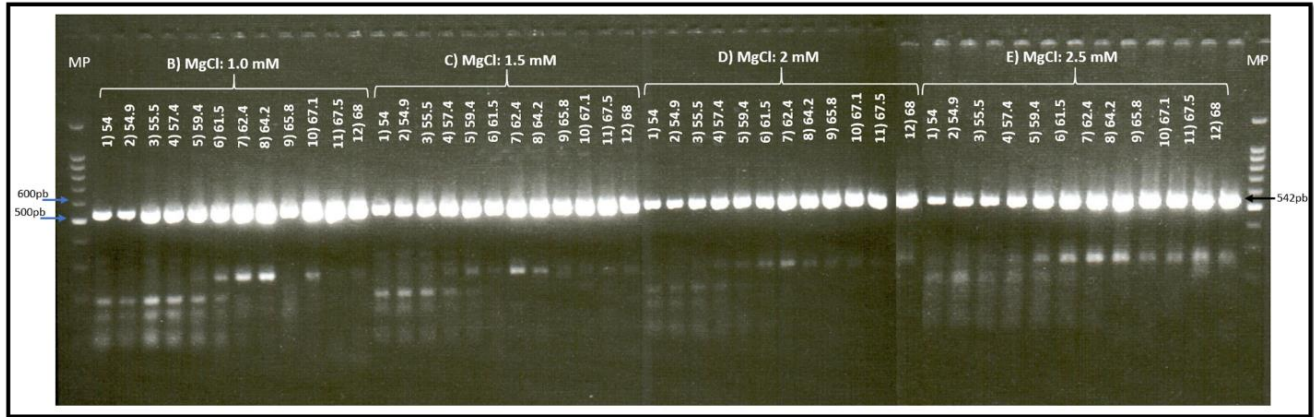
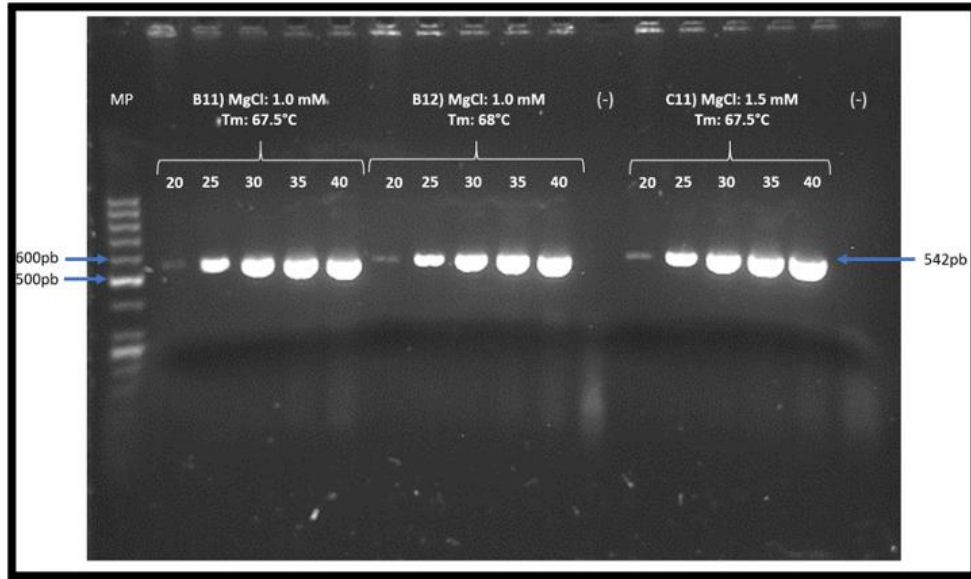


Figura 12. Polimorfismos de un solo nucleótido en el sitio de unión al ADN del gen que codifica para el factor de transcripción FOXO1 en individuos mexicanos con resistencia a la insulina. 2021. Curva de estandarización de oligonucleótidos previamente diseñados. 4 concentraciones diferentes de MgCl<sub>2</sub> y 12 temperaturas por cada condición de MgCl<sub>2</sub>.

Para identificar la condición que presentó la mejor sensibilidad, se realizó un PCR con una curva de ciclos con las 3 mejores condiciones seleccionadas del experimento anterior las cuales fueron: 1. MgCl<sub>2</sub> a 1 mM con 67.5 °C de temperatura de alineamiento, 2. MgCl<sub>2</sub> a 1 mM con 68 °C de temperatura de alineamiento y 3. MgCl<sub>2</sub> a 1.5 mM con 67.5 °C de temperatura. Posterior a la realización del PCR semicuantitativo con las condiciones antes descritas se corrieron los productos de PCR en un gel de agarosa a 2% y se observó en un foto-documentador del cual se obtuvo lo que se muestra en la figura 13. En las tres condiciones se observó una banda del tamaño del producto esperado de 542 pb desde el ciclo 20, la cual fue menos intensa en la condición de MgCl<sub>2</sub> a 1 mM y temperatura a 67.5 °C. En las tres condiciones se observó la banda con aumento de grosor e intensidad dependiente del número de ciclos. Las de 35 y 40 ciclos fueron prácticamente igual de intensas. En ninguna de las 3 condiciones ni en ninguno de los ciclos se observaron amplificaciones inespecíficas o formación de dímeros de oligonucleótidos. Se concluyó que la condición con MgCl<sub>2</sub> a 1.5 mM y temperatura de alineamiento de 67.5 °C fue la condición con mejor calidad de amplificación desde ciclo 20 sin presencia de inespecificidades o dímeros y bandas más intensas en ciclo 35 y 40.



*Figura 13. Polimorfismos de un solo nucleótido en el sitio de unión al ADN del gen que codifica para el factor de transcripción FOXO1 en individuos mexicanos con resistencia a la insulina. 2021. PCR por curva de ciclos de las 3 mejores condiciones seleccionadas (B11, B12 y C11).*

Con la condición seleccionada de  $\text{MgCl}_2$  de 1.5 mM y temperatura a 67.5 °C se realizó un PCR punto final, el cual fue sometido a un mapeo por enzima de digestión con la finalidad de determinar su identidad. Se seleccionó la enzima EcoR1, la cual corta entre la posición 221 y 222 del producto a amplificar equivalente a la posición 110,737 y 110,738 de todo el gen. EcoR1 cortó de forma cohesiva en los nucleótidos AATT y dio dos productos de digestión, uno de 221 pb y el otro de 321 pb. Se realizó el proceso de digestión enzimática siguiendo los pasos del protocolo estandarizado de nombre: “Mapeo por enzimas de restricción de productos de amplificación para verificar su identidad V1”. Se realizó corrimiento de la digestión y se observó en el foto-documentador. En la figura 14 A) se observa en el segundo carril la banda intensa correspondiente al producto de PCR sin digerir de 542pb y en el carril 3 se observaron tres bandas, dos bandas muy intensas que correspondían a los productos digeridos esperados de 321pb una y la otra de 221pb; la tercera banda que se observó fue de menor tamaño e intensidad correspondiente al producto de PCR de 542pb que no fue digerido. Con lo que se logró concluir que el producto de PCR obtenido es el deseado y esperado, según el tamaño de pares de bases tanto por PCR punto final como por mapeo de enzima de digestión.

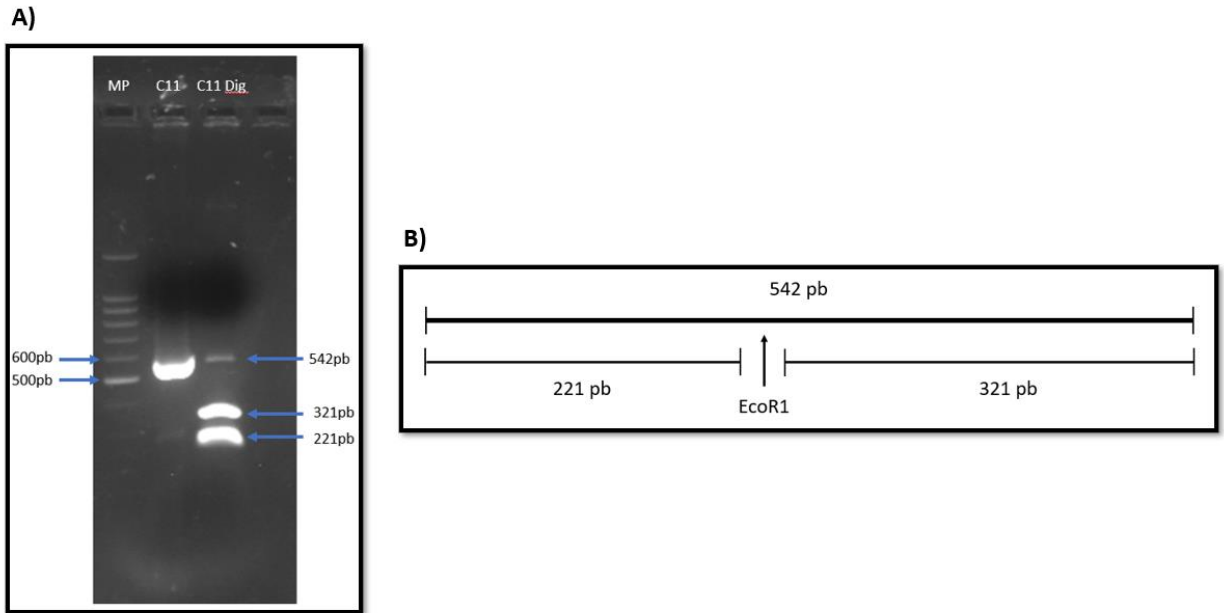


Figura 14. Polimorfismos de un solo nucleótido en el sitio de unión al ADN del gen que codifica para el factor de transcripción FOXO1 en individuos mexicanos con resistencia a la insulina. 2021. Mapeo por enzima de restricción EcoRI del fragmento amplificado del gen que codifica para FOXO1. En A) se observa un gel de agarosa en el cual se corre el producto de PCR punto final en el carril 2 denominado C11, en carril 3 denominado C11 Dig se corre el producto de PCR punto final posterior al proceso de digestión enzimática. En B) se muestra un esquema del producto digerido por EcoRI con los dos productos de 221 y 321 pb.

### 11.5 Evaluación de Pureza e integridad de las muestras de ADN

Una vez completada la estandarización del par de oligonucleótidos, se procedió a evaluar la pureza e integridad de las muestras de ADN en el Biodrop. En la tabla 4 se muestran los promedios de los valores de pureza y concentración obtenidos, así como el rango mínimo y máximo. Se evaluó si las muestras se encontraban contaminadas, o en rango aceptable u óptimo tanto de sales y fenoles como de proteínas. El 37% de las muestras se encontró con pureza aceptable y óptima y el 63% se encontró con contaminación por parte de sales y fenoles. En cuanto a la pureza proteica el 93% de las muestras se encontraron con pureza aceptable y óptima libre de contaminación por proteínas mientras que el 7% mostró contaminación proteica.

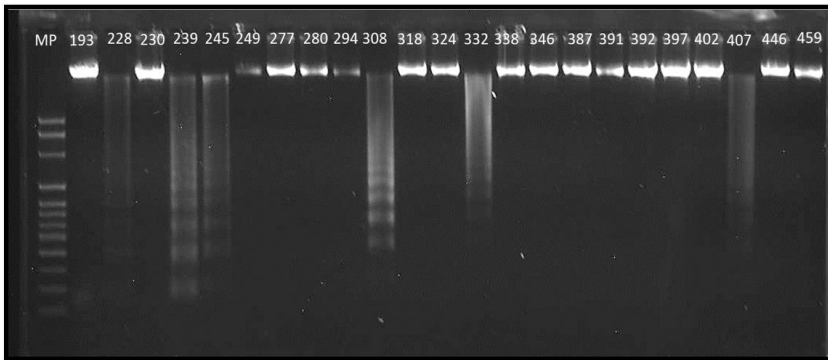
Variable	Promedio	Desviación Estándar	Rango Mínimo	Rango Máximo
260/230 (nm)	1.45	0.773	0.103	3.185
260/280 (nm)	1.75	0.107	1.582	2.206
Concentración (ug/ul)	0.2	0.169	0.019	0.919

260/230	Frecuencia	Porcentaje	260/280	Frecuencia	Porcentaje
0	19	63%	0	2	7%
1	3	10%	1	24	80%
2	8	27%	2	4	13%
<b>Total</b>	30	100%	<b>Total</b>	30	100%

Tabla 4. Polimorfismos de un solo nucleótido en el sitio de unión al ADN del gen que codifica para el factor de transcripción FOXO1 en individuos mexicanos con resistencia a la insulina. 2021. Promedios y frecuencias de los valores de pureza y contaminación de las muestras de DNA de la población de estudio.

