



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE MEDICINA

SECRETARIA DE DOCENCIA

JEFATURA DE POSGRADO

**“PORCENTAJE DE GRASA CORPORAL Y SU RELACIÓN CON PREDIABETES:
PARTICIPACIÓN DE *SLC16A11*”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN MEDICINA MOLECULAR

QUE PRESENTA

BIOL. DANIELA MONTER ARTEAGA

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. JOSÉ SANTOS ÁNGELES CHIMAL

Cuernavaca, Morelos, México a Abril del 2018

Lugar y fecha de la realización de la tesis:

Cuernavaca, Morelos

Laboratorio de Medicina Transfusional y Experimental

Facultad de Medicina, UAEM

Miembros del comité tutorial:

M. en C. José S. Ángeles Chimal

Dr. Armando Herrera Arellano

Dr. Heriberto Manuel Rivera

Dr. Jesús Santa Olalla Tapia

M. en C. Verónica Andrade Almaráz

Miembros del jurado de examen:

M. en C. José S. Ángeles Chimal

Dr. Armando Herrera Arellano

M. en C. Verónica Andrade Almaráz

Dr. Juan José Acevedo Fernández

Dra. Luz María González Robledo

Este trabajo se desarrolló en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, en colaboración con el Banco de Sangre del Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea, dependiente de los Servicios de Salud de Morelos y del Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Tipo B “Centenario de la Revolución Mexicana” del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), en Morelos. Contó con financiamiento parcial PROMEP del programa de consolidación (Folio No. 37) de la planta académica de la UAEM, del proyecto No. 212981 del CONACYT y del Grupo GEMM (Genética de las Enfermedades Metabólicas en Población Mexicana), Morelos.

AGRADECIMIENTOS

A todas aquellas personas que compartieron sus conocimientos conmigo para conclusión de esta tesis. Especialmente agradezco a mi Director de tesis el M. en C. José Santos Ángeles Chimal por la confianza y haberme permitido la incorporación a su grupo de trabajo dentro del Laboratorio de Medicina Transfusional Experimental.

Al Dr. Armando Herrera Arellano por todas sus recomendaciones, tiempo, ayuda e interés para poder concluir este trabajo, no solo desde el punto de vista académico sino también desde un aspecto personal. Gracias por todos los consejos y apoyo que lo agradezco de corazón.

Los demás integrantes de mi comité evaluador a la M. en C. Verónica Andrade Almaraz, le agradezco por su paciencia, recomendaciones y ayuda desde el inicio de esta investigación, todo lo que aprendí en el Hospital Tipo B “Centenario de la Revolución Mexicana” (ISSSTE) hasta el último tutorial. Al Dr. Juan José Acevedo Fernández y a la Dra. Luz María González Robledo por sus comentarios para la culminación de este proceso.

A mis compañeros de Laboratorio a Belen Lara, Carmen Garduño, Abner Monroy, Adarely Fernández por sus consejos, ayuda y compañía.

A mi familia por la motivación y apoyo para estudiar la maestría, inyectarme ese ánimo cuando las cosas no iban como esperaba y dar lo mejor de mí para este proyecto. Enseñarme a disfrutar los pocos momentos que tenía libres para convivir con ustedes.

ÍNDICE

	pag.
RESUMEN	9
I. INTRODUCCIÓN.....	10
I.1. Diabetes.....	10
I.2. Prediabetes.....	10
I. 3. Diagnóstico de prediabetes.....	10
I. 4. Sobrepeso-obesidad y diabetes mellitus.....	13
I. 5. Prevalencia de diabetes y prediabetes.....	15
I. 6. Genes asociados a diabetes y prediabetes.....	17
I. 7. Gen SLC16A11.....	19
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
III. OBJETIVOS.....	22
III.1. GENERAL.....	22
III.2. PARTICULAPES.....	22
IV. HIPÓTESIS.....	23
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
V. 1. Estudio.....	24
V. 1. 2. Población de estudio.....	24
V. 2. Criterios de selección.....	24
V. 2. 1. Criterios de inclusión.....	24
V. 2. 2. Criterios de no inclusión.....	24
V. 3. Variables.....	24
V. 4. Descripción de métodos diagnóstico.....	25
V. 4. 1. Toma y procesamiento de muestra.....	25
V. 4. 1. 2. Conservación de muestras biológicas.....	25
V. 4. 2. Somatometría.....	25
V. 4. 3. Tensión arterial.....	26
V. 4. 4. Glucosa.....	26
V. 4. 5. Colesterol, triglicéridos e insulina.....	26
V. 4. 6. Determinación de HbA1c.....	26
V. 5. Procedimientos de biología molecular.....	27

V. 5. 1. Diseño de oligonucleótidos.....	27
V. 5. 2. Síntesis de oligonucleótidos.....	27
V. 5. 3. Estandarización de las condiciones de PCR (reacción en cadena de la polimerasa).....	27
V. 5. 4. Purificación de ADN.....	28
V. 5. 5. Gel de agarosa.....	28
V. 5. 6. Electroforesis en gel de agarosa.....	28
V. 5. 7. PCR para cada par de oligonucleótidos.....	28
V. 5. 8. Digestión enzimática.....	28
V. 6. Análisis estadístico.....	29
VI. RESULTADOS.....	30
VI. 1. Descripción de la población en estudios.....	30
VI. 1. 1. Bioquímicos, antropométricos y sociodemográficos.....	30
VI. 2. Obesidad a partir del porcentaje de grasa corporal.....	32
VI. 3. Identificación de polimorfismos.....	33
VI. 4. Frecuencias de polimorfismos.....	34
VII. DISCUSIÓN.....	38
VIII. CONCLUSIONES.....	41
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
X. ANEXOS.....	47
X. 1. Carta de consentimiento informado.....	47
X. 2. Registro de datos clínicos, bioquímicos y de somatometría.....	50
XI. 3. DESCRIPCIÓN DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.....	53
X. 3. 1. Toma de muestra.....	53
X. 3. 2. Somatometría.....	53
X. 3. 3. Presión arterial.....	56
X. 3. 4. Glucosa.....	58
X. 3. 5. Colesterol, triglicéridos e insulina.....	58
X. 3. 6. Determinación de HbA1c.....	58
X. 4. METODOLOGÍA COMPLEMENTARIA.....	59
X. 4. 1. Diseño de nucleótidos.....	59
X. 4. 2. ANÁLISIS DE OLIGONUCLEÓTIDOS.....	60

X. 4. 3. Síntesis de oligonucleótidos.....	61
X. 4. 4. Protocolo para curva de temperatura-cloruro de magnesio.....	62
X. 4. 5. Purificación de ADN.....	62
X. 4. 6. Gel de agarosa.....	64
X. 4. 7. Electroforesis en gel de agarosa.....	64
X. 4. 8. PCR PARA CADA PAR DE OLIGONUCLEÓTIDOS.....	65
X. 4. 8. 1. SNP´s rs117767867 y rs13342692.....	65
XI. 4. 8. 2. SNP rs75418188.....	65
XI. 4. 9. Digestión enzimática.....	65
XI. 4. 9. 1. Digestión enzimática con Hin1I.....	65
XI. 4. 9. 2. Digestión enzimática con Bsp143I.....	66
XI. 4. 9. 3. Digestión enzimática con KfII.....	66

ÍNDICE DE TABLAS

	pag.
Tabla 1. Evolución de los criterios diagnósticos para la diabetes tipo 2 y para los estados glucémicos anormales.....	11
Tabla 2. Ventajas y desventajas de las pruebas de diagnóstico para la prediabetes.....	11
Tabla 3. Criterios para el diagnóstico de prediabetes. IFG: alteración de glucosa en ayunas, IGT: intolerancia a la glucosa y HbA1c: hemoglobina.....	12
Tabla 4. Clasificación según la OMS del estado nutricional de acuerdo al IMC.....	13
Tabla 5. Porcentaje de grasa corporal en hombres y mujeres.....	14
Tabla 6. Prevalencia de prediabéticos por grupos de edad.....	15
Tabla 7. Diagnóstico de trastorno metabólico de glucosa en mujeres y hombres de 30 a 50 años de edad.....	16
Tabla 8 Concentraciones de MgCl ₂ para PCR.....	27
Tabla 9. Comparación de las variables antropométricas entre no prediabéticos y prediabéticos (glucosa en ayuno 100 a 125 mg/dL). Los valores corresponden a medias (m) y desviación estándar (DE).....	30
Tabla 10. Variables bioquímica entre no prediabéticos y prediabéticos (glucosa en ayuno 100 a 125 mg/dL). Los valores corresponden a medias (m) y desviación estándar (DE).....	31
Tabla 11. Comparación de los signos vitales entre no prediabéticos y prediabéticos (glucosa en ayuno 100 a 125 mg/dL). Los valores corresponden a medias (m) y desviación estándar (DE).....	31
Tabla 12. Comparación de las variables demográficas entre no prediabéticos y prediabéticos (glucosa en ayuno 100 a 125 mg/dL). Los valores corresponden a frecuencias absolutas (f) y frecuencias relativas (%)......	31
Tabla 13. Comparación de obesidad, según % de grasa corporal, no prediabéticos y prediabéticos divididos por sexo.	32
Tabla 14. Asociación de prediabetes, por glucosa \geq 100 mg/dL, y diferentes polimorfismos del gen SLC16A11. Los valores corresponden a frecuencias absolutas y relativas (%)......	35
Tabla 15. Asociación de prediabetes, por HbA1c $>$ 5.5%, y diferentes SNP's del gen SLC16A11. Los valores corresponden a frecuencias absolutas y relativas (%)......	35
Tabla 16. Asociación de obesidad en hombres, grasa corporal \geq 20%, y diferentes SNP's del gen SLC16A11. Los valores corresponden a frecuencias absolutas y relativas (%)......	36

Tabla 17. Asociación de obesidad en mujeres, grasa corporal $\geq 30\%$, y diferentes SNP's del gen SLC16A11. Los valores corresponden a frecuencias absolutas y relativas (%).....	36
Tabla 18. Asociación de obesidad, por IMC (IMC>30), y diferentes SNP's del gen SLC16A11. Los valores corresponden a frecuencias absolutas y relativas (%).....	37

INDICE DE FIGURAS

	pag.
Figura 1. Gel de agarosa al 2%; a) producto de PCR de 500 pb utilizando los oligonucleótidos LMTE_HumMCT11_1 y LMTE_HumMCT11_2, b) digestión enzimática con Hin1I, los números que se encuentran dentro de un cuadro rojo son las muestras que presentan el polimorfismo V113I (270, 271, 273, 288); c) digestión enzimática con Bsp143I los números que se encuentran dentro de un cuadro rojo son las muestras que presentan el polimorfismo D127G (muestras 270, 271, 273, 288).....	33
Figura 2. Gel de agarosa al 2%; a) producto de PCR de 450 pb utilizando los oligonucleótidos LMTE_HumMCT11_5 y LMTE_HumMCT11_6, b) digestión enzimática con KfII, los números que se encuentran dentro de un cuadro rojo son las muestras que presentan el polimorfismo G340S (270, 271, 273, 288).....	34

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La diabetes mellitus es una alteración del metabolismo de la glucosa debida a un déficit de producción de insulina o a una reducción de su efecto biológico en el organismo. Se diagnostica clínicamente tras la detección de cifras elevadas de glucemia en determinadas circunstancias (CIE10). En la historia natural de esta enfermedad, se ha señalado el estado metabólico que no corresponde al diabético pero que tampoco se caracteriza como normal, es un estado intermedio que se le ha nombrado como prediabetes. El consorcio SIGMA de diabetes tipo 2, con el objetivo de caracterizar las variantes de la secuencia del gen SLC16A11 como un factor de riesgo para diabetes. La frecuencia del gen se presentó en 30% de toda la población y en 48% de los nativoamericanos, se mostró una asociación del gen SLC16A11 con DM2 (OR 1.29; IC 95% 1.20-1.38; $p < 0.001$); encontrando que las personas portadoras de este gen tienen aproximadamente un 25% más probabilidad de padecer diabetes y hasta 50% en aquellas que lo han heredado de ambos padres.

OBJETIVO: Cuantificar la frecuencia de tres polimorfismos del gen SLC16A11 rs117767867 (V113I), rs13342692 (D127G) y rs75418188 (G340S) e identificar la asociación que existe entre los polimorfismos del gen SLC16A11 en pacientes con prediabetes y con obesidad.

RESULTADOS: La frecuencia de los polimorfismos rs117767867 (V113I) y rs13342692 (D127G) fue de 16.24%. Con el polimorfismo rs75418188 (G340S) presentan una frecuencia del 31.4%. A pesar de que V113I y D127G aparecen como factor de riesgo, no alcanzan diferencia estadística. Al momento de comparar la obesidad en hombres y mujeres por porcentaje de grasa corporal los SNP's, no mostraron asociación.

CONCLUSIONES: La prevalencia de prediabetes fue del 26.6%, en el caso de los hombres el 27.3% y en mujeres de 25.8% por glucosa alterada en ayunas 100-125mg/dl. Con el método de HbA1c tuvimos una prevalencia de prediabetes del 37.8% (HbA1c 5.5% - 6.4%) en hombres el 39.1% y en mujeres 36.2%. La prevalencia de diabetes no diagnosticada fue del 41.5% (HbA1c $\geq 6.5\%$) (41.3% en hombres y 42.2% en mujeres). La frecuencia en prediabéticos del polimorfismo rs117767867 (V113I) y rs13342692 (D127G) fue del 17.39%, rs7541818 (G340S) con frecuencia del 20%. Para el caso de las mujeres, la presencia de los polimorfismos V113I (rs117767867) y D127G (rs13342692) se identificó como factor de riesgo para obesidad diagnosticada por grasa corporal $\geq 30\%$ (RM 7.46). Es decir, las mujeres con estos SNP's tienen 7.46 veces más riesgo de padecer obesidad diagnosticada por grasa corporal $\geq 30\%$. G340S (rs7541818) no presentó asociación con obesidad diagnosticada por grasa corporal $\geq 30\%$ (RM 6.41 IC_{95%} 0.61-314.92, $p=0.07$).

I. INTRODUCCIÓN

I. 1. Diabetes

La diabetes mellitus es una alteración del metabolismo de la glucosa debida a un déficit de producción de insulina o a una reducción de su efecto biológico en el organismo. Se diagnostica clínicamente tras la detección de cifras elevadas de glucemia en determinadas circunstancias (CIE10). Existen diferentes tipos de diabetes; como son la diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 y la diabetes gestacional ¹.