Para la evaluación de la integridad se realizó un gel de agarosa al 1.5% en el cual se colocaron las muestras y se corrieron en cámara de electroforesis observándose dicho gel en el foto-documentador, revelando bandas gruesas e intensas bien delimitadas en caso de una muestra de ADN íntegro y un barrido en el recorrido del carril en el caso de una muestra de ADN degradado. En la figura 15 se observa una imagen representativa (figura 15A) de la evaluación de la integridad de las muestras de DNA en gel de agarosa, así como una tabla resumiendo las frecuencias de integridad de las 30 muestras (figura 15B). Se observó una integridad del 67% y un 33% de muestras degradadas, pero debido a la alta sensibilidad de la técnica de PCR y por ser un fragmento genómico de pequeño tamaño el que interesó para el estudio, se procedió a realizar la técnica en todas las muestras.

A)



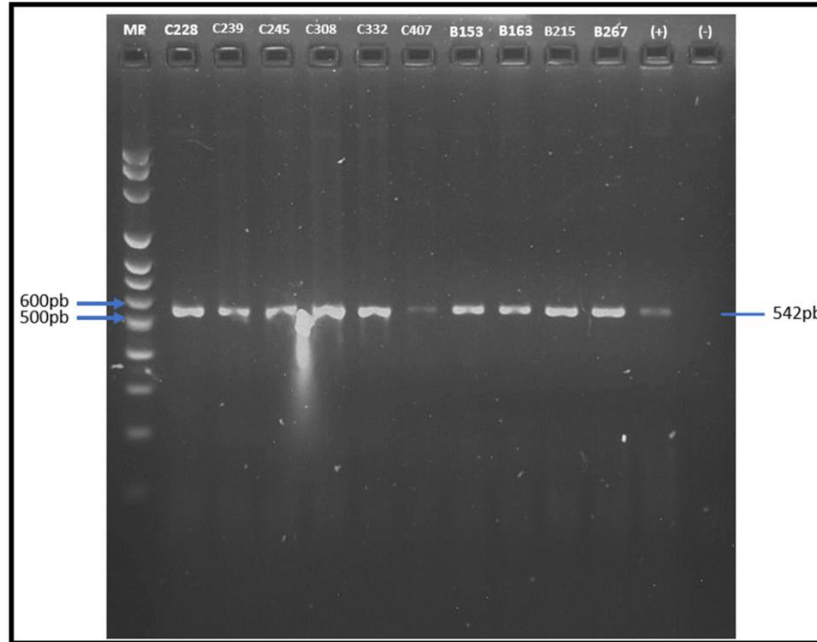
B)

Integridad	Frecuencia	Porcentaje
Integra	20	67%
Degradado	10	33%
Total	30	100%

*Figura 15. Polimorfismos de un solo nucleótido en el sitio de unión al ADN del gen que codifica para el factor de transcripción FOXO1 en individuos mexicanos con resistencia a la insulina. 2021. En A) se observa gel de agarosa al 1.5% representativo en la evaluación de la integridad, se observan bandas bien definidas y delimitadas en la mayoría de los carriles y barrido en los carriles restantes. En B) tabla con la frecuencia de ADN íntegro o degradado del total de las muestras evaluadas.*

### 11.6 Amplificación del segmento de FOXO1 de interés por PCR

Se procedió a realizar el PCR punto final con los oligonucleótidos de FOXO1 ya estandarizados como se describió previamente y los cuales fueron alicuotados bajo el código “Foxo1 F2” para el oligonucleótido Sentido y “Foxo1 R2” para el oligonucleótido anti-sentido. Se llevó a cabo el PCR y se corrió un gel de agarosa al 2% donde se corroboró la amplificación del producto y dichos productos fueron del tamaño esperado de 542 pb. En la figura 16 se muestra una imagen del gel de agarosa con las bandas representativas de los amplicones obtenidos que correspondieron al tamaño esperado, con amplificación adecuado del control positivo y sin amplificación en el control negativo.



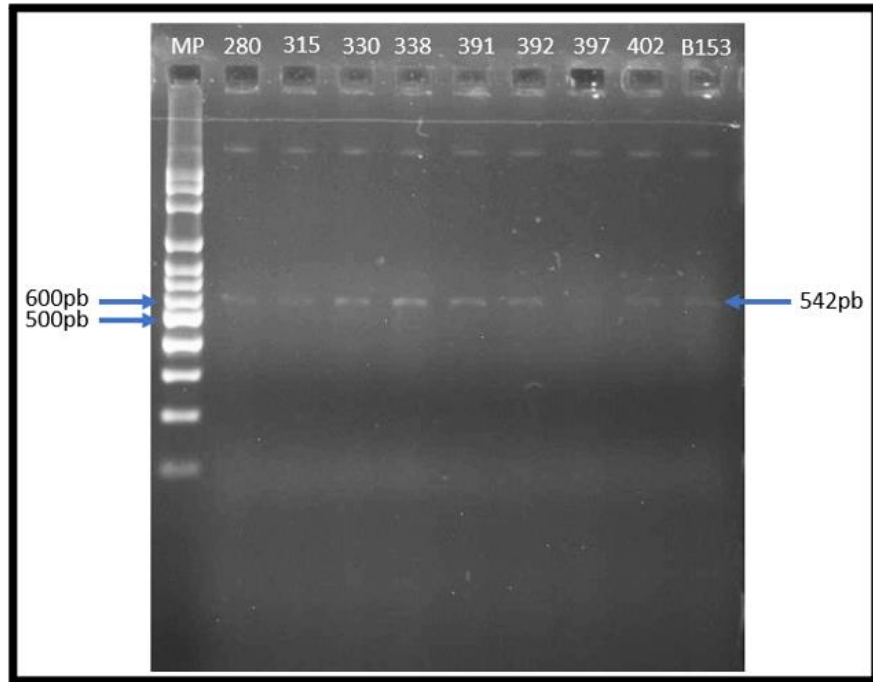
*Figura 16. Polimorfismos de un solo nucleótido en el sitio de unión al ADN del gen que codifica para el factor de transcripción FOXO1 en individuos mexicanos con resistencia a la insulina. 202. Gel de agarosa al 2% corroborando la amplificación del producto de PCR y que dicho producto fue del tamaño deseado.*

### **11.7 Purificación de Productos de PCR**

Una vez obtenidos los productos de PCR, se inició la labor de purificación de los productos de PCR siguiendo los pasos del protocolo que lleva por título “Purificación de productos de PCR por el método de fenol V4”. Una vez finalizado el proceso de purificación se realizó la cuantificación en el Biodrop de cada uno de los productos purificados, también se verificó la integridad de los productos purificados al ser observados en un gel de agarosa al 2%, en el cual se apreciaron bandas tenues y bien delimitadas que correspondieron a los productos purificados tal y como se observa en la figura 17.

Los productos de PCR se prepararon en alícuotas para su transporte y secuenciación en el IBT, cumpliendo con las especificaciones solicitadas por la Unidad de Síntesis y Secuenciación, por lo que se entregaron 100 ng del producto purificado con 10 pmol del oligonucleótido sentido “Foxo1 F2”.





*Figura 17. Polimorfismos de un solo nucleótido en el sitio de unión al ADN del gen que codifica para el factor de transcripción FOXO1 en individuos mexicanos con resistencia a la insulina. 2021. Gel de agarosa al 2% en el que se observan las bandas correspondientes a los productos de PCR purificados.*

### **11.8 Evaluación de la calidad de las secuencias de ADN**

Una vez obtenida la secuenciación se evaluaron las 30 muestras secuenciadas verificando los criterios de calidad para poder ser analizadas. Se obtuvo un RFU por arriba de 500 al igual que se realizó el cálculo de QV=20 en el total de la secuencia recibida, así como de la región que correspondía al FH/DBD del exón 2. El promedio de QV=20 fue de 93% por el total de las secuencias completas y superior al 99% al limitarnos a la región FH/DBD de las 30 secuencias, tal y como se observa en la tabla 5.

Variable	Promedio	Desviación Estándar	Rango Mínimo	Rango Máximo
QV $\geq$ 20	449	56.40	277	492
Bases Analizadas	480	20.45	418	511
Porcentaje	93%	0.098	62%	99%

Variable	Promedio	Desviación Estándar	Rango Mínimo	Rango Máximo
QV $\geq$ 20	89.5	1.80	82	90
Bases Analizadas	90	0	90	90
Porcentaje	99.40%	2.19	91%	100%

*Tabla 5. Polimorfismos de un solo nucleótido en el sitio de unión al ADN del gen que codifica para el factor de transcripción FOXO1 en individuos mexicanos con resistencia a la insulina. 2021. Promedios y frecuencias relativas de los valores de calidad QV $\geq$ 20 en el total de las secuencias, evaluando la secuencia reportada completa (arriba) y limitándonos a la región FH/DBD (abajo).*

En la figura 18 se observa un ejemplo de electroferograma con el programa Snapgene donde se observaron los picos bien delimitados y espaciados, las barras de QV $\geq$ 20 en la parte inferior y la secuencia de nucleótidos en la parte superior. Se señaló con una flecha el sitio correspondiente a un SNP, en la secuencia se observó una R la cual fue interpretada utilizando la nomenclatura IUPAC, representando la posibilidad de una Adenina o de una Guanina en el sitio específico. En el electroferograma se observaron los dos picos ocupando el mismo sitio uno encima del otro, correspondientes a las dos bases nitrogenadas previamente mencionadas. En el caso ejemplificado, el SNP correspondió a A>G. La secuencia utilizada en el ejemplo es la C-UDMM-245.

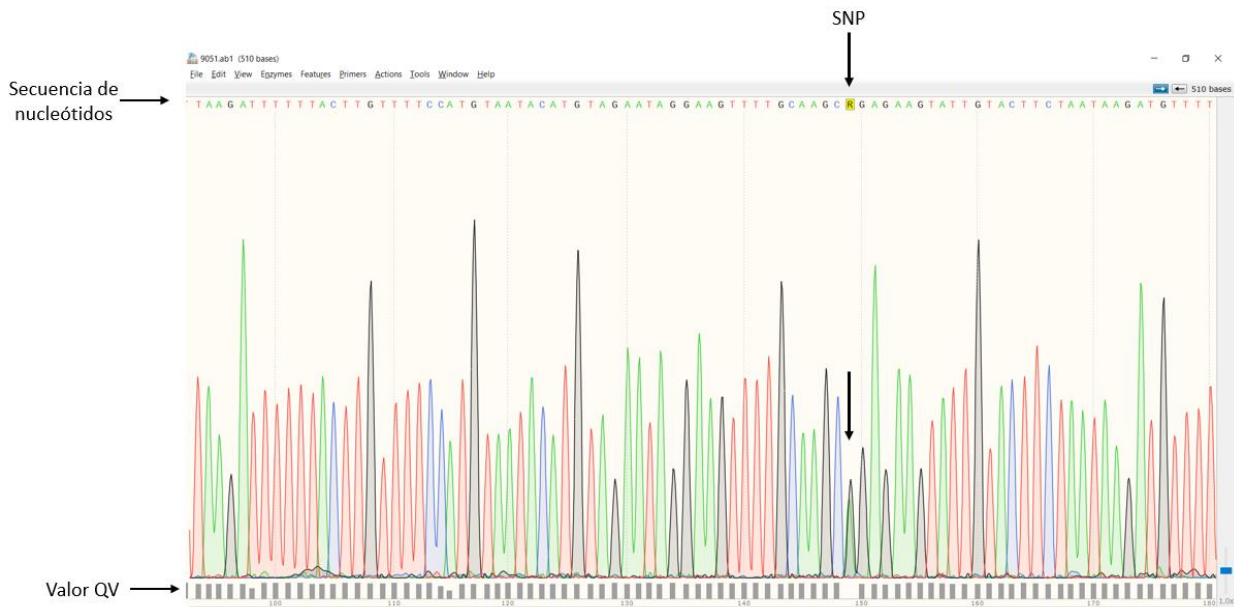


Figura 18. Polimorfismos de un solo nucleótido en el sitio de unión al ADN del gen que codifica para el factor de transcripción FOXO1 en individuos mexicanos con resistencia a la insulina. 2021. Electroferograma de la secuencia C-UDMM-245. Se observan las barras de  $QV \geq 20$ , la secuencia de nucleótidos en la cual se señaló la base y el sitio en el que se encontró un SNP.

Las secuencias analizadas fueron las siguientes: B-UDMM-153, B-UDMM-163, B-UDMM-215, B-UDMM-267, C-UDMM-193, C-UDMM-228, C-UDMM-230, C-UDMM-239, C-UDMM-245, C-UDMM-249, C-UDMM-259, C-UDMM-269, C-UDMM-277, C-UDMM-280, C-UDMM-294, C-UDMM-308, C-UDMM-310, C-UDMM-315, C-UDMM-318, C-UDMM-324, C-UDMM-330, C-UDMM-332, C-UDMM-338, C-UDMM-346, C-UDMM-391, C-UDMM-392, C-UDMM-402, C-UDMM-407, C-UDMM-436, C-UDMM-440.

### 11.9 Análisis y alineamiento de las secuencias.

Se realizó alineamiento múltiple entre cada una de las secuencias de los voluntarios contra la secuencia de referencia de FOXO1: NG\_023244.1. En la figura 19 se muestra un ejemplo, en la cual se alineó la secuencia C-UDMM-245 contra la secuencia referencia de FOXO1 en el programa DNA Dynamo. En el total de las 30 secuencias analizadas, 15 presentaron entre 1 a 6 SNP (50%). En todas ellas se identificaron 13 SNP distintos en todo el segmento secuenciado y específicamente, en la región que correspondía al FH/DBD del exón 2 se identificaron 3 SNP distintos, dos de ellos presentes en la secuencia C-UDMM-402, que fueron el SNP G>C de la posición 110,781 del gen que codifica para FOXO1 y posición 40,560,817 del cromosoma 13, así como el SNP G>C de la posición 110,818 del gen que

codifica para FOXO1 y posición 40,560,780 del cromosoma 13, este segundo SNP se encontró específicamente en el Sitio de Unión al ADN 2. El tercer SNP identificado en la región FH/DBD del exón 2 correspondía a la secuencia B-UDMM-153 siendo el SNP A>C de la posición 110,826 del gen que codifica para FOXO1 y posición 40,560,772 del cromosoma 13. Los 3 SNP que se hallaron presentaron una frecuencia de 3.33% y ninguno de los identificados en la región FH/DBD ha sido reportado en la base de datos de NCBI (tabla 6).



Figura 19. Polimorfismos de un solo nucleótido en el sitio de unión al ADN del gen que codifica para el factor de transcripción FOXO1 en individuos mexicanos con resistencia a la insulina. 2021. Alineamiento múltiple entre secuencia C-UDMM-245 contra secuencia de referencia de FOXO1 del NCBI. En la parte superior se observa el código de nucleótidos en el cual marca con rojo el sitio de la letra R correspondiente al SNP. Abajo se observa el electroferograma de la secuencia estudiada con los dos picos correspondientes a Adenina y Guanina ocupando el mismo sitio.

SNP (cambio nt)	Frecuencia	Posición segmento	Posición gen	Posición cromosoma	Reportado	Frecuencia Reportada
G>C	3.33% (1)	265	110,781	40,560,817	No reportado	No aplica
G>C	3.33% (1)	302	110,818	40,560,780	No reportado	No aplica
A>C	3.33% (1)	310	110,826	40,560,772	No reportado	No aplica

Tabla 6. Polimorfismos de un solo nucleótido en el sitio de unión al ADN del gen que codifica para el factor de transcripción FOXO1 en individuos mexicanos con resistencia a la insulina. 2021. SNP identificados en la región FH/DBD del exón 2 del gen que codifica para FOXO1. Se enlista el cambio de nucleótido, su frecuencia, la posición con respecto al segmento amplificado (542pb), la posición en el gen y la posición en el cromosoma. Ninguno de los 3 SNP ha sido reportado con anterioridad.

El segmento amplificado también abarcó una zona que correspondía al intrón 2, así como región del exón 2 que no correspondía al FH/DBD pero que incluyó algunos sitios de interés como el NLS. Fue en estas regiones en las cuales se identificaron 10 SNP distintos. Con respecto a los SNP identificados en el intrón, el SNP A>G de la posición 110,697 del gen que codifica para FOXO1 ya cuenta con código de registro en la base de datos de NCBI (rs3751436) y su frecuencia más alta es reportada por la base de datos gnomAD que es de 7.5304% (13,968/185,488),<sup>109</sup> dicho SNP no se ha asociado a ninguna patología ni cuenta con publicaciones de significancia clínica. En el presente estudio se obtuvo con una frecuencia del 33.33% (10/30).

Por su parte el SNP G>A de la posición 110,591 del gen que codifica a FOXO1 se encontró con una frecuencia de 16.66% (5/30), siendo el segundo SNP de mayor frecuencia identificado en el presente estudio y también corresponde a un SNP en región intrónica. Por otra parte, el SNP G>C de la posición 110,859 del gen que codifica para FOXO1 corresponde a un SNP identificado en el NLS, dicho SNP únicamente fue identificado en la secuencia C-UDMM-402.

En total se encontraron 4 SNP en la región amplificada que corresponde al intrón 2 y otros 6 SNP que corresponden al exón 2 pero que se encontraron fuera de la región FH/DBD (tabla 7).

SNP	Frecuencia	Posición segmento	Posición gen	Posición cromosoma	Intrón / Exón	Reportado	Frecuencia Reportada
G>A	16.66% (5)	75	110,591	40,561,007	Intrón	No reportado	No aplica
G>T	3.33% (1)	90	110,606	40,560,992	Intrón	No reportado	No aplica
G>T	3.33% (1)	91	110,607	40,560,991	Intrón	No reportado	No aplica
A>G	33.33% (10)	181	110,697	40,560,901	Intrón	rs3751436	7.5304%
A>C	3.33% (1)	325	110,841	40,560,757	Exón	No reportado	No aplica
G>C	3.33% (1)	328	110,844	40,560,754	Exón	No reportado	No aplica
G>C	3.33% (1)	343	110,859	40,560,739	Exón	No reportado	No aplica
A>C	6.66% (2)	413	110,929	40,560,669	Exón	No reportado	No aplica
G>T	6.66% (2)	521	111,037	40,560,561	Exón	No reportado	No aplica
C>G	3.33% (1)	535	111,051	40,560,547	Exón	No reportado	No aplica

*Tabla 7. Polimorfismos de un solo nucleótido en el sitio de unión al ADN del gen que codifica para el factor de transcripción FOXO1 en individuos mexicanos con resistencia a la insulina. 2021. SNP identificados en el intrón 2 y en la región del exón 2 que no corresponde al FH/DBD del gen que codifica para FOXO1, se enlista el cambio de nucleótido, su frecuencia, la posición con respecto al segmento amplificado (542pb), la posición en el gen y la posición en el cromosoma.*

### **11.10 Análisis de la traducción de nucleótido a proteína y predictor de daño proteico**

Finalmente se realizó una traducción de nucleótido a proteína en los 9 SNP que fueron hallados en la región codificante del exón 2, con la finalidad de obtener una predicción del posible daño que las variantes estudiadas podrían estar ocasionando en la estructura, estabilidad o funcionalidad de la proteína. Se utilizó el programa PolyPhen-2, el cual es un software gratuito para su uso en línea, en el cual se introdujo la secuencia de referencia de la proteína de FOXO1 del NCBI: NP\_002006.2 y se especificó el cambio de aminoácido que ocurrió con el SNP correspondiente identificado previamente por los experimentos.

Todos los SNP identificados fueron reportados como no sinónimo, por lo que el cambio del nucleótido ocasionó el cambio del aminoácido correspondiente a esa sección. Los 9 cambios de aminoácidos de los 9 SNP, con excepción de uno, presentaron el cambio a un aminoácido de un grupo diferente, de los cuales se destaca el cambio de aminoácido de la posición 225 en el cual se intercambió una Arginina perteneciente al grupo de los aminoácidos cargados positivamente por una Prolina que es un aminoácido no polar, alifático.

Con excepción del aminoácido del sitio 246, en el cual se presentó un cambio de Serina por Treonina siendo ambos aminoácidos del grupo polar sin carga, de las predicciones arrojadas, 8 de las 9 variantes se pronosticaron como “Probablemente dañina” para estructura y/o función de la proteína (tabla 8).

<b>Posición gen / Cambio nt</b>	<b>Posición proteína / cambio aa</b>	<b>Efecto en estructura y función</b>
110,781 G>C	225 Arg>Pro	Probablemente dañino
110,818 G>C	237 Trp>Cys	Probablemente dañino
110,826 A>C	240 Asn>Thr	Probablemente dañino
110,841 A>C	245 Lys>Thr	Probablemente dañino
110,844 G>C	246 Ser>Thr	Benigna
110,859 G>C	251 Arg>Thr	Probablemente dañino
110,929 A>C	274 Lys>Asn	Probablemente dañino
111,037 G>T	310 Trp>Cys	Probablemente dañino
111,051 C>G	315 Pro>Arg	Probablemente dañino

*Tabla 8. Polimorfismos de un solo nucleótido en el sitio de unión al ADN del gen que codifica para el factor de transcripción FOXO1 en individuos mexicanos con resistencia a la insulina. 2021. Predicción de la estructura, estabilidad y función de la proteína a partir el cambio de aminoácido producido por el cambio de nucleótido único. Se enlista la posición en el gen con su cambio de nucleótido, así como la posición en la proteína de dicho cambio.*

El total de SNP identificados en el presente estudio, organizados por las muestras de los voluntarios y por posición del SNP se muestran en la tabla 9.