Los diabéticos tipo 1; se caracterizan por un fallo en la producción de insulina por el páncreas; desarrollan la enfermedad, en general, antes de llegar a la pubertad, siendo frecuente la cetosis. La diabetes mellitus es un factor importante de complicación en el embarazo. Esta alteración del metabolismo de los carbohidratos se inicia o se reconoce por primera vez durante el embarazo, aunque no se puede negar la posibilidad de que la alteración haya estado presente antes de la gestación o de persistir después del embarazo¹. Afecta al menos a 1 de cada 25 embarazos en el mundo. Si la diabetes gestacional no es diagnosticada y no se trata adecuadamente puede provocar que el bebé sea mayor de lo normal y que aumente el índice de muertes de madres y niños. Las mujeres y los bebés nacidos corren un mayor riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 con el paso de tiempo ².

En el tipo de diabetes tipo 2 existe producción de insulina, pero esta es insuficiente o el organismo es incapaz de utilizarla adecuadamente. Aparece generalmente en adultos de mediana edad o más tarde. También puede aparecer en individuos jóvenes, sobre todo asociadas a la obesidad. Habitualmente no precisa tratamiento con insulina, controlándose con dieta, antidiabéticos orales y ejercicio. Solo si estas medidas no son suficientes requerirá tratamiento con insulina (CIE-10).

La prevalencia de diabetes tipo 2 a nivel mundial ha ido en aumento, particularmente en Latinoamérica debido a las características genéticas, sedentarismo y hábitos alimenticios que, en conjunto con el síndrome metabólico, han favorecido este aumento en la prevalencia.

I. 2. Prediabetes

En la historia natural de esta enfermedad, se ha señalado el estado metabólico que no corresponde al diabético pero que tampoco se caracteriza como normal, es un estado intermedio que se le ha nombrado como prediabetes. Algunos estudios que se han realizado con este tipo de pacientes y que son identificados e intervenidos, muestran que es posible evitar que hasta el 58% progresen a diabetes tipo 2 ³.

I. 3. Diagnóstico de prediabetes

Los métodos para la detección de prediabetes se basan en muestras de sangre venosa y los exámenes que se pueden realizar son la glucosa en ayunas, glucosa plasmática a las 2 hrs pos-carga y la

hemoglobina glucosilada (HbA1c) con los valores: glucosa en ayunas de 100 a 125 mg/dl, glucosa post-carga de 140 a 199 mg/dl y HbA1c de 5.5% a 6.4% ⁴. La posibilidad de diagnosticar prediabetes basado en los criterios antes mencionados, permite detectar a pacientes con problemas iniciales; sin embargo, como lo sugiere la OMS, debe realizarse una glucemia postcarga oral a las personas que presenten valores de glucosa en ayunas anormal, para descartar la presencia de diabetes mellitus. Estas estrategias son importantes en la prevención y detección temprana de esta enfermedad⁵. Los puntos de corte para las pruebas diagnósticas con el paso del tiempo han sido modificados, como se puede observar en la tabla 1.

Tabla 1. Evolución de los criterios diagnósticos para la diabetes tipo 2 y para los estados glucémicos anormales ⁵,

Criterio	1979 y 1980	1997-1999	2003
Glucosa plasmática en ayuno			
Diabetes	≥ 140 mg/dl	≥126 mg/dl	≥126 mg/dl
Glucosa anormal en ayuno	No considerado	110-125 mg/dl	100-125 mg/dl
Glucosa plasmática postcarga			
Diabetes	≥200 mg/dl	≥200 mg/dl	≥200 mg/dl
Intolerancia a la glucosa	140-199 mg/dl	140-199 mg/dl	140-199 mg/dl

Estas pruebas diagnósticas presentan cada una sus ventajas y desventajas como se muestra en la tabla 2 ⁴.

Tabla 2. Ventajas y desventajas de las pruebas de diagnóstico para la prediabetes ⁴.

Parámetro	Ventajas	Desventajas
Glucosa en ayunas	Estándar establecido Rápido y fácil Muestra individual Predice complicaciones microvasculares	Muestra no estable Alta variabilidad en el día a día En ayunas Refleja la homeostasis de la glucosa
Glucosa plasmática a las 2 hrs	Estándar establecido Predice complicaciones microvasculares	Muestra no estable Alta variabilidad en el día a día En ayunas Alto costo

HbA1c	Se puede medir a cualquier hora del día	Alto Costo
	Muestra individual	Induce a error en diversas condiciones médicas
	Predice complicaciones microvasculares	Ensayo no validado
	Mejor predictor de enfermedades macrovasculares	No diagnostico en diabetes tipo 1 o mujeres embarazadas

La HbA1c es un marcador ampliamente utilizado que refleja la glucemia en un periodo de dos a tres meses. Es muy fácil de realizar en comparación con la prueba de tolerancia a la glucosa oral. Los niveles elevados de la HbA1c es probable que orienten hacia resistencia a la insulina, un trastorno metabólico y dislipidemia. En un estudio con el objetivo de determinar los puntos de corte de esta prueba y generar tres categorías: saludable, prediabetes y diabetes, utilizando como gold estándar la glucosa en ayunas y la prueba de tolerancia a la glucosa, presentó una sensibilidad del 44% y especificidad del 79% de la prueba de HbA1c en un punto de corte de 6.5%. Debido a esto, los autores concluyen que si a una persona con la prueba de HbA1c se le diagnostica como saludable, prediabetes o diabetes, es necesario confirmarlo con glucosa en ayunas o post-carga ⁶. En comparación con otro trabajo donde identificaron a personas con prediabetes ellos reportan a un 35% con alteración de la glucosa en ayunas (100-125 mg/dl), 40% de HbA1c (5.7%-6.4%); el 55% de la población presentaba prediabetes ⁷. Debido a lo antes mencionado es importante realizarse la prueba de tolerancia a la glucosa o también llamada postcarga.

La American Association of Clinical Endocrinologists (AACE), utiliza los siguientes criterios para la clasificación de prediabetes (2011).

Tabla 3. Criterios para el diagnóstico de prediabetes. IFG: alteración de glucosa en ayunas, IGT: intolerancia a la glucosa y HbA1c: hemoglobina.

Criterios para el diagnóstico de prediabéticos			
	Normal	Prediabetes	Diabetes
Glucosa en ayunas	< 100 mg/dl (5.5 mmol/L)	IFG: 100-125 mg/dl (5.5-6.9 mmol/L)	≥ 126 mg/dl (7 mmol/L)
Glucosa post-carga	< 140 mg/dl (7.7 mmol/L)	IGT: 140-199 mg/dl (7.8-11 mmol/L)	≥ 200 mg/dl (≥ 11 mmol/L)

HbA1c	< 5.5%	5.5% a 6.4%	≥ 6.5%
--------------	--------	-------------	--------

De las personas que presentan prediabetes, del 5 al 10% por año progresarán a diabetes. Esta enfermedad también se asocia con la resistencia a la insulina y la deficiencia de las células β . El 80% de los prediabéticos tienen disfunción de las células β con secreción anormal de la insulina; estos cambios se inician antes de que sean detectables. La resistencia a la insulina se inicia años antes del desarrollo de la diabetes. Para los prediabéticos, la modificación del estilo de vida es la piedra angular de la prevención de la diabetes, con la evidencia de una reducción del riesgo relativo del 40% - 70%⁸. Se han evaluado la eficacia de las intervenciones basadas en el estilo de vida, donde se ven favorecidos con pérdida de peso, en comparación con el control que no recibieron ningún tipo de intervención se redujo hasta 5.33 kg (IC 7.33-3.34 kg) y también se redujo el valor de HbA1c del 0.38% (IC -0.67-0.09%). Se afirma que la intervención para la pérdida del peso es efectiva y también se produce una disminución en los valores de HbA1c⁹.

I. 4. Sobrepeso-obesidad y diabetes mellitus

Una de las razones por la cual la prevalencia de diabetes ha ido en aumento es debido a la obesidad. El 90% de las personas con DM2 son obesas o con sobrepeso. El peso corporal está determinado por factores genéticos, ambientales, culturales y por el gasto energético, el cual es altamente influenciado por el nivel de actividad o inactividad física de cada individuo¹⁰. El sobrepeso y obesidad se define como el almacenamiento de grasa que puede ser causa de riesgos para la salud, se debe determinar el exceso de tejido adiposo y cuanto es perjudicial para la salud.

El índice de masa corporal (IMC), se calcula a partir del peso de la persona en kilogramos dividido por el cuadrado de la talla en metros¹¹. La OMS propone la siguiente clasificación:

Tabla 4. Clasificación según la OMS del estado nutricional de acuerdo al IMC.

Clasificación	IMC (kg/m²)
Bajo peso	<18.5 kg/m ²
Normopeso	18.5-24.9 kg/m ²
Sobrepeso	25-29.9 kg/m ²
Obesidad I	30-34.9 kg/m ²
Obesidad II	35-39.9 kg/m ²
Obesidad III	≥40 kg/m ²

Para conocer la distribución del tejido adiposo, se evalúa con el índice de cintura cadera (ICC), el cual se obtiene dividiendo el valor de la circunferencia de la cintura en centímetro entre la circunferencia de la cadera. Este parámetro también permite estimar si existe algún riesgo para la salud dependiendo de los valores obtenidos, si el ICC en hombres es de 0.90-0.95 el riesgo es moderado y si es mayor de 0.95 el riesgo es alto. Para el caso de las mujeres el riesgo es moderado de 0.80-0.85 y si es mayor de 0.85 el riesgo para la salud es alto. Si la circunferencia de cadera en los hombres es mayor de 94 cm y en mujeres mayor o igual a 80 cm, ambos presentan riesgo de desarrollar complicaciones metabólicas. Existen otros métodos como son la medición de la composición corporal que puede ser utilizada en el área médica como herramienta para la comprensión nutricional y para estudios epidemiológicos ¹². Como es el caso del análisis de bioimpedancia eléctrica, es un método utilizado para la medición de la composición corporal. Tiene como fundamento la oposición del paso de corriente a través del cuerpo. La masa libre de grasa tiene mayor parte de fluidos y electrolitos corporales, lo que favorece el paso de corriente eléctrica, al contrario de lo que pasa con la masa grasa que genera resistencia al paso de corriente. Por lo tanto, la impedancia es inversamente proporcional al contenido de agua y de masa libre de grasa. El aparato utiliza un software de predicciones ajustadas a la edad y al sexo. Es un método muy utilizado debido a que es económico, rápido y no es invasivo ^{13, 14}. Según la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO), en función del porcentaje de grasa corporal, las personas que presenten sobrepeso son aquellos con porcentaje de grasa mayor del 25% en hombres y > 33% en mujeres (Tabla 5), los valores normales en hombres van del 12 al 20% y en mujeres del 20 al 30% de grasa total ¹⁵.

Tabla 5. Porcentaje de grasa corporal en hombres y mujeres ¹⁵.

	Hombres	Mujeres
Normopeso	12-20%	20-30%
Límite	21-25%	31-33%
Obesidad	>25%	>33%

El aumento en el tejido adiposo se asocia con la resistencia a la insulina, con una deficiencia en la secreción de insulina que, junto con la hiperglucemia, son los principales rasgos de la diabetes. Un factor en el aumento de resistencia a la insulina (IR) es la obesidad abdominal visceral ¹⁶.

Los métodos para la identificación de la resistencia a la insulina son el CLAMP euglucémico-insulinémico y el Índice HOMA; siendo este último el más utilizado. En una investigación del IMSS en Morelia Michoacán, estudiando a personas en edades de 20 a 60 años; encontraron que las personas

con RI (HOMA ≥ 2.5 según lo notificado para la población mexicana) presentaban mayor porcentaje de grasa corporal. Del total de personas el 41.5% presentaba RI. Los valores de presión arterial sistólica y diastólica, glucosa, insulina, triglicéridos, LDL, peso, IMC, circunferencia abdominal y porcentaje de grasa corporal son significativamente mayores en el grupo con RI ($p < 0.05$)¹⁷. Los valores de insulina aumentan de manera proporcional con el grado de obesidad. El riesgo de desarrollar diabetes es hasta dos veces mayor cuando el IMC es de 30-33 kg/m² y hasta 10 veces más con IMC ≥ 40 kg/m². No solo los valores de insulina y glucosa son aumentados en los casos de obesidad sino también los niveles de triglicéridos¹⁸. También se considera a la hipertrigliceridemia como fuente en trastornos metabólicos de la glucosa¹⁹.

I. 5. Prevalencia de diabetes y prediabetes

Se han realizado diferentes estudios con la finalidad de conocer la prevalencia de diabetes o prediabetes; que reportan cifras muy semejantes, aunque en ocasiones son resultados muy distintos dependiendo del tipo de población (edad, con obesidad, Etc.) o el método diagnóstico para diabetes y prediabetes como se puede notar a continuación.

En la población de Asturias a partir de 1,014 individuos el 17.6% presentó prediabetes y 7.8% DM no diagnosticada previamente. Con respecto al grupo control con normoglucesmia, el riesgo relativo (RR) de mortalidad con prediabetes fue de 1.6 (IC 95%, 0.7-4), con DM ignorada RR= 2.7 (IC 95%, 1.1-6.3) y con DM conocida 2.5 (IC 95%, 1-6.3)²⁰.

En el Pueblo Nuevo Acambay, Estado de México se mostraron cifras mayores en cuanto a la prevalencia de prediabetes; fue del 24.8% siendo más frecuente en las mujeres. En la Tabla 6 se muestra la prevalencia por grupos de edad con un porcentaje mayor en el grupo de edad 70 y más años.

Tabla 6. Prevalencia de prediabéticos por grupos de edad²¹.

Grupos de edad	Prevalencia prediabetes
30-39 años	0.4%
40-49 años	1.2%
50-59 años	3.4%
60-69 años	3%
70 y más	3.6%

En un estudio realizado en Durango, México con 791 personas encontraron una prevalencia con algún trastorno metabólico de glucosa del 43.1% como se puede observar en la tabla 7.

Tabla 7. Diagnóstico de trastorno metabólico de glucosa en mujeres y hombres de 30 a 50 años de edad ¹⁹.