Código Voluntario	SNP													Cantidad	Sexo	Edad	Insulina	Glucosa	HOMA-IR
	Intrón 2				Exón 2														
	Posición 1	Posición 2	Posición 3	Posición 4	Posición 1	Posición 2	Posición 3	Posición 4	Posición 5	Posición 6	Posición 7	Posición 8	Posición 9						
CUDMM-193	G110591A	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	1	femenino	48	22.5	89	4.94
CUDMM-245	----	----	----	A110697G	----	----	----	----	----	----	----	----	----	1	femenino	40	16.47	84	3.42
CUDMM-259	----	----	----	A110697G	----	----	----	----	----	----	----	----	----	1	femenino	37	25.37	110	6.89
CUDMM-269	----	----	----	A110697G	----	----	----	----	----	----	----	----	----	1	masculino	20	14.7	99	3.59
CUDMM-310	----	----	----	----	----	----	----	----	----	A110929C	----	C111051G	----	2	femenino	19	16.44	80	3.25
CUDMM-318	----	----	----	A110697G	----	----	----	----	----	----	----	----	----	1	femenino	36	22	100	5.43
CUDMM-324	----	----	----	A110697G	----	----	----	----	----	----	----	----	----	1	femenino	39	32.84	94	7.62
CUDMM-330	G110591A	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	1	masculino	39	12	101	2.99
CUDMM-391	G110591A	----	----	A110697G	----	----	----	----	----	----	----	----	----	2	masculino	55	33.46	130	10.74
CUDMM-392	----	----	----	A110697G	----	----	----	----	----	----	----	----	----	1	femenino	32	15.8	100	3.90
CUDMM-402	----	G110606T	G110607T	----	G110781C	G110818C	----	----	----	G110859C	----	G111037T	----	6	femenino	20	19.66	95	4.61
CUDMM-407	----	----	----	A110697G	----	----	----	----	----	----	----	----	----	1	masculino	28	23.14	117	6.68
BUDMM-153	G110591A	----	----	----	----	----	A110826C	A110841C	G110844C	----	A110929C	G111037T	----	6	masculino	35	70.85	138	24.14
BUDMM-215	----	----	----	A110697G	----	----	----	----	----	----	----	----	----	1	masculino	28	14.16	95	3.32
BUDMM-267	G110591A	----	----	A110697G	----	----	----	----	----	----	----	----	----	2	masculino	30	26.04	85	5.47
															X	34	24.36	101	6.47

Tabla 9. Polimorfismos de un solo nucleótido en el sitio de unión al ADN del gen que codifica para el factor de transcripción FOXO1 en individuos mexicanos con resistencia a la insulina. 2021. SNP identificados divididos por voluntario. Se enlista la región y posición en la cual fue identificado el SNP, así como las variables de sexo, edad, insulina, glucosa y HOMA-IR.



## **12. Discusión**

### **12.1 Resistencia a la insulina en individuos sanos.**

La población blanco del presente estudio se presentó como aparentemente sana, más cabe recalcar que fue una población acotada, ya que los participantes fueron voluntarios donadores de sangre. No obstante, los resultados finales se reportan para las muestras sanguíneas de 30 voluntarios, el proceso de identificación del cumplimiento de criterios de inclusión mostró que 173 de 370 de los individuos con información sobre índice HOMA-IR presentaron valores por arriba del límite deseado, indicando que 46% de ellos presentaban alteración en la regulación de glucosa-insulina. Ese dato fue similar al reportado en otros estudios realizados en México, como el 39% de niños de ascendencia maya con resistencia a la insulina,<sup>74</sup> o el de 49% en adultos, al utilizar el mismo procedimiento de estimación de HOMA-IR.<sup>76</sup>

Lo anterior puede sugerir que la curva de alteraciones metabólicas se encuentra sufriendo un desplace en los grupos etarios, con un inicio en la presentación de las alteraciones metabólicas a edades más tempranas, aumentando de esta manera la prevalencia e incidencia en adultos menores a los 30 años, lo que hace suponer que existe en nuestro país una oportunidad desperdiciada, al no establecer la identificación de RI como una medida anticipatoria al desarrollo de patologías en las que subyace esta condición. Al respecto, un estudio donde se comparaba la utilidad del HOMA-IR con una sola determinación de insulinemia como predictor de la alteración en el metabolismo de la glucosa concluyó que el cálculo del HOMA-IR es de utilidad en la práctica clínica diaria.<sup>110</sup>

### **12.2 FOXO1 como un gen relevante en la resistencia la insulina.**

Al ser FOXO1 un blanco en la cascada de la vía de señalización de la insulina y ser un factor de transcripción de genes que participan en los procesos de gluconeogénesis, se propuso como un candidato excepcional para realizar el presente estudio de secuenciación e identificación de SNP, específicamente en el sitio de unión al ADN. Dicho dominio se encuentra codificado por la región Forkhead que abarca un fragmento del exón 1 y otro del exón 2 pero dichos exones se encuentran divididos entre sí por el intrón 1 que se encuentra constituido por 100,000 pares de bases por lo que fue imperativo centrarse en alguna de las dos regiones; debido a que en la sección del exón 2 se encuentran los dos sitios de unión al ADN como el Sitio de Localización Nuclear, se consideró de mayor importancia realizar el estudio de secuenciación en

dicha región, tomando en cuenta para ello que hasta la fecha no se han reportado estudios que asocien algún SNP del Dominio de Unión al ADN de FoxO1 con alguna patología metabólica.

Del total de muestras secuenciadas (30) en el 50% se identificaron SNP. De los 13 identificados, hubo uno que sobresalió en su aparición con relación al resto, encontrándose en el 33% de la población estudiada. Dicho SNP se encuentra registrado y cuenta con el código de registro rs3751436 el cual también ha sido reportado con altas frecuencias en varias bases de datos a nivel mundial. La base de datos que reporta una mayor frecuencia, tanto relativa como absoluta, es la base de datos gnomAD con un porcentaje de 7.5304% (13,968/185,488); al enfocarnos en los valores de frecuencia por etnia, específicamente en lo reportado sobre la población latino-mestiza se observó un porcentaje de 11.3517% (2,783/24,516).<sup>109</sup> En la base de datos de gnomAD no se especifica cuántos individuos de ese porcentaje son población mestizo-mexicana, por lo que el dato de frecuencia relativa y frecuencia absoluta sobre la población mexicana debería variar a lo presentado, probablemente asemejándose a lo encontrado en nuestra población de estudio, de ahí la necesidad de realizar más estudios de esta índole pero en población mayor y abierta.

El SNP que identificamos con más alta frecuencia después de rs3751436 fue el correspondiente a G110591A, identificado en 5 voluntarios (16.7%), pero a diferencia del anterior SNP, este no se encontró reportado en ninguna base de datos. Tanto el SNP rs3751436 como el G110591A son SNP identificados en el intrón 2 del gen que codifica para FOXO1, por lo que no formaron parte de nuestro objetivo principal, aun así, son resultados relevantes que nos demuestran la importancia de continuar realizando este tipo de estudios sobre la población abierta para poder obtener información nueva que corrobore lo aquí presentado; de ser así, sería posible proponer evaluar su asociación con alteraciones metabólicas con presencia de RI, entre ellas la DT2.

En relación con la región secuenciada cuyo objetivo principal se propuso en el estudio actual, se logró identificar 10 SNP distintos en la base de datos del NCBI, que es la región que codifica para FH/DBD del exón 2 de FOXO1, pero ni uno de los 10 SNP reportados tiene alguna publicación que lo asocie a alguna enfermedad, por lo que no presentaron relevancia clínica durante la realización de este estudio.

De los 3 SNP distintos identificados y reportados en este estudio, no existió coincidencia con alguno de los 10 previamente reportados en la base de datos, por lo que nos encontramos ante nuevos polimorfismos de nucleótido único del Dominio de Unión al ADN de FOXO1. Específicamente, al centrarnos en el sitio de unión al ADN 1 y 2 que conforma a FOXO1 dentro del DBD, en la base de datos encontramos 4 de los 10 SNP antes mencionados y estos 4 se encontraron justamente en el sitio de unión al ADN 2 en el cual identificamos un nuevo SNP, el cual corresponde al G110818C presente en el voluntario C-UDMM-402 que también coincide con ser uno de los dos voluntarios con presentar el mayor número de SNP en la muestra estudiada. El SNP identificado en el sitio de unión al ADN no coincide con alguno de los reportados con anterioridad a nivel global.

Una de las interrogantes formuladas fue al no encontrar alguno de los 4 SNP que cuentan con registro en el NCBI y que se esperaba encontrar por su alta frecuencia a pesar de que el estudio actual fue realizado en una población pequeña. Una de las explicaciones propuestas se refiere a la diferencia de etnias poblacionales en las cuales se llevan a cabo los estudios. Las diferencias en frecuencia tan significativas nos permiten sugerir que SNP reportados en la base de datos NCBI corresponde a SNP propios de la población ahí incluida, que difiere de la observada en población mestizo-mexicana.

El mayor número de SNP se encontró en una de las muestras (CUDMM-402). Al revisar las características de dicho voluntario resaltaron su edad de 20 años y valores de glucosa en ayuno normales (95mg/dL) con un estado de hiperinsulinemia (19.66 UI/ml). Esto apoyaría la posibilidad de un componente de susceptibilidad genética, ya que de los 30 voluntarios secuenciados fue el que mayor número de SNP (6: G110606T, G110607T, G110781C, G110818C, G110859C, G111037T) arrojó en la región estudiada.

Otro SNP identificado fue el que correspondía al código G110859C encontrado en el NLS. Dicho SNP pertenecía a uno de los 6 SNP identificados en la muestra del voluntario C-UDMM-402. Un estudio realizado in vivo donde se crea una mutación en un residuo de aminoácido del Sitio de Exportación Nuclear imita una fosforilación que se mantiene e impide la acción de la proteína Akt por lo que FOXO1 se mantiene de forma activa cumpliendo su función donde aumenta la producción hepática de glucosa, perpetuando el estado de hiperglucemia del paciente.<sup>26</sup> De manera similar, el que hayamos identificado un polimorfismo en un sitio que

determina la función del Factor de transcripción como lo es el NLS puede ocasionar un aumento en su función o una más rápida y/o eficaz degradación, dependiendo cual sea el caso, ya fuese dirigido a pérdida o ganancia de función, lo cual le podría conferir a la variante una función protectora o de riesgo según sea el caso. En los SNP identificados en el presente estudio y lo visto con los datos de la muestra C-UDMM-402, podemos sugerir que el polimorfismo podría estar fungiendo como un factor de riesgo para el desarrollo de la alteración metabólica estudiada, esto último lo pudimos reforzar con la evaluación de predictor de daño proteico, donde justamente el programa de PolyPhen v2 nos dio un pronóstico de “probable daño para la estructura y función de la proteína” al presentar el cambio de nucleótido en el SNP G110859C.

Del total de SNP identificados en la región codificante del exón 2 y que fueron igualmente evaluados sus cambios de aminoácido para obtener un pronóstico de daño a la proteína, el 88% presentó una predicción de probablemente dañina, incluyendo los tres SNP identificados en el DBD y el SNP identificado en el NLS. Únicamente el SNP G110844C dio una predicción de probablemente benigno, lo que posiblemente se debió a que ese polimorfismo ocasionó un cambio de aminoácido del mismo grupo polar sin carga por lo que no se vio afectada la estabilidad proteica.

### **12.3 SNP relacionados con resistencia a la Insulina.**

En estudios que han evaluado la asociación entre RI y el desarrollo de diabetes, se ha logrado identificar el papel de una serie de variantes alélicas en diferentes genes, asociados al estado de RI y también a la ocurrencia de DT2. Un estudio de asociación realizado en población iraní identificó la relación entre el SNP rs2274907 de Omentina y el SNP rs9939609 de FTO con el desarrollo de DT2 a través de RI.<sup>102</sup> En otro estudio, en población pakistaní, también se identificó esta asociación.<sup>105</sup> En niños mexicanos del estado de Guerrero, México, se logró relacionar el SNP -2518 A>G MCP1 con el posible desarrollo de RI.<sup>103</sup> Al repasar el proceso fisiopatológico de las alteraciones metabólicas relacionados con la homeostasis de glucosa e insulina, con el antecedente que se tiene de estudios de asociación de otros SNP sobre otros factores de transcripción o proteínas con funciones directas e indirectas sobre los mecanismos regulatorios, sumado a los antecedentes de estudios de asociación realizados sobre SNP diversos de FOXO1 en etnias diferentes a la de nuestro estudio, es posible suponer que existen muy altas

probabilidades que alguno de los SNP que fueron identificados en nuestro estudio arrojen resultados con significancia similar sobre la condición bioquímica de RI.

### **13. Conclusiones**

En población mexicana con resistencia a la insulina G110781C, G110818C y A110826C constituyen SNP en el FH/DBD del exón 2 de FOXO1 que no contaban con reportes previos. G110591A, G110606T, G110607T, A110841C, G110844C, G110859C, A110929C, G110037T y C110051G constituyen SNP no pertenecientes al sitio FH/DBD en el intrón 2 y exón 2 de FOXO1.