Personas	Porcentaje	Trastorno metabólico
173	21.9%	Glucosa en ayunas alterada
97	12.3%	Intolerancia a la glucosa
125	15.8%	Glucosa en ayunas alterada e Intolerancia a la glucosa
55	7%	Nuevo diagnóstico de diabetes
341	56.9%	Sano

Prevalencia de prediabetes muy parecida a lo encontrado por Serrano *et al.*, 2013 ²², quién a partir de 2,022 participantes de centros de atención primaria en España encontraron que 1,184 pacientes eran prediabéticos, el 21.5% presentó glucemia de 100-125 mg/dl, HbA1c de 5.7-6.4% el 26.7% y el 51.9% presentó ambas alteraciones. Al comparar el grupo de prediabéticos y el grupo sin alteración en el metabolismo de la glucosa, se presentaron incrementos significativos en hipertensión ($p < 0.001$) y dislipidemia ($p < 0.001$) a favor de los prediabéticos. En el grupo de los prediabéticos el 44% era obeso y en grupo sin prediabetes el 25.3% era obeso ($p < 0.001$) ²². Datos muy similares se encontraron en la clínica “Gustavo A. Madero” ISSSTE en México, en 123 pacientes de 20 a 64 años de consulta externa, donde la frecuencia de prediabetes fue de 43.8%. En la población de prediabéticos el 26.5% presentaban un IMC < 25 , 34.9% con sobrepeso y 65.2% con obesidad ²³. Muñoz *et al.*, 2013 evaluaron a 3,559 estudiantes de nuevo ingreso a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco en edades de 18-21 años clasificados por sus valores de glucosa en ayunas pero no encontraron asociación con el IMC. En comparación con los datos antes mencionados en 10,154 aspirantes a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí; la prevalencia de prediabetes en edad de 16 a 39 años fue de 4.2% (glucosa en ayuno entre 100-125 mg/dl) y el 95.8% eran sanos; encontrándose mayor prevalencia en hombres ($p < 0.001$). El 21.4% presentó sobrepeso, de los cuales el 1.1% fueron prediabéticos ²⁴.

Los estudios basados en la progresión de diabetes desde un estado prediabéticos son muy relevantes; aún más, integrando factores asociados a estas enfermedades. Después de 10 años de seguimiento en una cohorte prediabética de la Ciudad de Barcelona, la mitad de la población normalizó sus valores de glucemia y el 28.7% progreso a DM. Del total de la población el 42.6% tenían un IMC ≥ 30 kg/m². La obesidad se asoció con un mayor riesgo de DM (OR 2.02; IC_{95%} 1.01-4.02) ²⁵.

En México, la prevalencia de DM2 ajustada por la edad es de 8.2%. De las personas con prediabetes, aproximadamente el 25% progresaran a DM2 en 3 a 5 años. En un estudio europeo mostró una

incidencia de 6% anual de prediabetes y en un grupo multicéntrico estadounidense se observó incidencia del 11%. A partir de un estudio observacional, longitudinal y prospectivo de 6 años de seguimiento en población mexicana, se encontró que de 656 individuos el 33.1% desarrollaron prediabetes; tanto la edad y el IMC mostraron diferencias significativas, siendo ambas mayores en el grupo de los prediabéticos al compararlos con el grupo control sin prediabetes ($p < 0.001$, $p < 0.001$, respectivamente). Al final del seguimiento la incidencia de DM2 total fue de 2.4 por cada 100 pacientes/año, la incidencia en prediabéticos fue de 5.9 pacientes/año. Los autores concluyen que es importante identificar e intervenir al grupo de prediabéticos, principalmente con cambios en el estilo de vida o incluso con fármacos ²⁶.

I. 6. Genes asociados a diabetes y prediabetes

Hasta la fecha, se han realizado estudios donde incluyen genes de riesgo asociados a diabetes mellitus tipo 2 como: *CAPN10* (OR 3.02; IC_{95%} 1.37–6.64) ²⁷, *CDKAL1* (OR 1.164; IC_{95%} 1.010–1.342 $p = 0.0363$ ²⁸, *HHEX* (OR 1.243; IC_{95%} 1.063–1.453 $p = 0.0064$ ²⁸, *IGF2BP2* (OR 1.368; IC_{95%} 1.169–1.600 $p = 0.00009$ ²⁸, *KCNJ11* (OR 1.16; IC_{95%} 1.06–1.27 $p = 0.001$) ²⁹, *PPARG* (OR 0.78; IC_{95%} 0.59, 1.05 $p = 0.045$ ³⁰, *SLC30A8* (OR 1.225; IC_{95%} 1.056–1.420 $p = 0.0073$) ²⁸, *TCF7L2* (OR 1.50; IC_{95%} 1.31, 1.71 ³¹. La enfermedad de diabetes tipo 2 suele ser más frecuente en estadounidenses de ascendencia afroamericana o nativos, que en norteamericanos de origen europeo (de dos a cinco veces mayor); esta diferencia epidemiológica aún se desconoce si pudiera atribuirse a factores genéticos o ambientales. Con la ayuda de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) que son utilizados como marcadores, es posible conocer información sobre la ascendencia ³².

Se han analizado diferentes genes involucrados en el metabolismo de la glucosa como es el caso de *HMGA1* (rs146052672), que es un regulador clave en el receptor de la insulina. Para determinar el grado de asociación de este gen con DM2 y síndrome metabólico, en una cohorte Italiana se estudiaron a 1,125 individuos. La frecuencia de la variante se encontró en un 42.2% en el grupo de los diabéticos en comparación con el 35.5% en los no diabéticos. Las personas portadoras del gen mostraron un grado de asociación con DM de OR 1.44 (IC_{95%}: 1.09–1.9 $p = 0.01$). En relación al IMC, el gen mostró una asociación positiva con el aumento del IMC ($p = 0.045$) en el grupo de los diabéticos ³³.

Las calpaínas o proteasas neutras activadas por calcio, son proteasas de cisteína intracelulares, implicadas en la homeostasis de la glucosa. Por lo tanto si existe un SNP (polimorfismo de un solo nucleótido) en *CAPN10* podría estar implicado en la DM2. En un estudio participaron 1,159 afroamericanos como control y 269 casos de diabetes. Después del seguimiento de 9 años el 15%

desarrollo DM2. Si el SNP se presentaba de manera homocigota (G/G) se encontró un valor de asociación de OR 1.4 de presentar DM2 (IC_{95%}, 1-1.99)³⁴.

También se han analizado polimorfismos en busca de asociaciones con prediabetes y obesidad; como es el caso de polimorfismos del locus en el gen KCNQ1 (codifica para un canal de potasio dependiente de voltaje) estos polimorfismos pueden alterar las funciones del canal y presentar asociación con la resistencia a la insulina debido a la disminución en función de las células β y algunas otras características relacionadas con DM2, esto en población del este de Asia y Europa, causando así la disminución de la función de las células β y de la producción de la insulina en el páncreas, generando hiperglucemia³⁵. En población Alemana se analizó el gen THADA como candidato asociado con obesidad y resistencia a la insulina; en una cohorte de 1,578 individuos el 10.4% presentaron glucosa alterada en ayunas, 7.5% intolerancia a la glucosa y el 7.8% ambas, rs7578597 mostró asociación positiva con aumento en el IMC, mayor % de grasa corporal y mayor circunferencia de cintura³⁶.

Una de las primeras señales de un estado prediabéticos es la resistencia a la insulina. Debido a esto MAP4K4 que está implicada en la señalización inflamatoria, podría ser un medidor de resistencia a la insulina celular en un estado prediabético. Para comprobar esta hipótesis se trabajó con 1,769 Europeos, de los cuales el 30% presentó prediabetes (100-125 mg/ml) Se identificaron 14 SNP's de los cuales rs6543087, rs17801985, rs1003376 presentaron asociación con alteración de glucosa en ayunas ($p < 0.05$) y asociación con intolerancia a la glucosa rs11674694, rs11678405 ($p < 0.002$)³⁷.

En población China se buscó una asociación en variantes de genes PERK, JNK, BIP y XBP1 con prediabetes. De 1,448 individuos, 828 (57.2%) presentaron prediabetes. El SNP rs867529 en PERK mostro una asociación con prediabetes de OR 1.29 (IC 95%, 1.01-1.6) ($p=0.03$), rs6750998 con resistencia a la insulina ($p=0.019$) y rs17037621 con el aumento de IMC ($p=0.04$). La variante de BIP rs10986663 mostró asociación negativa OR 0.69 (IC_{95%} 0.53-0.97) ($p=0.007$). JNK rs2076341 se asoció con los valores de glucosa en ayunas ($p=0.006$) e índice de cintura-cadera ($p=0.019$). El gen XBP1 rs2239815 se asoció con los valores altos de glucosa post-carga ($p=0.048$)³⁸.

Debido a la necesidad de investigar la asociación de diversos genes de riesgo para diabetes tipo 2 en prediabéticos, se realizó un estudio transversal en 129 hombres y 157 mujeres en el norte de Alemania; se analizaron 3 SNP's (rs972283 KLF14, rs5945326 en DUSP9 y rs13266636 en SLC30A8). Las personas eran entre 18 y 65 años de edad, las mujeres presentaron una elevada circunferencia de la cintura, los participantes con prediabetes tenían un mayor IMC y un mayor HOMA-IR en comparación con los normoglucémicos; también los niveles de triglicéridos y la tasa de hipertensión fueron significativamente mayores ($p < 0.001$). Del 5 al 10% de los pacientes prediabéticos no tratados

desarrollarán diabetes cada año. Se necesitan hacer más investigaciones sobre genes que estén implicados en estado prediabético. En este trabajo en promedio cada SNP aumentó las probabilidades de prediabetes en un 57%. Estos 3 SNP's (rs972283 en KLF14, rs5945326 en DUSP9 y rs13266636 en SLC30A8) se asociaron positivamente con prediabetes ³⁹.

Existen datos que nos informan la asociación entre ciertos genes con la obesidad, se analizaron dos SNP, uno en el gen FTO (rs9939609) y el otro en el gen receptor adrenérgico B2 (ADRB2, rs1042714), se incluyeron 75 mujeres premenopáusicas con una intervención de pérdida de peso en un periodo de 3 meses y un mantenimiento de peso de 9 meses. Las frecuencias del alelo A FTO era del 0.45 y de ADRB2 fue de 0.46. Al comparar el grupo de genotipo TT con el grupo de AA, los homocigotos AA presentaban un IMC y grasa corporal total mayor ($p=0.031$ y $p=0.034$, respectivamente). Los polimorfismos de los dos genes no se asociaron con la reducción o aumento de peso durante el periodo de seguimiento ⁴⁰.

En otra investigación con mujeres; se buscó la relación del polimorfismo rs2235306 en apelinina con el síndrome metabólico en mujeres Egipcias, se compararon 100 mujeres sin síndrome metabólico y 100 mujeres con síndrome metabólico. Los datos mostraron que los valores del IMC, circunferencia de la cintura, presión sistólica y presión diastólica eran mayores en el grupo de los prediabéticos ($p<0.001$). Los valores de triglicéridos, colesterol total y LDL mayores en prediabéticos y con valores de HDL menores. La frecuencia genotípica de rs2235306 apelinina en personas con síndrome metabólico fue de 0.53 ($p=0.46$) e individuos control de 0.23 ($p=0.13$). En conclusión la variante no se asoció con un estado de síndrome metabólico ⁴¹.

Desde el punto de vista metabólico los genes PPARGC1A y PPARGC1B codifican a coactivadores transcripcionales que regulan diversos procesos metabólicos, como son: la señalización de la insulina, la adipogénesis y la glucogénesis hepática. Sin embargo, su expresión se ve afectada por el estrés metabólico y el aumento de lípidos. De un total de 1,859 pruebas realizadas, la variante en PPARGC1A está fuertemente asociada con valores de triglicéridos elevados ($p=2.9 \times 10^{-30}$), mayor IMC ($p=2 \times 10^{-5}$) y mayor adiposidad visceral ($p=1.9 \times 10^{-4}$) ⁴².

I. 7. Gen SLC16A11

El gen SLC16A11 es miembro 11 de la familia 16 de transportadores de ácido monocarboxílico con ubicación en el cromosoma 17p13.1 y está formado por 2,784 pares de bases (pb). Este gen codifica para una proteína con un tamaño de 471 aminoácidos, probablemente permita la transferencia de ácidos carboxílicos de un lado a otro de la membrana plasmática y se localiza en la membrana del

retículo endoplásmico en hígado, glándulas salivales y tiroides; posiblemente esté involucrado en el metabolismo de los lípidos (PubMed) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=162515>).

El consorcio SIGMA de diabetes tipo 2, con el objetivo de caracterizar las variantes de la secuencia del gen SLC16A11 como un factor de riesgo para diabetes, analizaron muestras de 9.2 millones de polimorfismo de un solo nucleótido en 8,214 mexicanos y latinoamericanos: 3,848 personas con diabetes tipo 2 y 4,366 personas como controles no diabéticos, todos bajo criterios de la ADA Asociación Americana de Diabetes controles con valores de glucosa en ayuno menor de 100 mg/dl y personas diabéticas con valores mayor a 125 mg/dl). La frecuencia del gen se presentó en 30% de toda la población y en 48% de los nativoamericanos, se mostró una asociación del gen SLC16A11 con DM2 (OR 1.29; IC 95% 1.20-1.38; $p < 0.001$); encontrando que las personas portadoras de este gen tienen aproximadamente un 25% más probabilidad de padecer diabetes y hasta 50% en aquellas que lo han heredado de ambos padres ⁴³.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Organización Mundial de la Salud en el 2012 estimó que a nivel mundial hay más de 347 millones de personas con diabetes, de los cuales el 90% representa a la diabetes tipo 2. Debido a la alta incidencia de diabetes sumada con obesidad es importante la identificación de las personas en un estado prediabético, ya que en muchas ocasiones se presentan diversas complicaciones por causa de un diagnóstico tardío de diabetes. Desde un estado prediabético se pueden hacer cambios en el estilo de vida que ayuden en el retraso y/o la aparición de DM2. Los estudios de polimorfismos en genes, han demostrado en ocasiones asociación con diversas enfermedades. En el gen SLC16A11, se encuentran polimorfismos rs117767867 (V113I), rs13342692 (D127G) y rs7541818 (G340S) que son un factor de riesgo para diabetes tipo 2. Es importante conocer si estas variantes se asocian con un estado prediabético, debido a la importancia que tiene para el desarrollo de diabetes y donde posiblemente también este asociado con la obesidad.

II.1. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

Las preguntas de investigación para este trabajo fueron las siguientes:

¿Cuál es la frecuencia de los polimorfismos del gen SLC16A11 en prediabéticos?

¿Cuál es la frecuencia de los polimorfismos del gen SLC16A11 en personas sin prediabetes?

¿Cuál es la asociación que existe entre los polimorfismos del gen SLC16A11 y la prediabetes diagnosticada por glucosa basal en ayunas?

¿Cuál es la asociación que existe entre los polimorfismos del gen SLC16A11 y la obesidad diagnosticada mediante el porcentaje de grasa corporal?

III. OBJETIVOS

III. 1. General

Cuantificar la frecuencia de tres polimorfismos del gen SLC16A11 rs117767867 (V113I), rs13342692 (D127G) y rs75418188 (G340S) e identificar la asociación que existe entre los polimorfismos del gen SLC16A11 en pacientes con prediabetes y con obesidad.

III. 2. Particulares

- Identificar la frecuencia de los polimorfismos del gen SLC16A11 en personas prediabéticas.
- Identificar la frecuencia de los polimorfismos del gen SLC16A11 en personas sin prediabetes.
- Evaluar la asociación entre los polimorfismos del gen SLC16A11 y prediabetes
- Evaluar la asociación entre los polimorfismos del gen SLC16A11 y la obesidad evaluada por porcentaje de grasa corporal.

IV. HIPÓTESIS

La frecuencia de los polimorfismos en el gen SLC16A11 en personas diabéticas fue del 48%, mostrando una asociación con DM2 (OR 1.29; IC 95% 1.20-1.38; $p < 0.001$). Posiblemente esté involucrado en la transferencia de ácidos carboxílicos de un lado a otro de la membrana plasmática. Las personas diabéticas portadoras de estos polimorfismos presentan un menor IMC en comparación con los no portadores ($p = 5.2 \times 10^{-4}$).

Debido a lo antes mencionado se formularon las siguientes hipótesis:

- La frecuencia de los polimorfismos del gen SLC16A11 será menor del 48% en la población prediabéticas.
- La frecuencia de los polimorfismos del gen SLC16A11 en personas no prediabéticas será menor que en personas prediabéticas.
- Se observará una asociación positiva entre los polimorfismos del gen SLC16A11 y prediabetes diagnosticada por glucosa basal en ayunas.
- Se observará una asociación positiva entre los polimorfismos del gen y la obesidad diagnosticada por el porcentaje de grasa corporal.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

V. 1. Estudio

El diseño para este estudio fue de tipo transversal, observacional y analítico; donde se identificaron dos grupos, con y sin prediabetes buscando asociación con los polimorfismos del gen SLC16A11 rs117767867, rs13342692 y rs75418188.

V. 1. 2. Población de estudio

El tipo de muestreo fue no probabilístico por conveniencia, por el fácil acceso a personas participantes como candidatos a donador en el Banco de Sangre del Centro Estatal de Transfusión Sanguínea y alumnos de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, entre abril y junio del 2014. A todas las personas se les hizo la invitación de participar en el proyecto con previo consentimiento informado (Anexo Carta de consentimiento informado)

V. 2. Criterios de selección

V. 2. 1. Criterios de inclusión

Se tomaron los siguientes criterios para los participantes que decidieran ingresar al protocolo:

Adultos no diabéticos

De cualquier género.

Edad de 18 a 64 años

De cualquier condición socioeconómica, escolaridad y ocupación

Ayuno mínimo de 6 horas

V. 2. 2. Criterios de no inclusión

Mujeres embarazadas, amamantando o menstruando

Pacientes con enfermedad renal crónica, insuficiencia hepática, hepatitis, paludismo, fiebre reumática o de transmisión sexual.

Haber ingerido bebidas alcohólicas en las últimas 72 hrs.

V. 3. Variables

Las variables que se tomaron en cuenta fueron:

- **Glucosa en ayunas:** valores de glucosa en suero después de un ayuno de 8 horas a 12 horas, medida a través de glucosa oxidasa en unidades mg/dl.
- **Hemoglobina glucosilada (HbA1c):** es el producto de la unión entre hemoglobina y la glucosa sanguínea. Es la concentración de glucosa en sangre promedio del organismo durante 2-3 meses anteriores al análisis. Equipo Labona Check HbA1c.

- **Índice de Masa Corporal (IMC):** Criterio diagnóstico que se obtiene dividiendo el peso en kilogramos, entre la talla en metros elevada al cuadrado (NOM-008-SSA3-2010).
- **Estado nutricional:** El sobrepeso y obesidad se define como el almacenamiento de grasa que puede ser causa de riesgos para la salud, se debe determinar el exceso de tejido adiposo. Se categoriza al sobrepeso con $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$, la obesidad grado I es con $IMC 30-34 \text{ kg/m}^2$, el grado II con $IMC 35-39.9 \text{ kg/m}^2$ y el grado III con IMC mayor a 40 kg/m^2 .
- **Obesidad por porcentaje de grasa corporal:** Porcentaje de grasa corporal total reportado por bioimpedancia eléctrica, equipo Tanita modelo BC-568 de cada uno de los participantes. Obesidad en Hombre $\geq 20\%$ y obesidad en mujeres $\geq 30\%$.
- **Polimorfismos de un solo nucleótido identificados por enzimas de restricción:** Hin1I para rs117767867 (V113I), Bsp143I para rs13342692 (D127G) y KfII para rs75418188 (G340S).

V. 4. Descripción de métodos diagnóstico

V. 4. 1. Toma y procesamiento de muestra

A las personas que acudieron al banco de Sangre del CETS como candidato a donador y a los alumnos de la facultad de medicina de la UAEM, se les hizo la invitación para participar en el proyecto y se les explicó en que consiste el protocolo. Si decidía participar, se procedió a la firma de la carta de consentimiento informado (Anexo Carta de consentimiento informado). Se les tomo la muestra de sangre periférica de acuerdo a las guías para las buenas prácticas de laboratorio. Con el sistema al vacío Vacutainer, se tomaron 10 ml de sangre periférica en un tubo sin anticoagulante y 5 ml en un tubo con anticoagulante. En microtubos etiquetados con código o folio correspondiente con fin de garantizar la confidencialidad e identidad de los participantes; se realizaron 10 alícuotas; del tubo con suero se realizaron las alícuotas del 1 al 5 y del tubo con anticoagulante del 6 al 8 contenían plasma, la alícuota 9 con sangre total para la determinación de HbA1c y la 10 leucocitos. Para ello se centrifugaron a 3000 rpm por 5 min. Con el remanente se realizaron las alícuotas y la fracción celular.

V. 4. 1. 2. Conservación de muestras biológicas

Las alícuotas se mantuvieron a -80°C para posteriormente realizar las pruebas bioquímicas y extracción de DNA.

V. 4. 2. Somatometría

A cada persona se le tomaron los siguientes datos:

- Talla: con el estadímetro-bascula BAME (mod. D.G.N. 2412 cap. 140 kg), la medición se realizó sin zapatos.

- Circunferencia de Cintura: para realizar esta medición se utilizó con la cinta métrica Lufkin® Executive Thinline W606PM.
- Circunferencia de cadera: para realizar esta medición se utilizó con la cinta métrica Lufkin® Executive Thinline W606PM.
- Peso y composición corporal: se utilizó un monitor corporal Tanita (modelo BC-568).

Todos los datos obtenidos se registraron en la hoja de “Registro de datos clínicos, bioquímicos y de somatometría” fecha, nombre y firma del personal que realiza el procedimiento (Anexo registro de datos clínicos, bioquímicos y de somatometría).

V. 4. 3. Tensión arterial

Se utilizó el Monitor IntelliSense de Uso Profesional HEM-907XL (OMRON). Los valores obtenidos se reportaron en el formato “Registro de datos clínicos, bioquímicos y de somatometría”, registrando con números arábigos y legibles los valores obtenidos, fecha, nombre y firma del personal que realiza el procedimiento.

V. 4. 4. Glucosa

La cuantificación de glucosa se realizó con el medidor de glucosa StatStrip Xpress, en el Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea (CETS) y en el Laboratorio de Medicina Transfusional de la Facultad de Medicina, UAEM. El resultado se anotó en la hoja de “Registro de datos clínicos, bioquímicos y de somatometría” fecha, nombre y firma del personal que realiza el procedimiento.

V. 4. 5. Colesterol, triglicéridos e insulina

El análisis de las muestras para colesterol total, HDL, LDL y triglicéridos se realizó en el Laboratorio de Análisis Clínicos del Centro Médico de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, con el analizador Roche-Hitachi 912. Se utilizó una alícuota de suero de cada participante para las cuatro pruebas.

Para la determinación de la Insulina, se utilizó el equipo cobas 6000 Roche del Hospital Regional “Centenario de la Revolución Mexicana” ISSSTE. Los resultados se anotaron en la hoja de “Registro de datos clínicos, bioquímicos y de somatometría”.

V. 4. 6. Determinación de HbA1c

Se utilizó el analizador Labona Check HbA1c dispositivo de diagnóstico *In vitro* para medir la hemoglobina A1c a partir de muestras de sangre. Este método se realizó en el Laboratorio de Medicina Transfusional de la Facultad de Medicina, UAEM. Todos los resultados se anotaron en la hoja de “Registro de datos clínicos, bioquímicos y de somatometría” fecha, nombre y firma del personal que realiza el procedimiento.

V. 5. Procedimientos de biología molecular

V. 5. 1. Diseño de oligonucleótidos

La secuencia del gen SLC16A11 se obtuvo en la página de National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Gene ID: 162515); a partir de la secuencia del gen, se ubicaron los polimorfismos y se diseñaron oligonucleótidos para amplificar fragmentos aproximados de 500 pb. Debido a la distancia entre los polimorfismos, con un par de oligonucleótidos incluye rs117767867, rs13342692 y con otro par de oligonucleótidos rs75418188. Se utilizó el programa de PerlPrimer considerando que no formaran dímeros de primers y/o estructuras secundarias (Anexo Metodología complementaria). Para evitar la hibridación de los oligonucleótidos diseñados anteriormente en otras secuencias, se realizó un análisis con el programa BLAST.

V. 5. 2. Síntesis de oligonucleótidos

Una vez confirmada la secuencia de los oligonucleótidos, se mandaron a sintetizar a la Unidad de síntesis química del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (Anexo Metodología complementaria).

V. 5. 3. Estandarización de las condiciones de PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

Una vez sintetizados los oligonucleótidos se realizaron pruebas de PCR para evaluar la eficacia de amplificación por medio de la intensidad de las bandas en el gel de agarosa. Se evaluaron diferentes concentraciones de MgCl₂ (0.5-4.0 mM) a temperaturas diferentes de 54°C a 72°C.

En la siguiente Tabla 8 se muestran las cantidades de reactivo para 13 tubos con 10 µl (12 temperaturas y uno de sobra).

Tabla 8 Concentraciones de MgCl₂ para PCR

Concentración MgCl ₂	Volumen	H ₂ O	MgCl ₂	dNTPs	Oligo sen (1)	Oligo antisen (2)	Buffer MgCl ₂	Taq Pol	DNA
0.5	100	98	2.1	2.6	2.6	2.6	13	1.3	7.8
1	100	95.8	4.3	2.6	2.6	2.6	13	1.3	7.8
1.5	100	93.6	6.5	2.6	2.6	2.6	13	1.3	7.8
2	100	91.5	8.6	2.6	2.6	2.6	13	1.3	7.8
2.5	100	89.3	10.8	2.6	2.6	2.6	13	1.3	7.8
3	100	87.1	13	2.6	2.6	2.6	13	1.3	7.8
3.5	100	85	15.1	2.6	2.6	2.6	13	1.3	7.8
4	100	82.8	17.3	2.6	2.6	2.6	13	1.3	7.8

Se utilizó el termociclador de gradiente Labnet MultiGene™ Gradient PCR Thermal Cycler TC9600-G-230V (Anexo Metodología).

V. 5. 4. Purificación de ADN

Para la purificación del material genético, se utilizó Chemagic DNA Blood100 kit “Perkin Elmer”, para purificación a partir de 100 µl de sangre (Anexo Metodología complementaria).

V. 5. 5. Gel de agarosa

Se preparó gel de agarosa al 2% en un volumen de 250 ml para ser colocado en la cámara de electroforesis con 168 pozos. Una vez disuelta la agarosa se añadió bromuro de etidio a una concentración de 1mg/ml (Anexo Metodología complementaria).

V. 5. 6. Electroforesis en gel de agarosa

El gel de agarosa se colocó en el interior de la cámara de electroforesis marca Thermo Scientific Owl A2 horizontal. Se programó a una hora 10 min a 180 volts. Pasado el tiempo se visualiza el gel en el transiluminador de luz ultravioleta (BioDoc-it[®] 220 Imaging System, UVP[®] LLC).

V. 5. 7. PCR para cada par de oligonucleótidos.

Con el par de oligonucleótidos **LMTE_HumMCT11_1** y **LMTE_HumMCT11_2** se buscaron las variantes V113I (rs117767867) y D127G (rs13342692); la PCR consta de las siguientes condiciones: etapa inicial de desnaturalización de 94°C por 5 min; posteriormente 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, 67.1°C 30 segundos para el alineamiento, 72°C 30 segundos para la extensión. Con un ciclo final a 72°C por 10 minutos. Se utilizó el termociclador Labnet MultiGene™ Gradient PCR Thermal Cycler TC9600-G-230V. Se prepara un volumen final de 40 µl, de los cuales se utilizan 9 µl para realizar la electroforesis para confirmar la amplificación de la muestra, 10 µl para la digestión enzimática con Hin1I y 10 µl para la enzima Bsp143I.

Para la variante G340S (rs75418188) se utilizaron los oligonucleótidos **LMTE_HumMCT11_5** y **LMTE_HumMCT11_6** y las condiciones para la PCR fueron las siguientes: etapa inicial de desnaturalización de 94°C por 5 min; posteriormente 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, 55.1°C 30 segundos para el alineamiento, 72°C 30 segundos para la extensión. Con una extensión final a 72°C por 10 minutos. Se utilizó el termociclador Labnet MultiGene™ Gradient PCR Thermal Cycler TC9600-G-230V. Se prepara un volumen final de 30 µl, de los cuales se utilizan 9 µl para realizar la electroforesis, 10 µl para la digestión enzimática con KfII.

V. 5. 8. Digestión enzimática.

Se utilizaron tres enzimas de restricción para la identificación de los polimorfismos, para V113I (rs117767867) se utilizó Hin1I con un tiempo de incubación a 37°C por 2hrs; para D127G (rs13342692) la enzima Bsp143I con incubación por 1hr y 30 min a 37°C y para G340S (rs75418188) la enzima KfII con incubación a 37°C por 2 hrs.

Si se presenta corte con la enzima, significa que la persona no presenta el polimorfismo y si no se observa corte con la enzima, significa que la persona presenta el polimorfismo; de la misma manera será para todas las enzimas de restricción. Se diseñó de esta manera debido a que no se encontraban enzimas de restricción que realizaran corte en la ubicación del polimorfismo en la secuencia del gen SLC16A11.

V. 6. Análisis estadístico

El tamaño de muestra fue calculado con la siguiente fórmula:

DATOS	VALORES
Z_α:	1.96
P:	0.16
1-p:	0.84
i:	0.05
n: 206	

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 \cdot p \cdot q}{i^2}$$

Para saber cuál era la frecuencia de los polimorfismos, se trabajaron con 100 muestras y a partir de estos resultados se calculó el tamaño de muestra necesario para el proyecto. La frecuencia de polimorfismos en estas 100 primeras muestras fue de 16%.