### **14. Fortalezas y limitaciones**

Este estudio permitió identificar la presencia de SNP en la región FH/DBD de FOXO1 que hasta la fecha no han sido reportados en alguna otra población. Además de ellos, se identificaron unos de los SNP con registro y estudios ya documentados a nivel global. Todos los procedimientos de laboratorio realizados se encuentran protocolizados y estandarizados y los resultados obtenidos de estos cumplen con los criterios de calidad esperados. Se logró estandarizar la amplificación de un segmento de un gen del cual no se contaban estudios previos en nuestra población. Los resultados obtenidos de la secuenciación cumplen con una calidad mayor del 99% por lo que son de alta confiabilidad. Es posible considerar como principal limitación de nuestro estudio la relativa al tamaño de muestra, si bien se trató de un aspecto que se vio condicionado por limitantes de tipo operativo que no fueron atribuidas a una decisión del grupo de investigación. Aun así, el presente estudio da la pauta para la realización de nuevos estudios que logren ahondar en la función que tiene el gen que codifica para FOXO1 en la ocurrencia de RI, y su posible asociación con dicha condición.

### **15. Perspectivas de investigación**

- Secuenciación de las dos muestras de voluntarios cuyos SNP identificados corresponden al Dominio de Unión al ADN, en esta ocasión utilizando el oligonucleótido reverso.
- Realizar un estudio de asociación de los SNP identificados en el FH/DBD en relación con la resistencia a la insulina en población mestizo-mexicana.
- Realizar un estudio de asociación de los SNP identificados con mayor frecuencia en el intrón 1 en relación con la resistencia a la insulina en población mestizo-mexicana.

## 16. Referencias bibliográficas

1. Galgani JE, Ravussin E. Postprandial whole-body glycolysis is similar in insulin-resistant and insulin-sensitive non-diabetic humans. *Diabetologia*. 2012;55(3):737-42.
2. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA et al. Harmonizing the Metabolic Syndrome. *Circulation*. 2009;120(16):1640-5.
3. Rosas J, González A, Aschner P, Bastarrachea R. Epidemiología, Diagnóstico, Control, Prevención y Tratamiento del Síndrome Metabólico en Adultos. *ALAD*. 2010;18(1):25-44.
4. Chan SJ, Steiner DF. Insulin Through the Ages: Phylogeny of a Growth Promoting and Metabolic Regulatory Hormone, *American Zoologist*. 2000; 40(2): 213–22.
5. FOXO. [Internet]. HGNC, Gene group: Forkhead boxes (FOX), citado el 25 de abril del 2019. Disponible en: <https://www.genenames.org/data/genegroup/#!/group/508>.
6. FOXO1. [Internet]. GenBank, Homo sapiens forkhead box O1 (FOXO1), Citado el 25 de abril de 2019. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/300116172/>.
7. Li Y, Ma Z, Jiang S, Hu W, Li T, Di S et al. A global perspective on FOXO1 in lipid metabolism and lipid-related diseases. *Progress in Lipid Research*. 2017; 66: 42–9.
8. Obsil T, Obsilova V. Structural basis for DNA recognition by FOXO proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011; 1813: 1946–53.
9. FOXO1 Human. [Internet]. UniProt, UniProtKB - Q12778 (FOXO1\_HUMAN), citado el 25 de abril de 2019. Disponible en: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q12778>.
10. FOXO1 gene [Internet] Genecards, The human gene database citado el 26 de enero de 2021 Disponible en: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FOXO1>.
11. Wang Y, Zhou Y, Graves DT. FOXO transcription factors: their clinical significance and regulation, *BioMed Research International*. 2014; 925350.
12. Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Aoyama H, Yoshimochi K, Fukamizu A. Acetylation of FoxO1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation. *PNAS*. 2005; 102: 11278–83.

13. Brunet A, Kanai F, Stehn J, Xu J, Sarbassova D, Frangioni JV et al. 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *Journal of Cell Biology*. 2002; 156: 817–28.
14. Tzivion G, Dobson M, Ramakrishnan G. FoxO transcription factors; regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011; 1813: 1938–45.
15. Chen J, Lu Y, Tian M, Huang Q. Molecular mechanisms of FOXO1 in adipocyte differentiation. *J Mol Endocrinol*. 2019; 62(3): R239-R253.
16. Huang H, Regan KM, Lou Z, Chen J, Tindall DJ. CDK2-dependent phosphorylation of FOXO1 as an apoptotic response to DNA damage. *Science* 2006; 314: 294-7.
17. Yuan Z, Becker EBE, Merlo P, Yamada T, DiBacco S, Konishi Y et al. Activation of FOXO1 by Cdk1 in cycling cells and postmitotic neurons. *Science*. 2008; 319: 1665-8.
18. Ramaswamy S, Nakamura N, Sansal I, Bergeron L, Sellers WR. A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. *Cancer Cell*. 2002; 2(1):81-91.
19. Wilhelm K, Happel K, Eelen G, Schoors S, Oellerich MF, Lim R et al. FOXO1 couples metabolic activity and growth state in the vascular endothelium. *Nature*. 2016; 529: 216-20.
20. Gutiérrez C, Roura A, Olivares JA. Mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina: Una actualización. *Gac Med Mex*. 2017;153(2):214-28.
21. Perrto V, Rechler M. The Coactivator p300 Directly Acetylates the Forkhead Transcription Factor Foxo1 and Stimulates Foxo1-Induced Transcription. *Mol Endocrinol*. 2005;19(9):2283-98.
22. Li K, Qiu C, Sun P, Liu DC, Wu TJ, Wang K, et al. Ets1-Mediated Acetylation of FoxO1 Is Critical for Gluconeogenesis Regulation during Feed-Fast Cycles. *Cell Rep*. 2019;26(11):2998-3010.

23. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F et al. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1-alpha interaction. *Nature*. 2003; 423: 550-5.
24. Liu Y, Dentin R, Chen D, Hedrick S, Ravnskjaer K, Schenk S et al. A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/coactivator exchange. *Nature*. 2008; 456: 269-73.
25. Wu Y, Pan Q, Yan H, Zhang K, Guo X, Xu Z, et al. Novel Mechanism of Foxo1 Phosphorylation in Glucagon Signaling in Control of Glucose Homeostasis. *Diabetes*. 2018 nov;67(11):2167-82.
26. Cheng Z, Guo S, Copps K, Dong X, Kollipar, R Rodgers et al. Foxo1 integrates insulin signaling with mitochondrial function in the liver. *Nature Med*. 2009; 15:1307-11.
27. Talchai C, Xuan S, Kitamura T, DePinho RA, Accili D. Generation of functional insulin-producing cells in the gut by Foxo1 ablation. *Nature Genet*. 2012. 44: 406-12.
28. Ambele MA, Dessels C, Durandt C, Pepper MS. Genome-wide analysis of gene expression during adipogenesis in human adipose-derived stromal cells reveals novel patterns of gene expression during adipocyte differentiation. *Stem Cell Res*. 2016;16(3):725-34.
29. Kousteni S. FoxO1, the transcriptional chief of staff of energy metabolism. *Bone*. 2012; 50: 437-43.
30. Nakae J, Cao Y, Hakuno F, Takemori H, Kawano Y, Sekioka R, et al. Novel repressor regulates insulin sensitivity through interaction with Foxo1. *Embo J*. 2012;31(10):2275-95.
31. Cristancho AG, Lazar MA. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2011; 12: 722-34.
32. MacDougald OA, Lane MD. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annual Review of Biochemistry*. 1995; 64: 345-73.



33. Nakae J, Kitamura T, Kitamura Y, Biggs WHIII, Arden KC, Accili D. The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev. Cell.* 2003; 4:119-29.
34. Kitamura T, Feng Y, Kitamura YI, Chua SC, Xu AW, Barsh GS et al. Forkhead protein FoxO1 mediates Agrp-dependent effects of leptin on food intake. *Nature Med.* 2006; 12: 534-40.
35. Rudnicki M, Abdifarkosh G, Nwadozi E, Ramos SV, Makki A, Sepa-kishi DM, et al. Endothelial-specific FoxO1 depletion preserves obesity related disorders by increasing vascular metabolism and growth. *eLife.* 2018;7: e39780.
36. Wang Y, Yan S, Xiao B, Zuo S, Zhang Q, Chen G, et al. Prostaglandin F<sub>2α</sub> Facilitates Hepatic Glucose Production Through CaMKIIγ/p38/FOXO1 Signaling Pathway in Fasting and Obesity. *Diabetes.* 2018;67(9):1748-60.
37. Battiprolu PK, Hojaye B, Jiang N, Wang ZV, Luo X, Iglewski M, et al. Metabolic stress-induced activation of FoxO1 triggers diabetic cardiomyopathy in mice. *J Clin Invest.* 2012;122(3):1109-18.
38. Altomonte J, Cong L, Harbaran S, Richter A, Xu J, Meseck M et al. Foxo1 mediates insulin action on apoC-III and triglyceride metabolism. *J. Clin. Invest.* 2004; 114:1493-1503.
39. Chan SJ, Steiner DF. Insulin Through the Ages: Phylogeny of a Growth Promoting and Metabolic Regulatory Hormone. *Am Zool.* 2000; 40: 213–22.
40. Cervantes RD, Presno JM. Fisiopatología de la diabetes y los mecanismos de muerte de las células B pancreáticas. *Revista de Endocrinología y Nutrición.* 2013;21(3):98-106.
41. White MF. Insulin signaling in health and disease. *Science.* 2003; 302:1710–1.
42. Copps KD, White MF. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia.* 2012; 55:2565–82.

43. Sun X, Liu F. Phosphorylation of IRS proteins: Yin-Yang regulation of insulin signaling. *Vitamins and Hormones*. 2009; 80:351–87.
44. Guo S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. *J Endocrinol*. 2014;220(2): T1-T23
45. Huang H, Regan KM, Wang F, Wang D, Smith DI, van Deursen JM et al. Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102:1649–54.
46. Johnson AM, Olefsky JM. The origins and drivers of insulin resistance. *Cell*. 2013; 152:673–84.
47. Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2018, Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento y control de la Diabetes Mellitus. *Diario Oficial de la Federación*, (mayo 3, 2018).
48. Brachmann SM, Ueki K, Engelman JA, Kahn RC, Cantley LC. Phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit deletion and regulatory subunit deletion have opposite effects on insulin sensitivity in mice. *Mol Cell Biol*. 2005; 25:1596–607.
49. Lu M, Wan M, Leavens KF, Chu Q, Monks BR, Fernandez S et al. Insulin regulates liver metabolism in vivo in the absence of hepatic Akt and Foxo1. *Nat Med*. 2012; 18:388–95.
50. Zhang X, Gan L, Pan H, Guo S, He X, Olson ST et al. Phosphorylation of serine 256 suppresses transactivation by FKHR (FOXO1) by multiple mechanisms. Direct and indirect effects on nuclear/cytoplasmic shuttling and DNA binding. *J Biol Chem*. 2002; 277:45276–84.
51. Evans-Anderson HJ, Alfieri CM, Yutzey KE. Regulation of cardiomyocyte proliferation and myocardial growth during development by FOXO transcription factors. *Circ Res*. 2008; 102:686–94.
52. Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest*. 2008; 118:2992-3002.

53. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiol Rev*, 2018; 98: 2133-223.
54. Obici S, Zhang BB, Karkanias G, Rossetti L. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med*. 2002; 8:1376–82.
55. Myers MG Jr, Olson DP. Central nervous system control of metabolism. *Nature*. 2012; 491:357–63.
56. Warne JP, Alemi F, Reed AS, Varonin JM, Chan H, Piper ML et al. Impairment of central leptin-mediated PI3K signaling manifested as hepatic steatosis independent of hyperphagia and obesity. *Cell Metab*. 2011; 14:791–803.
57. Sadagurski M, Leshan RL, Patterson C, Rozzo A, Kuznetsova A, Skorupski J et al. IRS2 signaling in LepR-b neurons suppresses FoxO1 to control energy balance independently of leptin action. *Cell Metab*. 2012; 15:703–12.
58. Boucher J, Kahn CR. Differential role of insulin and IGF-1 receptors in brown and white adipose tissue and development of lipotrophic diabetes. *Diabetes*. 2013; 62: A37.
59. Romeo GR, Lee J, Shoelson SE. Metabolic syndrome, insulin resistance, and roles of inflammation--mechanisms and therapeutic targets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012; 32:1771–6.
60. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med*. 2005; 11:183–90.
61. Galbo T, Perry RJ, Jurczak MJ, Camporez JP, Alves TC, Kahn M et al. Saturated and unsaturated fat induce hepatic insulin resistance independently of TLR-4 signaling and ceramide synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 102(32): 11278-83.
62. Ichimura A, Hirasawa A, Poulain-Godefroy O, Bonnefond A, Hara T, Yengo L et al. Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature*. 2012; 483:350–4.

63. Guo S, Copps KD, Dong X, Park S, Cheng Z, Poci A et al. The Irs1 branch of the insulin signaling cascade plays a dominant role in hepatic nutrient homeostasis. *Mol Cell Biol.* 2009; 29:5070–83.
64. Dong XC, Copps KD, Guo S, Li Y, Kollipara R, DePinho RA et al. Inactivation of hepatic Foxo1 by insulin signaling is required for adaptive nutrient homeostasis and endocrine growth regulation. *Cell Metab.* 2008; 8:65–76.
65. Biddinger SB, Hernandez-Ono A, Rask-Madsen C, Haas JT, Aleman JO, Suzuki R et al. Hepatic insulin resistance is sufficient to produce dyslipidemia and susceptibility to atherosclerosis. *Cell Metab.* 2008; 7:125–34.
66. Qi Y, Xu Z, Zhu Q, Thomas C, Kumar R, Feng H et al. Myocardial Loss of IRS1 and IRS2 Causes Heart Failure and Is Controlled by p38alpha MAPK During Insulin Resistance. *Diabetes.* 2013; 62:3887–900.
67. Hannenhalli S, Putt ME, Gilmore JM, Wang J, Parmacek MS, Epstein JA et al. Transcriptional genomics associates FOX transcription factors with human heart failure. *Circulation.* 2006; 114:1269–76.
68. Duncan ER, Crossey PA, Walker S, Anilkumar N, Poston L, Douglas G et al. Effect of endothelium-specific insulin resistance on endothelial function in vivo. *Diabetes.* 2008; 57:3307–14.
69. Kubota T, Kubota N, Kumagai H, Yamaguchi S, Kozono H, Takahashi T et al. Impaired insulin signaling in endothelial cells reduces insulin-induced glucose uptake by skeletal muscle. *Cell Metab.* 2011; 13:294–307.
70. Messmer-Blust AF, Philbrick MJ, Guo S, Wu J, He P, Li J. RTEF-1 attenuates blood glucose levels by regulating insulin-like growth factor binding protein-1 in the endothelium. *Circ Res.* 2012; 111:991–1001.
71. Tsuchiya K, Tanaka J, Shuiqing Y, Welch CL, DePinho RA, Tabas I et al. FoxOs integrate pleiotropic actions of insulin in vascular endothelium to protect mice from atherosclerosis. *Cell Metab.* 2012; 15:372–81.

72. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28:412-9
73. Acosta AM, Escalona M, Maiz A, Pollak F, Leighton F. Determination of the insulin resistance index by the Homeostasis Model Assessment in a population of Metropolitan Region in Chile. *Rev Med Chile*. 2002; 130:1227-31
74. Peña BI. Identificación de variantes genéticas asociadas a la resistencia a la insulina a través de la secuenciación del exoma completo en niños Mayas [tesis doctoral]. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2018.
75. Tenorio AP. Prevalencia de resistencia a la insulina en pacientes con sobrepeso y obesidad [tesis de especialidad]. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2017.
76. Valdez RD. Frecuencia de resistencia a la insulina en una población mexicana, utilizando 3 métodos diferentes: Quantose IR, Índice HOMA e índice triglicéridos/colesterol HDL [tesis de especialidad]. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2017.
77. Saravia P. Prevalencia de resistencia a la insulina en pacientes con infertilidad que acuden a la clínica de andrología del Instituto Nacional de Perinatología del 2016 al 2018 [tesis de especialidad]. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2019.
78. Hernández MI. Prevalencia de resistencia a la insulina en adolescentes con obesidad [tesis de especialidad]. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2012.
79. Olvera BMA, Prevalencia de Resistencia a la Insulina en adolescentes de educación de nivel medio básico en una población mexicana. [Tesis de maestría] Nuevo León: Universidad Autónoma de Nuevo León; 2004.
80. Norma Oficial Mexicana NOM-008-SSA3-2017. Para el tratamiento integral del sobrepeso y la obesidad. *Diario Oficial de la Federación*, (mayo 18, 2018).

81. Pasca AJ, Montero JC. El Corazón del Obeso. 1era ed., Buenos Aires: Intermédica; 2015.
82. Moreno M. Definición y clasificación de la obesidad. Rev Med Clin Condes. 2012;23(2):124-8.
83. OMS. [Internet]. 10 datos sobre la obesidad, Organización Mundial de la Salud, citado 28 de mayo de 2021. Disponible en: <https://www.who.int/features/factfiles/obesity/facts/es/>
84. Secretaria de Salud. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición Medio Camino 2016. 2016: 67-80.
85. Secretaria de Salud. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018. 2018: 241-5.
86. Suárez W, Sánchez AJ, González JA. Fisiopatología de la obesidad: Perspectiva actual. Rev Chil Nutr. 2017;44(3):226-33.
87. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. J Clin Invest. 2007;117(1):175-84.
88. Almanza JC, Blancas G, García R, Alarcón FJ, Cruz M. Leptina y su relación con la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2. Gac Med Mex. 2008;144(6):535-42.
89. Martínez A, López GE, Padrón M, Lara AG, Santamaría C, Ynga MA et al. Evaluación, diagnóstico, tratamiento y oportunidades de prevención de la obesidad. Acta Pediátr Mex. 2014; 35:316-37.
90. Durruty AP, García AM. Glucotoxicidad y lipotoxicidad: Factores en la patogénesis y evolución de la diabetes tipo 2. Rev Med Chil. 2001;129(6):671-9.
91. Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA2-2012, Para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias. Diario Oficial de la Federación, (julio 13, 2013).
92. Rodríguez A, Ezquerro S, Méndez Giménez L, Becerril S, Frühbeck G. Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2015;309(8): E691-E714.

93. Munekata K, Sakamoto K. Forkhead transcription factor Foxo1 is essential for adipocyte differentiation. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2009;45(10):642-51.
94. Zou P, Liu L, Zheng L, Liu L, Stoneman RE, Cho A, et al. Targeting FoxO1 with AS1842856 suppresses adipogenesis. *Cell Cycle.* 2014;13(23):3759-67.
95. Collins F. [Internet]. Polimorfismos de nucleótido único. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Polimorfismos-de-nucleotido-%C3%BAnico>
96. Chial H. [Internet]. Polygenic inheritance and gene mapping. *Nature Education.* 2008; 1(1):17. Disponible en: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/polygenic-inheritance-and-gene-mapping-915/>.
97. Muller Y, Hanson R, Wiessner G, Nieboer L, Kobes S, Piaggi P, et al. Assessing *FOXO1A* as a Potential Susceptibility Locus for Type 2 Diabetes and Obesity in American Indians. *Obesity.* 2015; 23(10): 1960–5.
98. Müssig K, Staiger H, Machicao F, Stancakova A, Kuusisto J, Laakso M, et al. Association of common genetic variation in the FOXO1 gene with  $\beta$ -cell dysfunction, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(4):1353-60.
99. Sookoian S, Gianotti TF, Schuman M, Pirola CJ. Gene prioritization based on biological plausibility over genome wide association studies renders new loci associated with type 2 diabetes. *Genet Med.* 2009;11(5):338-43.
100. Ma J, Pei Y, Xue P, Wang Y, Bao X, Li Y. Association of the polymorphisms in *FOXO1* gene and diabetic nephropathy risk. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology.* 2019;47(1):1471-75.
101. Kedenko L, Lamina C, Kedenko I, Kollerits B, Kiesslich T, Iglseder B, et al. Genetic polymorphisms at SIRT1 and FOXO1 are associated with carotid atherosclerosis in the SAPHIR cohort. *BMC Med Genet.* 2014; 15:112-22.

102. Khoshi A, Bajestani MK, Shakeri H, Goodarzi G, Azizi F. Association of Omentin rs2274907 and FTO rs9939609 gene polymorphisms with insulin resistance in Iranian individuals with newly diagnosed type 2 diabetes. *Lipids Health Dis.* 2019;18(1):142-51.
103. Matia GI, Salgado GL, Ramos ALE. A possible association between the -2518 A>G MCP-1 polymorphism and insulin resistance in school children. *Arch Endocrinol Metab.* 2018;62(1):79-86.
104. Nsrallah AA, Abd-El Fatah AH, Ahmed HS. Genetic polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase is associated with insulin resistance in Egyptian women with polycystic ovary syndrome. *J Gene Med.* 2019;21(4):e3076.
105. Albegali AA, Shahzad M, Mahmood S, Ullah MI. Genetic association of insulin receptor substrate-1 (IRS-1, rs1801278) gene with insulin resistant of type 2 diabetes mellitus in a Pakistani population. *Mol Biol Rep.* 2019;46(6):6065-70.
106. BLAST Basic Local Alignment Search Tool [Internet]. USA. National Center for Biotechnology Information. Disponible en: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
107. Applied Biosystems. [Quick Reference Card]. Quality values. Applied Biosystems Sequencing Analysis Software. 2009; 6.
108. Prediction of functional effects of human nsSNPs [Sede Web]. PolyPhen-2. Disponible en <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
109. gnomAD Browser. [Internet]. gnomAD rs3751436 (GRCh37), citado el 07 de enero del 2021. Disponible en: [https://gnomad.broadinstitute.org/variant/rs3751436?dataset=gnomad\\_r2\\_1](https://gnomad.broadinstitute.org/variant/rs3751436?dataset=gnomad_r2_1)
110. Hernández Y JA, Tuero IA, 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.



## 17. Anexos

### Anexo 1



INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES PARA LOS  
TRABAJADORES DEL ESTADO  
CLÍNICA HOSPITAL "DR RAFAEL BARBA OCAMPO"  
Puesto de Sangrado y Servicio de Transfusión  
Laboratorio de Análisis Clínicos

### **CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA USO DE MUESTRA DE SANGRE EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

**Investigadores Responsables:** Dr. José Santos Ángeles Chimal, MC Verónica Andrade Almaraz y Dr. Rafael Hidalgo Moreno

**Institución donde se realizará el estudio:** Este protocolo de investigación, es responsabilidad de la Unidad de Diagnóstico y Medicina Molecular "Dr. Ruy Pérez Tamayo" /Hospital del Niño Morelense, de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos en colaboración con la Clínica Hospital "Dr. Rafael Barba Ocampo" del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los Trabajadores del Estado, de la Ciudad de Cuautla, Mor.

**Fecha:** Cuernavaca, Mor. a 15 de junio de 2008.

#### **¿Qué debo saber acerca de este documento?**

Este documento es parte de un proceso llamado **Consentimiento Informado**, en el cual se le preguntará si quiere donar su muestra de sangre para que pueda ser utilizada en investigaciones médicas, para que usted pueda decidirlo le daremos toda la información que usted requiere saber para que tome la decisión que usted considere mejor para sus intereses.