Para el análisis de los datos se utilizó el programa STATA 9.0. El análisis comparativo de las variables continuas se realizó con la prueba t de Student, para comparar las variables cualitativas y para el análisis de asociación se empleó la prueba de Chi². El nivel de significancia considerado fue p≤0.05. La identificación de las asociaciones entre los polimorfismos con prediabetes y los polimorfismos con obesidad (mediante % de grasa corporal), se empleó la razón de momios con intervalos de confianza al 95% (IC_{95%}).

VI. RESULTADOS

VI. 1. Descripción de la población en estudio

VI. 1. 1. Bioquímicos, antropométricos y sociodemográficos

En este estudio se incluyeron a 310 personas, de los cuales 255 cumplieron con los criterios de selección. El promedio de edad fue de 31.61 años con una DE de 11.04 y rango de 18 a 71 años. De los anteriores, se incluyeron 187 sujetos sin alteración en las cifras de glucosa basal en ayuno (glucosa <100 mg/dL), que se consideran como integrantes del grupo no prediabético, y 68 sujetos con alteración de la glucosa en ayuno o prediabéticos (100 a 125 mg/dL).

La Tabla 9 compara las variables antropométricas en los dos grupos de estudio. La mayoría de las variables estudiadas mostraron diferencias significativas a favor del grupo de sujetos con alteración de la glucosa en ayuno ($p \leq 0.03$), excepto en la talla y perímetro de cadera ($p \geq 0.06$).

Tabla 9. Comparación de las variables antropométricas entre no prediabéticos y prediabéticos (glucosa en ayuno 100 a 125 mg/dL). Los valores corresponden a medias (m) y desviación estándar (DE).

Variable	No prediabéticos (n=187)		Prediabéticos (n=68)		t student
	m	DE	m	DE	p
Peso (kg)	68.88	13.50	72.37	12.72	0.03
Talla (m)	1.61	0.09	1.60	0.07	0.16
IMC (kg/m ²)	26.20	4.28	28.18	4.57	0.0008
P. Cin. (cm)	88.95	11.14	92.94	11.47	0.006
P. Cad (cm)	97.53	8.04	99.25	8.51	0.06
I.C.C.	0.91	0.07	0.93	0.08	0.008
Grasa Corp. (%)	26.94	8.44	29.03	7.93	0.03
G.V. (%)	5.72	3.68	7.45	3.83	0.0006

P. Cin.: Perímetro de cintura; P. Cad.: Perímetro de cadera; I.C.C.: Índice cintura-cadera; Grasa Corp.: Porcentaje de grasa corporal; G.V.: Porcentaje de grasa visceral.

En la tabla 10 se comparan las variables bioquímicas, donde los valores más elevados fueron a favor del grupo de prediabéticos ($p \leq 0.001$), excepto en HbA1c; es de hacer notar que las HDL estuvieron más bajas en el grupo de los prediabéticos ($p = 0.004$).

Tabla 10. Variables bioquímica entre no prediabéticos y prediabéticos (glucosa en ayuno 100 a 125 mg/dL). Los valores corresponden a medias (m) y desviación estándar (DE).

Variable	No prediabéticos (n=187)		Prediabéticos (n=68)		t student
	m	DE	m	DE	p
Glucosa (mg/dL)	87.55	7.51	107.61	6.09	0.0001
HbA1c (%)	6.33	1.14	6.33	0.95	0.50
Col. Tot. (mg/dL)	178.87	31.84	194.76	42.73	0.0008
HDL (mg/dL)	41.08	11.39	37.05	9.09	0.004
LDL (mg/dL)	105.43	27.01	118.94	42.19	0.001
Triglic. (mg/dL)	134.94	72.28	202.48	213.12	0.0001
Insulina (μU/ml)	13.62	11.21	16.83	10.61	0.01

HbA1c: hemoglobina glucosilada; Col. Tot.: colesterol total; Triglic.: Triglicéridos.

En la Tabla 11, se comparan los signos vitales en los dos grupos de estudio. Se encontraron diferencias significativas en presión sistólica y diastólica a favor de los prediabéticos ($p < 0.009$).

Tabla 11. Comparación de los signos vitales entre no prediabéticos y prediabéticos (glucosa en ayuno 100 a 125 mg/dL). Los valores corresponden a medias (m) y desviación estándar (DE).

Variable	No prediabéticos (n=187)		Prediabéticos (n=68)		t student
	m	DE	m	DE	p
Pulso (lat/min)	66.26	11.34	67.75	10.22	0.17
PAS (mmHg)	115.06	11.12	122.51	13.15	0.0001
PAD (mmHg)	70.37	8.98	73.47	9.87	0.009

PAS: Presión arterial sistólica; PAD: Presión arterial diastólica.

En la tabla 12, al comparar en los grupos de estudio las variables sociodemográficas solo existen diferencias significativas en la escolaridad, los prediabéticos muestran menor escolaridad ($p = 0.04$).

Tabla 12. Comparación de las variables demográficas entre no prediabéticos y prediabéticos (glucosa en ayuno 100 a 125 mg/dL). Los valores corresponden a frecuencias absolutas (f) y frecuencias relativas (%).

Variable	No prediabéticos (n=187)		Prediabéticos (n=68)		Chi ²
	F	%	f	%	P
Sexo					0.79
Masculino	101	54.01	38	55.88	
Femenino	86	45.99	30	44.12	
Residencia					0.25
Edo. Morelos	171	91.44	58	86.57	
Otros	16	8.56	9	13.43	
Estado civil					0.48
Con pareja	98	52.41	39	57.35	
Sin pareja	89	47.59	29	42.65	
Escolaridad					0.04
≤ Primaria	81	43.32	20	29.41	
> Primaria	106	56.68	48	70.59	

VI. 2. Obesidad a partir del porcentaje de grasa corporal.

Para identificar obesidad a partir del % de grasa corporal, la población se subdividió por género. Considerando obesidad en hombres con porcentaje de grasa corporal $\geq 20\%$ y en el caso de mujeres con obesidad $\geq 30\%$ de grasa corporal. En los hombres el porcentaje de obesidad fue mayor en el grupo de los prediabéticos pero sin diferencia significativa ($p=0.07$); en el grupo de las mujeres se presentó de la misma manera ($p=0.1$).

Tabla 13. Comparación de obesidad, según % de grasa corporal, no prediabéticos y prediabéticos divididos por sexo.

Variable	Hombres Prediabéticos (n=38)		Hombres No prediabéticos (n=101)		Chi ²
	F	%	F	%	p
% Grasa corporal					0.14
Obesidad	30	78.94	67	66.33	
Normal	8	21.05	34	33.66	

	Mujeres Prediabéticas (n=27)		Mujeres Control (n=86)		
% Grasa corporal					0.1
Obesidad	24	80	55	63.95	
Normal	6	20	31	36.05	

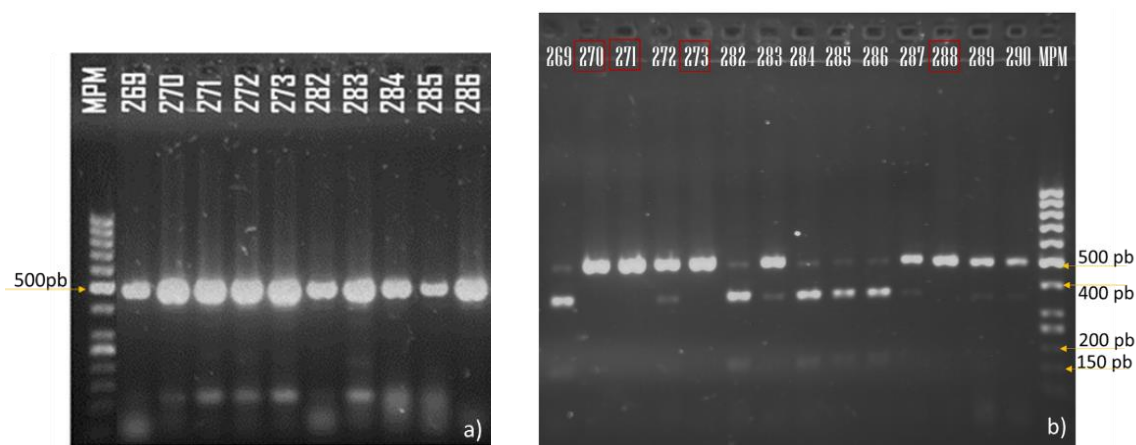
Obesidad: en hombres >20% de grasa corporal y obesidad en mujeres >30%.

VI. 3. Identificación de polimorfismos

De las 255 muestras para analizar, se obtuvieron 197 resultados identificando dos polimorfismos rs117767867 (V113I) y rs13342692 (D127G), con una frecuencia total de 16.24%; frecuencia en hombres con 15% y en mujeres 17.8%.

Con el polimorfismo rs75418188 (G340S) se cuentan con 89 muestras analizadas, de las cuales presentan una frecuencia del 31.4%; frecuencia en hombres 27.5% y en mujeres 38.7%.

En la figura 1 se muestra el efecto de la digestión enzimática con Hin1I y Bsp143I, por medio de la electroforesis en gel de agarosa; en las muestras 270, 271, 273 y 288 presentaron los polimorfismos rs117767867 (V113I) y rs13342692 (D127G) debido a la ausencia del corte en el fragmento previamente amplificado.



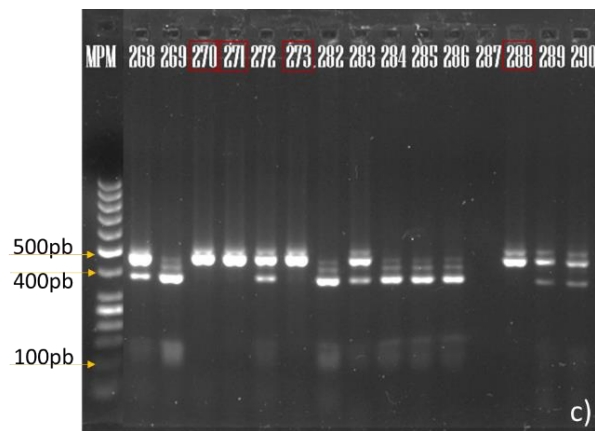


Figura 1. Gel de agarosa al 2%; **a)** producto de PCR de 500 pb utilizando los oligonucleótidos LMTE_HumMCT11_1 y LMTE_HumMCT11_2, **b)** digestión enzimática con Hin1I, los números que se encuentran dentro de un cuadro rojo son las muestras que presentan el polimorfismo V113I (270, 271, 273, 288); **c)** digestión enzimática con Bsp143I los números que se encuentran dentro de un cuadro rojo son las muestras que presentan el polimorfismo D127G (muestras 270, 271, 273, 288).

En la figura 2 se muestra en un gel de agarosa el producto de PCR y en el otro gel la digestión enzimática con KfII para el polimorfismo rs75418188 (G340S).

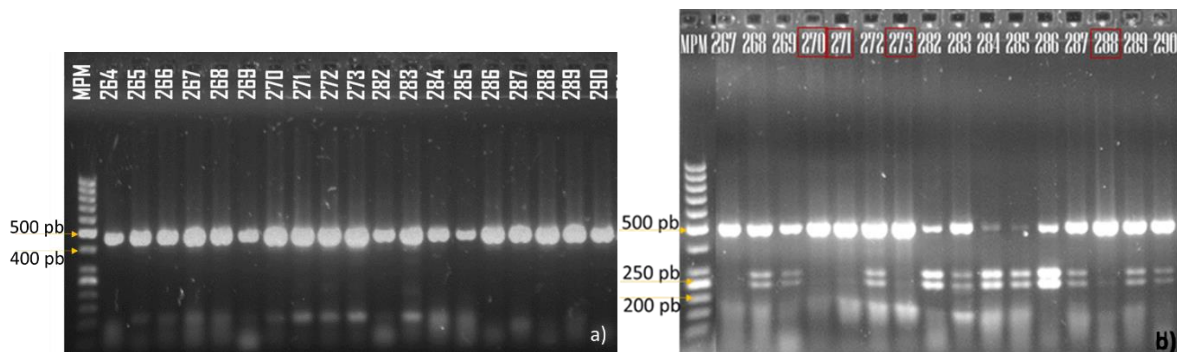


Figura 2. Gel de agarosa al 2%; **a)** producto de PCR de 450 pb utilizando los oligonucleótidos LMTE_HumMCT11_5 y LMTE_HumMCT11_6, **b)** digestión enzimática con KfII, los números que se encuentran dentro de un cuadro rojo son las muestras que presentan el polimorfismo G340S (270, 271, 273, 288).

VI. 4. Frecuencias de polimorfismos.

En relación a los ensayos del polimorfismo, se tiene un resultado de 197 personas para los polimorfismos rs117767867 (V113I) y rs13342692 (D127G), que 113 corresponden a hombres (45%) y 84 para mujeres (55%); la frecuencia de estos dos polimorfismos es de 16%. Del polimorfismo rs75418188 (G340S) se tienen 89 resultados, con una frecuencia de (31.4%). En la tabla 14 muestra la asociación de los tres polimorfismos en personas prediabéticas y sin prediabetes. A pesar de que V113I y D127G aparecen como factor de riesgo, no alcanzan diferencia estadística. Por otro lado, G340S se comporta como factor protector, también no alcanza diferencia estadística.

Tabla 14. Asociación de prediabetes, por glucosa ≥ 100 mg/dL, y diferentes polimorfismos del gen SLC16A11. Los valores corresponden a frecuencias absolutas y relativas (%).

	Con polimorfismo	Sin polimorfismo	RM	IC _{95%}		Chi ² p
V113I						
Prediabéticos	8 (17.4%)	38 (82.6%)	1.11	0.39	2.82	0.80
No prediabéticos	24 (15.9%)	127 (84.1%)				
D127G						
Prediabéticos	8 (17.4%)	38 (82.6%)	1.11	0.39	2.82	0.80
No prediabéticos	24 (15.9%)	127 (84.1%)				
G340S						
Prediabéticos	4 (20%)	16 (80%)	0.46	0.10	1.69	0.21
No prediabéticos	24 (34.78%)	45 (65.21%)				

V113I: rs117767867; D127G: rs13342692; G340S: rs7541818.

También se realizó un análisis de asociación entre los polimorfismos del gen con prediabetes basada en los valores de hemoglobina glucosilada, como se muestra en la tabla 15. No se encontró asociación considerando prediabéticos con valores $>5.5\%$ ver tabla 5.

Tabla 15. Asociación de prediabetes, por HbA1c $>5.5\%$, y diferentes SNP's del gen SLC16A11. Los valores corresponden a frecuencias absolutas y relativas (%).

HbA1c	Con polimorfismo	Sin polimorfismo	RM	IC _{95%}		Chi ² p
V113I						
Prediabéticos	25 (16.12%)	130 (83.87%)	0.96	0.36	2.85	0.93
No prediabéticos	7 (16.6%)	35 (83.4%)				
D127G						
Prediabéticos	25 (16.12%)	130 (83.87%)	0.96	0.36	2.85	0.93
No prediabéticos	7 (16.6%)	35 (83.4%)				
G340S						
Prediabéticos	24 (33.8%)	47 (66.2%)	1.78	0.48	8.22	0.34
No prediabéticos	4 (22.2%)	14 (77.8%)				

V113I: rs117767867; D127G: rs13342692; G340S: rs7541818.

En el caso de los hombres al momento de comparar la obesidad por porcentaje de grasa corporal con los SNP's, no mostraron asociación (tabla 16). En los tres snp's se comportan como factor protector, aunque no alcanzan diferencia estadística.

En las mujeres solo mostraron asociación positiva con los SNP's rs117767867 (V113I) y rs13342692 (D127G) RM 7.46, (IC_{95%} 0.99-328.58) p=0.03 como se puede observar en la tabla 17.

Tabla 16. Asociación de obesidad en hombres, grasa corporal $\geq 20\%$, y diferentes SNP's del gen SLC16A11. Los valores corresponden a frecuencias absolutas y relativas (%).

% grasa corporal Hombres	Con polimorfismo	Sin polimorfismo	RM	IC _{95%}		Chi ² p
V113I						
Obesidad	12 (15%)	68 (85%)	0.98	0.28	3.92	0.98
No obesidad	5 (15.15%)	28 (84.84%)				
D127G						
Obesidad	12 (15%)	68 (85%)	0.98	0.28	3.92	0.98
No obesidad	5 (15.15%)	28 (84.84%)				
G340S						
Obesidad	10 (23.8%)	32 (76.2%)	0.52	0.13	2.22	0.29
No obesidad	6 (37.5%)	10 (62.5%)				

V113I: rs117767867; D127G: rs13342692; G340S: rs7541818.

Tabla 17. Asociación de obesidad en mujeres, grasa corporal $\geq 30\%$, y diferentes SNP's del gen SLC16A11. Los valores corresponden a frecuencias absolutas y relativas (%).

% grasa corporal Mujeres	Con polimorfismo	Sin polimorfismo	RM	IC _{95%}		Chi ² p
V113I						
Obesidad	14 (23.72%)	45 (76.27%)	7.46	0.99	328.58	0.03
No obesidad	1 (4%)	24 (96%)				
D127G						
Obesidad	14 (23.72%)	45 (76.27%)	7.46	0.99	328.58	0.03
No obesidad	1 (4%)	24 (96%)				
G340S						

Obesidad	11 (47.82%)	12 (52.17%)	6.41	0.61	314.92	0.07
No obesidad	1 (12.5%)	7 (87.5%)				

V113I: rs117767867; D127G: rs13342692; G340S: rs7541818.

Debido a que no se encontró asociación por medio del porcentaje de grasa corporal, también se buscó por IMC. Al igual de los datos anteriores, la obesidad por IMC no presentó asociación con los SNP's. La frecuencia de los SNP's son muy similares con y sin obesidad (tabla 16).

Tabla 18. Asociación de obesidad, por IMC (IMC>30), y diferentes SNP's del gen SLC16A11. Los valores corresponden a frecuencias absolutas y relativas (%).

IMC	Con polimorfismo	Sin polimorfismo	RM	IC _{95%}		Chi ² p
V113I						
Obesidad	7 (16.3%)	36 (83.7%)	1.00	0.33	2.64	0.99
No obesidad	25 (16.23%)	129 (83.76%)				
D127G						
Obesidad	7 (16.3%)	36 (83.7%)	1.00	0.33	2.64	0.99
No obesidad	25 (16.23%)	129 (83.76%)				
G340S						
Obesidad	6 (28.57%)	15 (71.42%)	0.83	0.23	2.68	0.74
No obesidad	22 (32.35%)	46 (67.64%)				

V113I: rs117767867; D127G: rs13342692; G340S: rs7541818.

VII. DISCUSIÓN

La prevalencia de prediabetes en Latino América está en aumento debido a los cambios alimenticios inadecuados, estilo de vida, factores de riesgo y características genéticas. En Estados Unidos, en NANHES, encontraron 22.6% de la población en estudio con sobrepeso presentaba prediabetes; de los cuales el 23.5% presentaron glucosa en ayuno alterada ⁴⁴. En una cohorte de la ciudad de Barcelona durante un seguimiento de 10 años encontraron que los factores asociados a la progresión de diabetes era $IMC \geq 30 \text{kg/m}^2$ con 42.6% e hipertrigliceridemia con 38.3% ²⁵. En la población de Asturias a partir de 1,014 individuos el 17.6% presentó prediabetes y 7.8% DM no diagnosticada previamente. Con respecto al grupo control con normogluemia, el riesgo relativo (RR) de mortalidad en prediabetes fue de 1.6 (IC 95%, 0.7-4), con DM ignorada $RR = 2.7$ (IC 95%, 1.1-6.3) y con DM conocida 2.5 (IC 95%, 1-6.3); mostrando un mayor riesgo de mortalidad con las personas que presentaban diabetes y aun no lo sabían ²⁰.

Para el caso de México en aspirantes a la Universidad del Estado de San Luis Potosí presentaron prediabetes el 4.2% ²⁴; en Durango 43.1% ¹⁹ y en el estado de México 24.8% ²¹; este último dato muy parecido a lo encontrado en este trabajo con 26.6%, en el caso de los hombres el 27.3% y en mujeres de 25.8% por glucosa alterada en ayunas 100-125mg/dl. Estas diferencias en las frecuencias de prediabetes posiblemente se deba a la diferencia en la edad en las diferentes poblaciones de estudio; las personas “jóvenes” menores de 30 años se encuentra una menor frecuencia de la enfermedad en comparación con las personas mayores. Con el método de HbA1c tuvimos una prevalencia de prediabetes del 35.6% (HbA1c 5.5% - 6.4%) y diabetes no diagnosticada 41.5% (HbA1c $\geq 6.5\%$). Los valores de HbA1c no mostraron diferencias significativas al comparar el grupo de prediabéticos y el grupo sin prediabetes bajo el criterio de glucosa en ayunas. La prueba de HbA1c presenta algunas desventajas que pueden alterar los resultados como hemoglobinopatías, deficiencia de hierro, duración de vida de los eritrocitos, diferencias raciales y étnicas ⁴⁵. Aunque en un estudio con Coreanos prediabéticos la prueba más fuerte para predecir la progresión a diabetes fue la HbA1c (OR 9.9, 8.24-11.9) en comparación con glucosa en ayunas (OR 7.29, 5.97-8.89) ⁴⁶. Debido a esto, los autores concluyen que si el diagnóstico de prediabetes y/o diabetes es por HbA1c, es necesario también confirmarlo con la prueba de glucosa en ayunas o post-carga ^{6, 47}.

Del total de la población con $IMC < 25 \text{kg/m}^2$ fue el 37% y sobrepeso el 40% de los cuales una cuarta parte eran prediabéticos. Datos semejantes fueron encontrados por Monreal y colaboradores (2009)²⁴, al reportar la prevalencia de prediabetes en sujetos con sobrepeso ^{23, 25}. Las variables que presentaron diferencias significativas entre el grupo no prediabético y el grupo prediabético fueron el peso, IMC,

perímetro de cintura, índice de cintura cadera y grasa corporal. Esto quiere decir que las personas prediabéticas presentaban mayor peso, obesidad, por consiguiente mayor grasa corporal y mayor grasa visceral. También los datos presentaron asociación positiva entre obesidad y prediabetes (datos no mostrados), aunque algunos autores ⁴⁸ no encontraron asociación posiblemente por la edad de su población (18-21 años). Monreal *et al*, 2009 del total de su población el 21% presentaba sobrepeso y solo el 1% de estos era prediabético, el rango de edad de la población fue de 16-39 años.

De manera general el grupo prediabético presentó mayor porcentaje de grasa corporal; pero al dividir el grupo de los hombres según su porcentaje de grasa considerando obesos con >20% con y sin prediabetes, no se presentaron diferencias significativas ($p=0.14$). Sin embargo, hay un mayor porcentaje de hombres obesos en el grupo de los prediabéticos en comparación con los no prediabéticos 79% vs 66.3% respectivamente. Para el caso de mujeres también se comparó la obesidad (obesidad >30% de grasa corporal) con prediabetes donde no mostraron diferencias ($p=0.01$). Siendo un mayor porcentaje de mujeres con obesidad y prediabetes en comparación de mujeres con obesidad sin prediabetes (80% vs 64%, respectivamente).

En relación a otros factores de riesgo como el colesterol, LDL, triglicéridos e insulina fueron más elevados en el grupo de los prediabéticos ($p<0.05$) que en grupo sin prediabetes y los valores de HDL menores en prediabéticos ($p<0.004$).

Se han analizado polimorfismos en ciertos genes encontrado asociación con prediabetes, diabetes y obesidad; como el gen rs867529 en PERK mostro una asociación con prediabetes de OR 1.29 (IC 95%, 1.01-1.6) ($p=0.03$) y rs6750998 con resistencia a la insulina y rs17037621 con el aumento del IMC en población China ³⁸. Con el gen MAP4K4 rs6543087, rs17801985, rs1003376 presentaron asociación con alteración de la glucosa en ayunas ³⁷. De igual manera JNK rs2076341 se asoció con valores elevados de glucosa en ayunas ³⁸. THADA rs7578597 con IMC y % de grasa corporal elevados, así como mayor circunferencia de cintura, esto en población Alemana ³⁶. En 8,214 mexicanos y latinoamericanos encontraron un haplotipo en el gen SLC16A11 con una frecuencia del 48% mostrando asociación con diabetes (OR) =1,29). En este trabajo encontramos una frecuencia de rs117767867 (V113I) y rs13342692 (D127G) del 16.4% (17.8% en mujeres y 15% en hombres); para el caso de rs7541818 (G340S) fue del 31.5% (de los hombres 27.58% y en mujeres el 38.7%).

Debido a que no se alcanzó el tamaño de muestra necesario ($n=206$) para este trabajo se calculó la potencia del estudio, considerando los 197 personas con una proporción real de 0.16 y una proporción hipotética de 0.24, obtuvimos una potencia del 82%.

Los polimorfismos de un solo nucleótido no mostraron asociación con prediabetes por valores de glucosa en ayunas; V113I, D127G RM 1.11 IC_{95%} 0.39-2.82, p=0.80 y G340S RM 0.46 IC_{95%} 0.10-1.69, p=0.21. Tampoco presentaron asociación de prediabetes por HbA1c V113I, D127G RM 0.96 IC_{95%} 0.36-2.85, p=0.93 y G340S RM 1.78 IC_{95%} 0.48-8.22, p=0.34. Las personas que presentan el haplotipo de riesgo pueden desarrollar diabetes 22.1 años antes y con IMC 0.9kg/m² menos. En el presente estudio no identificamos asociación de SNP's con IMC; pero al buscar asociación con el porcentaje de grasa corporal para el caso de mujeres solo los polimorfismos rs117767867 (V113I) y rs13342692 (D127G) mostraron diferencias significativas (p=0.03); con RM 7.46 (IC_{95%} 0.99-328.58); en otras palabras el factor asociado es de riesgo, es decir, que las mujeres de la población en estudio que presentan estos SNP's , tienen 7.46 veces más riesgo de padecer obesidad diagnosticada cuando el porcentaje de grasa corporal $\geq 30\%$.

El haplotipo en el gen SLC16A11 tuvo con una frecuencia del 48% mostrando asociación con diabetes (OR) =1,29). En esta investigación la frecuencia de los polimorfismos rs117767867 (V113I) y rs13342692 (D127G) en los prediabéticos fue del 17.39% y en los no prediabéticos 15.89%. En el caso del polimorfismo rs7541818 (G340S) tuvo una mayor frecuencia en el grupo de los no diabéticos en comparación con el grupo prediabético (34.78% y 20% respectivamente); sin embargo los tres polimorfismos no mostraron asociación con prediabetes ya sea diagnosticada por glucosa en ayunas V113I, D127G RM 1.11 IC_{95%} 0.39-2.82, p=0.80 y G340S RM 0.46 IC_{95%} 0.10-1.69, p=0.21; o prediabetes por HbA1c V113I, D127G RM 0.96 IC_{95%} 0.36-2.85, p=0.93 y G340S RM 1.78 IC_{95%} 0.48-8.22, p=0.34.

VIII. CONCLUSIONES

La prevalencia de prediabetes fue del 26.6%, en el caso de los hombres el 27.3% y en mujeres de 25.8% por glucosa alterada en ayunas 100-125mg/dl. Con el método de HbA1c tuvimos una prevalencia de prediabetes del 37.8% (HbA1c 5.5% - 6.4%) en hombres el 39.1% y en mujeres 36.2%. La prevalencia de diabetes no diagnosticada fue del 41.5% (HbA1c \geq 6.5%) (41.3% en hombres y 42.2% en mujeres).

En 197 sujetos estudiados la frecuencia del polimorfismo rs117767867 (V113I) y rs13342692 (D127G) en prediabéticos fue del 17.39%. El polimorfismo rs7541818 (G340S) con frecuencia del 20%.

En personas sin prediabetes la frecuencia de los polimorfismos rs117767867 (V113I) y rs13342692 (D127G) fue del 15.9%; y en el caso de rs7541818 (G340S) 34.78%, mayor a la frecuencia identificada en el grupo de los prediabéticos (20%).

No se encontraron diferencias significativas al relacionar la presencia de los polimorfismos rs117767867 (V113I), rs13342692 (D127G) y rs7541818 (G340S) con prediabetes utilizando como clasificación el valor de glucosa basal, ni empleando el criterio basado en hemoglobina glucosilada.

Al relacionar los polimorfismos con la obesidad por medio del porcentaje de grasa corporal en hombres, considerando como obesidad $>20\%$ no se identificó asociación significativa en los grupos de comparación.

Para el caso de las mujeres, la presencia de los polimorfismos V113I (rs117767867) y D127G (rs13342692) se identificó como factor de riesgo para obesidad diagnosticada por grasa corporal $\geq 30\%$ (RM 7.46). Es decir, las mujeres con estos SNP's tienen 7.46 veces más riesgo de padecer obesidad diagnosticada por grasa corporal $\geq 30\%$. G340S (rs7541818) no presentó asociación con obesidad diagnosticada por grasa corporal $\geq 30\%$ (RM 6.41 IC_{95%} 0.61-314.92, p=0.07).