- Este documento explica la investigación que se realiza y cuál sería su participación.
- Por favor léala con cuidado y tome el tiempo que sea necesario para entenderla.
- Por favor, haga preguntas en cualquier momento sobre cualquier cosa que no entienda.
- **Usted es un voluntario.** Si decide aceptar donar una fracción de su sangre para investigación puede cambiar de parecer después. Puede decidir retirar su muestra cuando usted quiera. No habrá ningún problema si lo hace, no perderá beneficios, ni usted ni su familia, en caso de que decida no participar.
- Por favor pida al investigador responsable que le expliquen las palabras que usted no entienda.

#### **¿Por qué se le está pidiendo donar su muestra de sangre?**

- Usted ha acudido al puesto de sangrado y servicio de transfusión de la Clínica Hospital "Dr. Rafael Barba Ocampo" del ISSSTE, a fin de donar sangre, con el fin de saber si usted puede donar sangre se le ha tomado una muestra inicial

en dos tubos. Normalmente, una vez que se han hecho los estudios para saber si usted puede ser donador, los tubos son destruidos. En esta ocasión, le estamos preguntando si desea donar la sangre contenida en estos tubos para ser usados como fuente de información biológica utilizada en investigaciones biomédicas.

- Adicionalmente, del procesamiento de la sangre que donará, se obtiene un producto de desecho conocido como Buffy coat, el cual no tiene ninguna utilidad y se elimina por incineración, por lo que se le pide su autorización para que los investigadores principales o personal que ellos designen utilicen este material para preparación de alícuotas de suero, extracción y conservación de material genético para esta y futuras investigaciones.
- Su sangre es una fuente de información biológica de gran utilidad para comprender los procesos que ocurren en el cuerpo humano. Las investigaciones biomédicas que se realizarán usando su muestra de sangre tienen el potencial de aportar conocimientos que permitan ayudar a personas enfermas y/o a prevenir enfermedades.
- Usted deberá sentirse satisfecho, pues al mismo tiempo que está donando sangre para salvar al menos hasta cuatro vidas, también está colaborando a conocer muchos de los procesos que se llevan a cabo en el cuerpo de una persona sana.

#### ***¿Quiénes están participando en este banco de información?***

- *Se van incorporando nuevos donadores de manera continua y de forma aleatoria, es decir al azar.*

#### ***¿Debo hacer algo antes de saber si puedo participar? No***

#### ***¿Qué pasará si me uno a esta investigación?***

- Se tomará de una vena de su brazo una cantidad de sangre que equivale aproximadamente a 10 cucharadas de sangre, su sangre será almacenada en dos tubos y podrá ser utilizada por investigadores autorizados por la Unidad de Diagnóstico y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, para realizar investigaciones biomédicas de utilidad para la sociedad morelense. No se requerirá de ninguna otra participación posteriormente.

#### ***¿Cuáles son los riesgos y molestias de participar en el estudio?***

No existen riesgos previsible de donar su muestra de sangre. La toma de muestra de sangre a partir de su vena se hará en condiciones higiénicas. La toma de muestra puede ocasionar mareo, sudoración, desmayo, baja de presión, moretones. El donar su sangre para investigación biomédica no implica mayores riesgos que la razón inicial por la cual usted acudió a donar sangre.

#### ***¿Hay beneficios derivados de participar en el estudio?***

No hay ningún beneficio directo para usted de donar su muestra de sangre para investigación biomédica. Los resultados de las investigaciones que usen su muestra podrán ser de beneficio para la sociedad morelense en caso de resultar exitosas y es posible que usted o sus hijos puedan beneficiarse de ellas en un futuro. Sin embargo Ud., tiene el derecho de conocer los resultados parciales de los estudios de laboratorio que se realicen con su muestra, los cuales podrá solicitar después de 15 días de su donación de sangre.

### **¿A quién debo solicitar los resultados de los exámenes practicados a mi muestra?**

Usted podrá acudir en el tiempo antes mencionado, al puesto de sangrado y servicio de transfusión de la clínica Hospital “Dr. Rafael Barba Ocampo” del ISSSTE con el Dr. Rafael Hidalgo Moreno, responsable de este servicio, quien con gusto le entregará sus resultados y si es necesario le dará una interpretación de los mismos.

**¿Tendré gastos de participar en este estudio?** No, no tendrá ningún gasto.

### **¿Tendré remuneración económica por donar mi muestra de sangre?**

No, no hay ninguna remuneración económica por participar en este estudio. Su participación es enteramente altruista, en beneficio de las investigaciones científicas que se realizan en nuestro estado y en beneficio para la sociedad.

### **¿Puedo retirar mi muestra de sangre posteriormente?**

Si posteriormente usted decide que no quiere que su muestra continúe disponible para su uso en investigación biomédica, usted podrá indicarlo al investigador responsable, el cual inmediatamente procederá a retirarla y destruirla.

### **¿Cómo protegen mi privacidad?**

Los datos personales de las muestras no estarán disponibles para los investigadores que las usen, por lo que ningún investigador podrá saber a quién pertenecen, de esta manera protegemos su confidencialidad. El tiempo que pueda usarse su muestra biológica es indefinida. El investigador principal o personal designado me han dado la seguridad de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y que los datos relacionados con mi privacidad serán **manejados en forma confidencial.**

### **¿A quién me debo dirigir para hacer preguntas?**

Si usted tiene alguna pregunta en este momento o en cualquier momento, aún después de haber donado su muestra de sangre puede dirigirse al investigador responsable. Lo puede contactar en:

**Dr. José Santos Ángeles Chimal**  
Unidad de Diagnóstico y Medicina Molecular  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma del Estado de Morelos  
Tel: (01) 777 10 20 583 de 16 a 21:00 hrs  
Correo electrónico: [chimal@buzon.uaem.mx](mailto:chimal@buzon.uaem.mx)

**Dr. Rafael Hidalgo Moreno**

Puesto de Sangrado y Servicio de Transfusión  
Clínica Hospital “Dr. Rafel Barba Ocampo” de la Ciudad de Cuautla, Mor.  
Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los Trabajadores del Estado  
Tel: (01) 735 de 8:00 a 14:00 hrs  
Correo electrónico:

**MC. Verónica Andrade Almaraz**

Responsable del Laboratorio de Análisis Clínicos  
Clínica Hospital “Dr. Rafel Barba Ocampo” de la Ciudad de Cuautla, Mor.  
Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los Trabajadores del Estado  
Tel: (01) 735 de 8:00 a 16:00 hrs  
Correo electrónico:

**¿Qué significa su firma en la forma de consentimiento informado?**

- Su firma en este documento significa que:
  - Usted entiende la información descrita en el documento.
  - Acepta la responsabilidad y consecuencias indicadas en el documento.
  - Acepta participar en el estudio, libre de influencias
  - Participa en este estudio de manera voluntaria
  - Sus preguntas han sido contestadas a su entera satisfacción
  - No dejará de ejercer sus derechos al firmar el documento.

**Por lo cual, manifiesto que he leído y comprendido los términos del consentimiento informado y otorgo al investigador responsable o personal que el designe, mi autorización para que las muestras de sangre antes descritas, sean utilizadas en la investigación biomédica básica.**

**Cuernavaca, Morelos a del mes de del 2008**

<b>Nombre del Donador</b>	<b>Firma</b>
<b>Nombre del médico seleccionador:</b> <b>Dr. Rafel Hidalgo Moreno</b>	<b>Firma</b>

**Testigos**

<b>Nombre:</b> <b>MC. Verónica Andrade Almaraz</b>	<b>Firma</b>
-------------------------------------------------------	--------------

<b>Domicilio</b> Intrépidos de Asturias y Loberas #7, Col. Centro, Cautla, Mor.	<b>Teléfono</b> 7772185697
<b>Nombre:</b> <b>Maritza Barranco Barreto</b>	<b>Firma</b>
<b>Domicilio</b> M. Matamoros #4, Col. Centro, Tlacotepec, Mor.	<b>Teléfono</b> 01 7311704056

Anexo 2

**“RELACIÓN DEL PORCENTAJE DE GRASA CORPORAL CON LA CONCENTRACIÓN  
SÉRICA DE TSH Y VITAMINA D EN ADULTOS NO DIABÉTICOS”**

**Autorizó**

*Dra. Ma. Rita Rivas González  
Jefe del Cets (SSM)*

---

**CARTA DE CONSENTIMIENTO  
INFORMADO**

---

**Elaboró**

*Dra. Francisca del Carmen Mendoza Hernández*

*Posgrado: Maestría en Medicina Molecular*

*Facultad de Medicina (UAEM)*

---

**Revisó**

*Dr. José Angeles Chimal*

*PITC Facultad de Medicina (UAEM)*

*Dr. Armando Herrera Arellano*

*PITC Facultad de Medicina (UAEM)*

---

Por medio de la presente, yo \_\_\_\_\_ con número de código \_\_\_\_\_ acepto participar en el proyecto de investigación: **“RELACIÓN DEL PORCENTAJE DE GRASA CORPORAL CON LA CONCENTRACIÓN SÉRICA DE TSH Y VITAMINA D EN ADULTOS NO DIABÉTICOS”**, estudio observacional, registrado ante el Comité Local de Ética en Investigación de la Universidad Autónomas del Estado de Morelos, con el número **CEI – 0001-2014**. El objetivo de este estudio es evaluar si existe relación entre los niveles séricos de Hormona Estimulante de la Tiroides y vitamina D con la grasa corporal y resistencia a insulina. Estoy enterado(a) de que la obesidad y resistencia a la insulina están asociadas a otras anormalidades por lo que es importante conocerlas. Se me ha explicado que mi participación en la investigación consiste en autorizar:

- a) Que se me realice una somatometría completa: peso, talla, diámetro de cadera, diámetro de cintura, diámetro de brazo, de muñeca y de cuello. Además, que se obtenga mi composición corporal por bioimpedancia.
- b) Que a la muestra que se me tomó como parte del proceso de la donación de sangre, le sean cuantificadas: glucosa sérica en ayuno, hemoglobina glucosilada, colesterol total, perfil de lípidos completo, hormona estimulante de la tiroides y hormona tiroidea, anticuerpos anti-Peroxidasa Tiroidea, adiponectina y leptina.
- c) Además, contestaré preguntas adicionales a la historia clínica que me hizo el médico seleccionador.
- d) Que se conserven muestras de sangre o sus fracciones para futuros estudios, bioquímicos o genéticos, cuyos hallazgos me serán notificados en su oportunidad.

Declaro que se me ha informado ampliamente que los riesgos e inconvenientes adicionales que representa el estudio son aquellos asociados a la toma inicial de las muestras sanguíneas como parte del proceso de donación de sangre, pero no relacionadas con este protocolo, es decir, no se realiza ninguna otra punción venosa para este estudio.

Los investigadores me mantendrán informado acerca de los resultados. Los cuales de ser posible me serán entregados al momento de que acuda al Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea por mis estudios serológicos post donación, en la fecha que sea señalada por el personal del CETS.

Manifiesto que mi participación es voluntaria, sin remuneración económica y entiendo que conservo el derecho de negarme a participar en el estudio o retirarme del mismo, sin que ello afecte el proceso de donación sanguínea al que soy sujeto.

El investigador me ha asegurado que mis datos serán manejados en forma confidencial en las presentaciones o publicaciones de este estudio y que en todo momento se respetará mi privacidad, y me ha proporcionado su número telefónico para cualquier duda (Médico Francisca del Carmen Mendoza Hernández): (777) 3 11 22 10 Ext 1112, o bien al teléfono (777) 3 11 22 06 con el Dr. José Ángeles Chimal o Dra. Ma. Rita Rivas González, Coordinador de la Jornada Especial y Jefe del Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea, respectivamente.

---

Nombre y firma del candidato o donador de  
sangre

---

Dra. Francisca del Carmen Mendoza Hernández  
Investigador

---

Nombre y firma del testigo

---

Nombre y firma del testigo

---

Dr. José Ángeles Chimal  
Investigador principal

---

Dr. Armando Herrera Arellano  
Co Investigador

### **Recomendaciones para guiar a los médicos en la investigación biomédica en personas**

No es necesario transcribir las recomendaciones. En cambio, anotar la forma en que diferentes acciones que sí se hayan realizado cumplieron alguna recomendación específica.