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Guías ALAD sobre el diagnóstico, control y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 con medicina basada en evidencia. Revista de la ALAD. 2013; 52-63.
- 2) Federación Internacional de Diabetes (FID). Atlas de la diabetes de la FID. 6ª edición. 2013. Disponible:
http://www.fundaciondiabetes.org/upload/publicaciones_ficheros/61/www_25610_Diabetes_Atlas_6th_Ed_SP_int_ok_0914.pdf.
- 3) García Soidán. Principales diferencias entre glucemia basal alterada e intolerancia a la glucosa. Av Diabetol. 2009; 25(2):105-109.
- 4) Goldenberg R, Punthakee Z. Definition, classification and diagnosis of diabetes, prediabetes and metabolic syndrome. Can J Diabetes. 2013; 37(S1):S8-S11.
- 5) Bastarrachea RA, Laviada-Molina H, Vázquez-Chavez C. Análisis crítico de los nuevos criterios que sustentan el diagnóstico de pre-diabetes. Rev Endocrinol Nutr. 2004; 12(2):90-6.
- 6) Karakaya J, Akin S, Karagaoglu E, Gurlek A. The performance of hemoglobin A1c against fasting plasma glucose and oral glucose tolerance test in detecting prediabetes and diabetes. J Res Med Sci. 2014; 19(11):1051-7.
- 7) Vanderwood K., Kramer M., Miller R., Arena V. and Kriska A. Evaluation of non-invasive screening measures to identify individuals with prediabetes. DIABETES RES CLIN PR. 2015; 107: 194-201.
- 8) Tabá G, Herder C, Rathmann W, Brunner E, Kivimäk M. Prediabetes: A High-Risk State for Developing Diabetes. Lancet. 2012; 379(9833):2279-90.
- 9) Terranova CO, Brakenridge CL, Lawler SP, Eakin EG, Reeves MM. Effectiveness of lifestyle-based weight loss interventions for adults with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. Diabetes Obes Metab. 2015; 17(4):371-8.
- 10) Farías MM, Silva C, Rozowski J. Microbiota intestinal: rol en obesidad. Revista chilena de nutrición. 2011; 38(2):228-33.
- 11) American diabetes association. Standards of medical care in diabetes. 2013; 36(Suppl 1): S11–S66.
- 12) Oria E, Lafita J, Petrina E, Argüelles I. Composición corporal y obesidad. An Sist Sanit Navar. 2002; 25(1):91-102.

- 13) Aristizábal JC, Restrepo MT, Estrada A. Evaluación de la composición corporal de adultos sanos por antropometría e impedancia bioeléctrica. *Biomédica*. 2007; 27(2):216-4.
- 14) Lee SY, Gallagher D. Assessment methods in human body composition. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2008; 11(5):566-572.
- 15) Campillo JE, Carmena R, Casanueva F, Durán S, Fernández-Soto ML, Formiguera X, Ríos MS. Consenso SEEDO 2000 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Med Clin (Barc)* 2000; 115(15): 587-597.
- 16) Muñoz R, Escalona A. Duodenal-jejunal bypass liner to treat type 2 diabetes mellitus in morbidly obese patients. *Curr Cardiol Rep*. 2014; 16(3):454.
- 17) Gómez-García A, Nieto-Alcantar E, Gómez-Alonso C, Figueroa-Nuñez B, Álvarez-Aguilar C. Parámetros antropométricos como predictores de resistencia a la insulina en adultos con sobrepeso y obesidad. *Aten Primaria*. 2010; 42(7):364-371.
- 18) del Ángel MD, Garro AJ, Cerón ME. Índice de masa corporal y su relación con hiperglucemia en Unidades de Medicina Familiar del IMSS de la zona Tlalnepantla de la Delegación Estado de México Oriente. *Rev Hosp Gral Quebrada* 2003; 2(1):18-20.
- 19) Guerrero R, Rodríguez M. Hypertriglyceridemia is associated whit development of metabolic glucose disorders, irrespective of glucose and insulin levels: a 15-year follow-up study. *Eur. J. Intern. Med*. 2014; 25(3):265-9.
- 20) Valdés S, Botas P, Delgado E, Cadórniga FD. Riesgo de mortalidad en diabetes diagnosticada, diabetes no diagnosticada y prediabetes en población adulta española. Estudio Asturias 1998-2004. *Revista española de cardiología. Rev Esp Cardiol*. 2009; 62(5):528-534.
- 21) Paz Romero R, Fuentes Cuevas MD, Nuñez Hernández JA. Prevalencia de prediabetes en adultos de la comunidad de Pueblo Nuevo, Acambay en el periodo de agosto 2011 a julio de 2012. *Rev Med Inv* 2013; 1(2):58-62
- 22) Serrano R, García-Soidán FJ, Díaz-Redondo A, Artola S, Franch J, Díez J, et al. Estudio de cohortes en atención primaria sobre la evolución de sujetos con prediabetes (PREDAPS): Fundamentos y metodología. *Rev Esp Salud Públ*. 2013; 87(2):121-135.
- 23) Ortiz-Contreras E, Baillet-Esquivel LE, Ponce-Rosas ER, Sánchez-Escobar LE, Santiago-Baena G, Landgrave-Ibáñez S. Frecuencia de “riesgo elevado de desarrollar diabetes” en pacientes de una clínica de medicina familiar. *Aten Fam*. 2013; 20(3):77-80.

- 24) Monreal Escalante E, Medina Cerda E, Vargas Morales JM, Martínez Zuñiga R, Díaz Gois A, Ortiz Villalobos G, et al. Prevalencia de prediabetes en jóvenes aspirantes a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. 2009; 34(1):126.
- 25) Baena-Díez JM, Bermúdez-Chillida N, Mundet X, del Val-García JL, Muñoz MÁ, Schröder H. Glucemia basal alterada y riesgo de diabetes mellitus a los 10 años. Estudio de cohorte. *Med Clin*. 2011; 136(9):382-5.
- 26) Malagón MC, Vargas JI, Peralta DE, Salinas CA. Progresión de prediabetes a diabetes mellitus tipo 2 en mexicanos. Evaluación en una cohorte. *Gac Méd Mex*. 2009; 145(4):269-72.
- 27) Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, Li X, Orho-Melander M, Hara M, Hinokio Y, et al. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nature genetics*. 2000; 26(2):163.
- 28) Omori S, Tanaka Y, Takahashi A, Hirose H, Kashiwagi A, Kaku K, et al. Association of CDKAL1, IGF2BP2, CDKN2A/B, HHEX, SLC30A8, and KCNJ11 with susceptibility to type 2 diabetes in a Japanese population. *Diabetes*. 2008; 57(3):791-5.
- 29) Gloyn AL, Weedon MN, Owen KR, Turner MJ, Knight BA, Hitman G, et al. Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic β -cell KATP channel subunits Kir6. 2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003; 52(2):568-72.
- 30) Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, et al. The common PPAR γ Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nature genetics*. 2000; 26(1):76-80.
- 31) Hayes MG, Pluzhnikov A, Miyake K, Sun Y, Ng MC, Roe CA et al. Identification of type 2 diabetes genes in Mexican American through genome-wide association studies. *Diabetes*. 2007; 56(12):3033-44.
- 32) Florez JC, Price AL, Campbell D, Riba L, Parra MV, Yu F, Duque C, Saxena R, Gallego N, Tello-Ruiz M, Franco L. Strong association of socioeconomic status with genetic ancestry in Latinos: implications for admixture studies of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2009; 52(8):1528-36.
- 33) Pullinger CR, Goldfine ID, Tanyolaç S, Movsesyan I, Faynboym M, Durlach V, et al. Evidence that an HMGA1 gene variant associates with type 2 diabetes, body mass index, and high-density lipoprotein cholesterol in a Hispanic-American population. *Metab Syndr Relat Disord*. 2014; 12(1):25-30.

- 34) Garant MJ, Kao WL, Brancati F, Coresh J, Rami TM, Hanis CL, Boerwinkle E, Shuldiner AR. SNP43 of CAPN10 and the risk of type 2 diabetes in African-Americans. *Diabetes*. 2002; 51(1):231-7.
- 35) Tan JT, Nurbaya S, Gardner D, Ye S, Tai ES, Ng DP. Genetic variation in KCNG1 associates with fasting glucose and β -cell function. *Diabetes*. 2009; 58(6):1445-9.
- 36) Staiger H, Machicao F, Kantartzis K, Schäfer SA, Kirchhoff K, Guthoff M, et al. Novel meta-analysis-derived type 2 diabetes risk loci do not determine prediabetic phenotypes. *PLoS One*. 2008; 3(8):e3019.
- 37) Sartorius T, Staiger H, Ketterer C, Heni M, Machicao F, Guilherme A, Grallert H, Schulze MB, et al. Association of common genetic variants in the MAP4K4 locus with prediabetic traits in humans. *PLoS One*. 2012; 7(10):1-10.
- 38) Feng N, Ma X, Wei X, Zhang J, Dong A, Jin M, Zhang H, Guo X. Common variants in PERK, JNK, BIP and XBP1 genes are associated with the risk of prediabetes or diabetes-related phenotypes in a Chinese population. *Chin Med J*. 2014; 127(13):2438-44.
- 39) Zyriax BC, Salazar R, Hoepfner W, Vettorazzi E, Herder C, Windler E. The association of genetic markers for type 2 diabetes with prediabetics status- Cross-Sectional data of a diabetes prevention trial. *PLOS One*. 2013; 8(9) e75807.
- 40) Rauhio A, Uusi-Rasi K, Nikkari ST, Kannus P, Sievänen H, Kunnas T. Association of the FTO and ADRB2 genes with body composition and fat distribution in obese women. *Maturitas*. 2013; 76(2): 165-171.
- 41) Mehanna ET, Abo-Elmatty DM, Ghattas MH, Mesbah NM, Saleh SM. Apelin rs2235306 polymorphism is not related to metabolic syndrome in Egyptian women. *Egypt j med hum genet*. 2015; (16)35:40.
- 42) Franks PW, Christophi CA, Jablonski KA, Billings LK, Delahanty LM, Horton ES, Knowler WC, Florez JC, Diabetes Prevention Program Research Group. Common variation at PPARGC1A/B and change in body composition and metabolic traits following preventive interventions: the Diabetes Prevention Program. *Diabetologia*. 2014; 57(3):485-90.
- 43) SIGMA type 2 diabetes Consortium, William AL, Jacobs SBR, Moreno-Macias H, Huerta-Chagoya A, Churchhouse C et al. Sequence variants in SLC16A11 are a common risk factor for type 2 diabetes in Mexico. *Nature*. 2014; 506(7486):97-101.
- 44) Rosas J, Calles J, Friege F, Lara E. Consenso de prediabetes. Documento de posición de la ALAD. *Rev ALAD*. 2009; 17(4):146-58

- 45) Herman WH, Cohen RM. Racial and ethnic differences in the relationship between HbA1c and blood glucose: implications for the diagnosis of diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97(4):1067-72.
- 46) Kim CH, Kim HK, Kim EH, Bae SJ, Choe J, Park JY. Risk of progression to diabetes from prediabetes defined by HbA1c or fasting plasma glucose criteria in Koreans. *Diabetes Res Clin Pr.* 2016; (118):105-111.
- 47) Chan CL, Pyle L, Newnes L, Nadeau KJ, Zeitler PS, Kelsey MM. Continuous glucose monitoring and its relationship to hemoglobin A1c and oral glucose tolerance testing in obese and prediabetic youth. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 100(3):902-10.
- 48) Cano JM, Hernández JC, Mayo H, León XB. Prediabetes y diabetes sin asociación con obesidad en jóvenes mexicanos. *Arch Latinoam Nutr.* 2013; 63(2):148-156.

X. ANEXOS

X. 1. Carta de consentimiento informado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE MEDICINA
CENTRO ESTATAL DE LA TRANSFUSIÓN SANGUÍNEA

Clave F-CCI-01

Edición 0

Emisión 14 04 2014

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Página 1 de 4

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

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)*

Autorizó

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

Este documento es propiedad de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y del Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea. Prohibida su reproducción parcial o total sin autorización



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 Autónoma 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 anomalías 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 su fracciones para futuros estudios, bioquímicos ó 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 ó 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

X. 2. Registro de datos clínicos, bioquímicos y de somatometría



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE MEDICINA
CENTRO ESTATAL DE LA TRANSFUSIÓN SANGUÍNEA

Clave F-RD-01

Edición 0

Emisión 14 04 2014

Página 1 de 3

REGISTRO DE DATOS CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS Y
DE SOMATOMETRÍA

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

REGISTRO DE DATOS CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS Y DE SOMATOMETRÍA

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)*

Autorizó

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



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE MEDICINA
CENTRO ESTATAL DE LA TRANSFUSIÓN SANGUÍNEA

Clave F-RD- 01

Edición	0
Emisión	14 04 2014
Página 2 de 3	

REGISTRO DE DATOS CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS Y DE SOMATOMETRÍA

Nombre: _____ Fecha: _____
 Edad: _____ HI: _____ HT: _____
 Código: _____

Diámetro				
Cintura:	Cadera:	Brazo no dominante:	Muñeca no dominante:	Cuello:
Antropometría				
Talla:	Peso:	Act. física		
Composición corporal:				
% de Grasa total:	Masa Muscular Total:	Kcal:		
Brazo Izq:	Brazo Izq:	Edad Metabólica:		
Brazo Der:	Brazo Der:	% Agua:		
Pierna Der:	Pierna Der:	Índice de Grasa visceral:		
Pierna Izq:	Pierna Izq:	Masa ósea:		
Tronco:	Tronco:			

Tensión Arterial Sistólica	TA Diastólica	Pulso manual:
-----------------------------------	----------------------	----------------------

Parámetros bioquímicos basales		
Glucosa en ayuno	Insulina en ayuno	Índice Homa
TSH	Adiponectina	Leptina
T4 Libre	Anticuerpos anti TPO	Índice Adip/Lep
HBA1c	25 (OH) D	Colesterol total
Colesterol (LDL)	Colesterol (HDL)	Triglicéridos
Número de alícuotas obtenidas:		
Suero	Plasma	Fracción celular nucleada

Este documento es propiedad de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y del Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea. Prohibida su reproducción parcial o total sin autorización



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE MEDICINA
CENTRO ESTATAL DE LA TRANSFUSIÓN SANGUÍNEA

Clave F-RD-01

Edición 0

Emisión 14 04 2014

Página 3 de 3

REGISTRO DE DATOS CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS Y
DE SOMATOMETRÍA

Nombre y firma de personal participante

_____	Actividad _____
_____	Actividad _____
_____	Actividad _____
_____	Actividad _____
_____	Actividad _____
_____	Actividad _____
_____	Actividad _____
_____	Actividad _____
_____	Actividad _____
_____	Actividad _____
_____	Actividad _____
_____	Actividad _____
_____	Actividad _____
_____	Actividad _____

X.3.DESCRIPCIÓN DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

X. 3. 1. Toma de muestra

A las personas como candidato a donador se les hizo la invitación para participar en el proyecto y se les explicó en que consiste el protocolo. Si decidían participar se les tomo la muestra de sangre en un tubo sin anticoagulante y otra muestra en un tubo con anticoagulante y que firmaran la carta de consentimiento informado. Posteriormente se realizaron 10 alícuotas en criotubos de 2 ml; del tubo con suero se realizaron las alícuotas del 1 al 5 y del tubo con anticoagulante del 6 al 8 contenían plasma, la alícuota 9 sangre total para la determinación de HbA1c y el tubo 10 leucocitos. Para realizar las alícuotas los tubos con y sin anticoagulante se centrifugaron a 3000 rpm por 5 min. Con el remanente se realizaron las alícuotas y la fracción celular. Todos los microtubos fueron previamente etiquetados y las alícuotas se mantuvieron a -80°C; para posteriormente realizar las pruebas bioquímicas y extracción de DNA.