Adoptada por la 18 Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, junio de 1964 y enmendada por la 29 Asamblea Médica Mundial, Tokio, Japón, octubre de 1975, la 35 Asamblea Médica Mundial, Venecia, Italia, octubre de 1983 y la 41 Asamblea Médica Mundial, Hong Kong, septiembre de 1989.

#### **I. Principios básicos**

1. La investigación biomédica que implica a personas debe concordar con los principios científicos aceptados universalmente y debe basarse en una experimentación animal y de laboratorio suficiente y en un conocimiento minucioso de la literatura científica.
2. El diseño y la realización de cualquier procedimiento experimental que implique a personas debe formularse claramente en un protocolo experimental que debe presentarse a la consideración, comentario y guía de un comité nombrado especialmente, independientemente del investigador y del promotor, siempre que este comité independiente actúe conforme a las leyes y ordenamientos del país en el que se realice el estudio experimental.
3. La investigación biomédica que implica a seres humanos debe ser realizada únicamente por personas científicamente calificadas y bajo la supervisión de un facultativo clínicamente competente. La responsabilidad con respecto a las personas debe recaer siempre en el facultativo médicamente calificado y nunca en las personas que participan en la investigación, por mucho que éstas hayan otorgado su consentimiento.



4. La investigación biomédica que implica a personas no puede llevarse a cabo lícitamente a menos que la importancia del objetivo guarde proporción con el riesgo inherente para las personas.
5. Todo proyecto de investigación biomédica que implique a personas debe basarse en una evaluación minuciosa de los riesgos y beneficios previsibles tanto para las personas como para terceros. La salvaguardia de los intereses de las personas deberá prevalecer siempre sobre los intereses de la ciencia y la sociedad.
6. Debe respetarse siempre el derecho de las personas a salvaguardar su integridad. Deben adoptarse todas las precauciones necesarias para respetar la intimidad de las personas y reducir al mínimo el impacto del estudio sobre su integridad física y mental y su personalidad.
7. Los médicos deben abstenerse de comprometerse en la realización de proyectos de investigación que impliquen a personas a menos que crean fehacientemente que los riesgos involucrados son previsibles. Los médicos deben suspender toda investigación en la que se compruebe que los riesgos superan a los posibles beneficios.
8. En la publicación de los resultados de su investigación, el médico está obligado a preservar la exactitud de los resultados obtenidos. Los informes sobre experimentos que no estén en consonancia con los principios expuestos en esta Declaración no deben ser aceptados para su publicación.
9. En toda investigación en personas, cada posible participante debe ser informado suficientemente de los objetivos, métodos, beneficios y posibles riesgos previstos y las molestias que el estudio podría acarrear. Las personas deben ser informadas de que son libres de no participar en el estudio y de revocar en todo momento su consentimiento a la participación. Seguidamente, el médico debe obtener el consentimiento informado otorgado libremente por las personas, preferiblemente por escrito.
10. En el momento de obtener el consentimiento informado para participar en el proyecto de investigación, el médico debe obrar con especial cautela si las personas mantienen con él una relación de dependencia o si existe la posibilidad de que consientan bajo coacción. En este caso, el consentimiento informado debe ser obtenido por un médico no comprometido en la investigación y completamente independiente con respecto a esta relación oficial.
11. En el caso de incompetencia legal, el consentimiento informado debe ser otorgado por el tutor legal en conformidad con la legislación nacional. Si una incapacidad física o mental imposibilita obtener el consentimiento informado, o si la persona es menor de edad, en conformidad con la legislación nacional la autorización del pariente responsable sustituye a la de la persona. Siempre y cuando el niño menor de edad pueda de hecho otorgar un consentimiento, debe obtenerse el consentimiento del menor además del consentimiento de su tutor legal.
12. El protocolo experimental debe incluir siempre una declaración de las consideraciones éticas implicadas y debe indicar que se cumplen los principios enunciados en la presente Declaración.

## **II. Investigación médica combinada con asistencia profesional (Investigación clínica)**

1. En el tratamiento de una persona enferma, el médico debe tener la libertad de utilizar un nuevo procedimiento diagnóstico o terapéutico, si a juicio de este ofrece una esperanza de salvar la vida, restablecer la salud o aliviar el sufrimiento.
2. Los posibles beneficios, riesgos y molestias de un nuevo procedimiento deben sopesarse frente a las ventajas de los mejores procedimientos diagnósticos y terapéuticos disponibles.
3. En cualquier estudio clínico, todo paciente, inclusive los de un eventual grupo de control, debe tener la seguridad de que se le aplica el mejor procedimiento diagnóstico y terapéutico confirmado.
4. La negativa del paciente a participar en un estudio jamás debe perturbar la relación con su médico.
5. Si el médico considera esencial no obtener el consentimiento informado, las razones concretas de esta decisión deben consignarse en el protocolo experimental para conocimiento del comité independiente (v. Principios básicos, punto 2).
6. El médico podrá combinar investigación médica con asistencia profesional, con la finalidad de adquirir nuevos conocimientos médicos, únicamente en la medida en que la investigación médica esté justificada por su posible utilidad diagnóstica o terapéutica para el paciente.

## **III. Investigación biomédica no terapéutica que implique a personas (Investigación biomédica no clínica)**

1. En la aplicación puramente científica de la investigación médica realizada en personas, es deber del médico seguir siendo el protector de la vida y la salud de la persona participante en la investigación biomédica.
2. Las personas participantes deben ser voluntarios, o bien personas sanas o pacientes cuya enfermedad no esté relacionada con el protocolo experimental.
3. El investigador o el equipo investigador debe suspender la investigación si estimasen que su continuación podría ser dañina para las personas.
4. En investigaciones en el hombre, el interés de la ciencia y la sociedad jamás debe prevalecer sobre consideraciones relacionadas con el bienestar de las personas.

Cuernavaca, Mor., 09 de junio de 2021.

**Dra. Vera Lucia Petricevich**

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis **Medicina Molecular Gueorgui López Márquez matrícula 10024626, con el nombre de tesis: "Polimorfismos de un solo nucleótido en el sitio de unión al ADN del gen que codifica para el factor de transcripción FOXO1 en individuos mexicanos con resistencia a la insulina"**, que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Gueorgui López Márquez. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

**I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

**Atentamente**

**Dr. Armando Herrera Arellano**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**ARMANDO HERRERA ARELLANO** | Fecha:2021-06-17 19:18:37 | Firmante

sj1QZSWWhOYs2jdLmSyUg0r04cBH9/0fmYwxc/02i1PvDFjXD1XXSntFBsatn2/03iXYEE8vYWpIhSwth4E9VvB8jCc/yBBh4Ed3Fm/KgJXfwLwyr1Nleg+iDny8nMQS87puH+evhdey  
mhQe8lfoJlwl0ms16u+9Wpgr1p9KMAP20OoAqWqEH3jiSaABpel+3FO1jOWWjNWjXr7LcK+D8NijZuxNO8HCDbvBBnZklldaZBiCpck9TBxzxuZUoSnfG51eBZPZniuOA1TNu2  
+XXBNBFhS6n0Fi7ddUYMYOHUO2Y2PZBNfogZ8Zd3IRne2uhWhNGxox3iY7Y+d+5PMA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



**JxG3NA**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/WPJSFYMCwRQBM1i09Hhz3kem0sVBhcW9>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 09 de junio de 2021.

**Dra. Vera Lucia Petricevich**

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis **Medicina Molecular Gueorgui López Márquez matrícula 10024626, con el nombre de tesis: "Polimorfismos de un solo nucleótido en el sitio de unión al ADN del gen que codifica para el factor de transcripción FOXO1 en individuos mexicanos con resistencia a la insulina"**, que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Gueorgui López Márquez. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

**I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

**Atentamente**

**Dr. Ernesto Rodríguez Ayala**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**ERNESTO RODRÍGUEZ AYALA | Fecha:2021-06-16 10:47:12 | Firmante**

Q4lhVuBf++tBjs1CEGIzG55xXlqKYd4nO0X4qpLC824w1O6QhtlZ/K7WSUd1a433ioEyD7tD4WEfAERutu9uYs1P1FGUimGcW0JqXct964VdM234ix/OEoWpof4sKPT4zKNnSSwv7hRmcb9FzXMmMzpCGdMvloaZffGwVgN2oBX7YCsmMWrUMEd1nlsGPAisHRZWX7ph9XJ3L0ciV305NuIWBvD7+gxdjVimh0SSER/o//fNlc2Eo6uv+5Y000o1ps+wjp6HY+AZd yi5+RJgqRen1hqD0aZKVSCi06NSpUjdTolV46eJU9VP95ffa4B+dMaGpwPngpg/FyEueK2Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[Xu1WLC](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/LmvDwVtvQ5R50drSNQGHl3l6SmZHmZGE>



Cuernavaca, Mor., 09 de junio de 2021.

**Dra. Vera Lucia Petricevich**

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis **Medicina Molecular Gueorgui López Márquez matrícula 10024626, con el nombre de tesis: "Polimorfismos de un solo nucleótido en el sitio de unión al ADN del gen que codifica para el factor de transcripción FOXO1 en individuos mexicanos con resistencia a la insulina"**, que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Gueorgui López Márquez. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

**I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

**Atentamente**

**Dra. Alma Ethelia López Caudana**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**ALMA ETHELIA LÓPEZ CAUDANA | Fecha:2021-06-23 09:54:49 | Firmante**

o+k+8r82z4ygFun/z/OK9u1f+Sdml+5HLMkliZ2m5xSKfsSdT7ftb1/rqojvrsCK9qkW9XUEi1TwQ8wHKmuWQvr7168T95mmLQ/l/xc/AoPVVckl7xo56sRi1D0W50dkZb6NPtYSC6Do  
a/v1QGv5IVVtjVArCsvjV2MqjGwUzfS+NlppZI51D9UF30I7EKHKJF1O+qMRlxooefJMh/xZ2D9vtg+xiLLmCz8PwLI3R5XYhd8aqdrWIL+fm2GlpmyijinkwFZ0n8uOpQohKmxjFz  
9lVWqehmXRQt2ov2N3dN1QMOSLShRwJ9x8hwJrts5xsJgHHEmaMIZoB8719dNQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



**nV01BK**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/tRU9jSGkSmXu2cBIQ44xHd7tbu0qXYPI>





Cuernavaca, Mor., 09 de junio de 2021.

**Dra. Vera Lucia Petricevich**

Directora

Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis **Medicina Molecular Gueorgui López Márquez matrícula 10024626, con el nombre de tesis: "Polimorfismos de un solo nucleótido en el sitio de unión al ADN del gen que codifica para el factor de transcripción FOXO1 en individuos mexicanos con resistencia a la insulina"**, que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Gueorgui López Márquez. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

**I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

**Atentamente**

**Dr. Juan José Acevedo Fernández**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**JUAN JOSE ACEVEDO FERNANDEZ** | Fecha:2021-06-08 16:02:05 | Firmante

hC7Z6oSaliNUvO9T15VcR41UIJlzSesldMR7QpkIYDp2eHpWz+Ad24YHjBw+t0/m0/+wpgkO+Gx0IYSFIEEBV1dvH26MCxIWRy6sx4fahklvWd4Rawft9EbAhwCjJN+11Prn/+Wvuxg1XanC61zDpBLCiCzx3UUTZZh23xnO09wnK147RifVozPjOOn8JL9RxFyUUd7AZSG4mCjmqvmfK4RZnelCJ6YlzCE6cnQPai/A28a4aw8TD2AUF7Y08ziAfNsm8fKTIaKHgk+3DF6F0hSuBqceFelzj9/EwllqF7IMQWoQapjvKq3iL2AdqgLdt5uEcoEclDs659pK7nCV5w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



cIP9RA

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/mKT8NBU8bg0O5ujRr2tFSgZoqVJhS21U>