Todos los tubos son etiquetados con folio del 001-310 antes de ser utilizados y se realizó una base de datos; dependiendo del folio que le pertenecía a cada persona en la base de datos se agregaba el nombre, la fecha en que se realizaron las alícuotas y el nombre de quien las realizó.

X. 3. 2. Somatometría

Talla: esta se tomó con el estadímetro-bascula BAME (mod. D.G.N. 2412 cap. 140 kg). El procedimiento consiste en que el participante se coloque de espaldas, con la cabeza recta, con pies y talones juntos y sin zapatos. El estadímetro cuenta con una escuadra y esta se desliza una vez que se le ha pedido al participante que inhale y mantenga la respiración para la toma de talla, para que así la escuadra tope con el punto más elevado del cráneo formando un ángulo recto. El dato se reportó en el “Registro de datos clínicos, bioquímicos y de somatometría”.

Circunferencia de Cintura: para realizar esta medición se utilizó la cinta métrica Lufkin® Executive Thinline W606PM. A cada uno de los participantes se le proporciono un camisón de hospitalización y se le pidió que se lo colocara en el lugar de su ropa interior. Se le pidió al participante que mantuviera una posición erguida, con los brazos cruzados sobre el pecho y los pies juntos. Se localizó y marco los puntos del borde costal y la cresta iliaca, medir la distancia entre ellos y marcar el punto medio donde se haría la medición de circunferencia de la cintura. Se le pidió al participante a colocar los brazos a un costado e inspire dos veces, para que la medición se realice en la espiración. La medición se realizó dos veces para confirmar el dato. Los datos se reportaron en el formato “Registro de datos

clínicos, bioquímicos y de somatometría”. Al final borrar las marcas con pluma que se le realizaron al participante.

Circunferencia de cadera: para realizar esta medición se utilizó con la cinta métrica Lufkin® Executive Thinline W606PM. A cada uno de los participantes se le proporciono un camión de hospitalización y se le pidió que se lo colocara en el lugar de su ropa interior. Se le pidió al participante que mantuviera una posición erguida, con los brazos cruzados sobre el pecho y los pies juntos. Se palpo el hueso trocánter en ambos costados del participante, colocándose a un lado del participante se posiciono la cinta métrica alrededor de la cadera de tal manera que pase por los trocánteres y la sínfisis del pubis, observando que ésta quede en paralela al piso (cinta derecha). La medición se realiza por duplicado para confirmar el dato. El resultado se reportó en “Registro de datos clínicos, bioquímicos y de somatometría”.

Peso y composición corporal: se utilizó un monitor corporal Tanita (modelo BC-568) donde al participante se le pidió quitarse los zapatos y calcetines, cualquier objeto de metal o que pudiera ser innecesario, para no generar mayor peso y así un error en la medición para determinar la composición corporal. A todos se les peso en ropa interior y bata para no generar impacto en la medición. Los resultados que arroja la tanita son: peso, porcentaje de grasa total y de cada una de las extremidades (brazo derecho, brazo izquierdo, pierna derecha, pierna izquierda, y tronco), % de agua, grasa visceral, % masa ósea, % de musculo y de cada una de las extremidades. Para asegurarse de la precisión de los datos se debe:

- Quitar los calcetines o medias y asegurarse de que los pies estén limpios antes de subirse a la báscula.
- A los participantes se les peso en ropa interior y bata quirúrgica.
- Asegurarse de alinear los talones correctamente con los electrodos en la báscula. Aun si los pies son demasiado grandes se consiguen lecturas exactas.
- Las mujeres embarazadas solamente podrán utilizar la función de peso.
- Pida al participante retire cualquier accesorio metálico y no metálico, (aretes, anillos, cinturones, etc.).

Modo de peso.

Para cambiar el indicador de las unidades se usa el botón contenido sobre el dorso de la balanza. Si el modo de peso esta programado en libras, automáticamente la programación de altura se establecerá en pulgadas. Igualmente, si se selecciona en kilogramos, la altura estará en centímetros.

Ajuste fecha y hora.

Mantenga pulsando el botón de reloj durante 3 segundos para encender la unidad.

Pulse los botones ▲ o ▼ para ajustar el año y después pulse el botón SET. La unidad emitirá un pitido para confirmar.

Para ajustar el mes pulse los botones ▲ o ▼, después pulse el botón SET.

Para ajustar el día pulse los botones ▲ o ▼, después pulse el botón SET.

Pulse los botones ▲ o ▼ para ajustar la hora y después pulse el botón SET; de igual manera para los minutos.

La unidad emitirá dos pitidos para confirmar la programación, después la unidad se apagará automáticamente.

Datos personales

Podrá realizar mediciones sólo si ha introducido sus datos en una de las memorias de datos personales o en el “modo invitado”.

Pulsar el botón de Configurar para encender la unidad. El aparato emitirá un pitido para confirmar la puesta en marcha, se mostrarán los números de las teclas personales (1, 2, 3, 4) y la pantalla destellará.

Pulse los botones ▲ o ▼ para seleccionar una tecla personal, pulsar el botón de Configurar.

Ajuste de cumpleaños (año, mes, día) utilizando los botones ▲ o ▼. Pulse el botón SET para confirmar en cada programación.

Selección de hombre o mujer utilizando los botones ▲ o ▼, después pulse el botón SET.

Especifique la estatura utilizando los botones ▲ o ▼ para especificar la altura y después el botón SET.

Para utilizar la Ingestión Diaria de Calorías (DIC) correctamente, se necesita configurar el nivel de actividad. Utilizar los botones ▲ o ▼ para especificar el nivel de actividad.

Nivel 1: estilo de vida inactivo (poco o ningún ejercicio).

Nivel 2: estilo de vida moderadamente activo (ejercicio de poca intensidad en ocasiones).

Nivel 3: adulto que participa en actividades físicas intensas. Nota: “Atleta” se define como una persona que realiza una actividad física intensa aproximadamente 10 horas a la semana y que tiene un ritmo cardiaco en reposo de aproximadamente 60 pulsaciones por minuto o menos. La definición de Tanita de un atleta incluye individuos “en forma de por vida”, que se han mantenido en forma durante años pero que actualmente hacen ejercicio menos de 10 horas a la semana. La función de monitor de grasa corporal no está diseñada para embarazadas, atletas profesionales o culturistas.

Medición corporal

Con ayuda de la punta del pie, apriete su tecla personal preprograma. La pantalla del monitor mostrara 0.0. Ahora apriete los electrodos de mano, agárrelos con los brazos rectos hacia abajo y súbase a la

plataforma. Poner los brazos a un costado y esperar a que se haya completado la medición, no tocar las piernas o cualquier parte del cuerpo con los brazos o con las manos. Las mediciones aparecerán en el siguiente orden:

- Grasa corporal total (%), grasa corporal-brazo izquierdo, grasa corporal-brazo derecho, grasa corporal-pierna derecha, grasa corporal-pierna izquierda y grasa corporal-parte del torso.
- Masa muscular total, masa muscular-brazo izquierdo, masa muscular-brazo derecho, masa muscular-pierna derecha, masa muscular-pierna izquierda, masa muscular-parte del torso.
- Peso
- % de agua corporal
- Masa ósea
- Grasa visceral
- DCI y edad metabólica

Todos los datos obtenidos se registraron en la hoja de “Registro de datos clínicos, bioquímicos y de somatometría”.

X. 3. 3. Presión arterial

Se utilizó el Monitor IntelliSense de Uso Profesional HEM-907XL (OMRON). Las partes del equipo son: Monitor, Adaptador de corriente y Brazaletes estandarizado con tubo de aire. El brazaletes que se deberá de utilizar dependerá de la circunferencia del brazo:

Circunferencia del brazo	Brazaletes a utilizar
17 a 22 cm	PEQUEÑO
22 a 32 cm	MEDIANO
32 a 42 cm	GRANDE
42 a 50 cm	EXTRA GRANDE

1. Verifique que el equipo esté completo, que el tubo de aire este íntegro (sin agujeros) y que el brazaletes se encuentre limpio y funcional (costuras cerradas y Velcro conservado).
2. Conecte el tubo de aire a la Unidad principal (base lateral derecha) y al brazaletes.
3. Conecte el adaptador de corriente primero en el monitor (base lateral izquierda) y posteriormente a la toma de electricidad.
4. Pulse en el monitor el botón “ON/OFF” para encender el equipo.
5. Girando el selector “MODE”, establezca la opción “SINGLE” (Ver Figura 1).
6. Girando el mando “P-SET” (Nivel de insuflación), coloque en la opción “AUTO”

7. Seleccione el brazo para colocar el brazalete, y que el sitio para colocar el acceso venoso debe ser contrario a la mano dominante.
 8. Coloque la mano del brazo seleccionado con la palma hacia arriba.
 9. Seleccione el brazalete según la circunferencia del brazo del participante.
 10. Con el brazalete abierto, alinear la marca de posición arterial con la arteria braquial. Puede percibir el pulso palpando sobre el tercio interno de la fosa cubital.
 11. Utilizando ambas manos, envuelva el brazalete alrededor del brazo y asegure con firmeza el Velcro. Si se hace adecuadamente, el brazalete quedará a la altura del corazón.
 12. Mida manualmente la frecuencia cardiaca palpando el pulso o auscultando al participante, con el objetivo de comparar con el registro del monitor (estos valores deben ser iguales).
 13. Presione el botón “START” para iniciar la medición (POR NINGÚN MOTIVO PRESIONE EL BOTÓN DE INICIO SI EL BRAZALETE NO ESTA CERRADO)
 14. El brazalete insuflará rápidamente para después des-insuflar progresivamente, arrojando un resultado en el monitor de presión arterial sistólica “SYS” y diastólica “DIA” en unidades de medida de mmHg. PRESTE ATENCIÓN EN NO CONFUNDIR EL PULSO (latidos por minuto “BPM”) CON LA PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA. No olvide comparar el pulso que registro con el resultado del monitor.
 15. Registre en el formato de “Registro de datos clínicos, bioquímicos y de somatometría” inmediatamente los valores del monitor (los mismos permanecerán máximo 5 minutos y la pantalla se apagará automáticamente si está inactivo).
 16. Pulse el botón “ON/OFF” para apagar el equipo.
 17. Retire el brazalete sin quitar el tubo de aire y la corriente eléctrica, pues el procedimiento para tomar la presión arterial se repetirá en 2 ocasiones más.
 18. Un minuto antes de completar el intervalo previo, iniciar a colocar el brazalete. Proceder a tomar la segunda lectura.
 19. Al finalizar los registros necesarios, retire el tubo de aire del brazalete y el monitor (evite doblar el sistema) así como el adaptador de corriente del monitor y la toma de corriente. Al finalizar la jornada de trabajo se deberá limpiar con alcohol desinfectante.
- Los valores obtenidos se reportan en el formato “Registro de datos clínicos, bioquímicos y de somatometría”, registrando con números arábigos y legibles los valores obtenidos, fecha, nombre y firma del personal que realiza el procedimiento.

X. 3. 4. Glucosa

La cuantificación de glucosa se realizó con el medidor de glucosa StatStrip Xpress, en el Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea (CETS) y en el Laboratorio de Medicina Transfusional de la Facultad de Medicina, UAEM, el resultado se registró en la hoja “Registro de datos clínicos, bioquímicos y de somatometría”.

Las tiras reactivas están diseñadas con un electrodo que mide los niveles de glucosa. La glucosa (azúcar) de la muestra de sangre se mezcla con el reactivo de la tira que produce una corriente eléctrica. La cantidad de la corriente eléctrica producida depende de la cuanta glucosa se encuentra en la sangre. El medidor de glucosa StatStrip junto con la tira reactiva para glucosa Nova StatStrip mide el nivel de glucosa en la sangre. El valor se indica en la pantalla del medidor. En el glucómetro se introduce una tira reactiva y posteriormente se coloca una gota de sangre sobre la hendidura de la tira y en pocos segundos en la pantalla del glucómetro aparecerá el resultado. En caso de que marque “Error” repetir la prueba. Esta prueba se debe realizar en cuanto se tenga la muestra de sangre, a partir del tubo con anticoagulante.

X. 3. 5. Colesterol, triglicéridos e insulina

El análisis de las muestras para colesterol total, HDL, LDL y triglicéridos se realizó en el Laboratorio del Centro Médico de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, con el analizador Roche-Hitachi 912.

Se utilizó una alícuota de suero de cada participante para las cuatro pruebas. El equipo cuenta con sus reactivos, calibradores y controles.

Para la determinación de la Insulina, se utilizó el equipo cobas 6000 Roche del Hospital Regional “Centenario de la Revolución Mexicana” ISSSTE.

X. 3. 6. Determinación de HbA1c

Se utilizó el analizador Labona Check HbA1c dispositivo de diagnóstico *In vitro* para medir la hemoglobina A1c a partir de muestras de sangre. Es el espectrofotómetro que analiza la fuerza de la luz reflejada desde el cartucho de prueba. Utiliza un ensayo de afinidad boro nato. El equipo del cartucho contiene reactivos, membranas filtradoras y una solución limpiadora. Este método se realizó en el Laboratorio de Medicina Transfusional de la Facultad de Medicina, UAEM.

Los reactivos están compuestos de los agentes de hemolisis y de hemoglobina precipitada y ácido boronio obteniendo el color cuando se une a la hemoglobina. Cuando la muestra de sangre se agrega

a los reactivos, toda la hemoglobina se precipita. El ácido borbónico conjuga la unión a la configuración cis-diol de la hemoglobina glucosilada. Una alícuota de la mezcla de la reacción es agregada al dispositivo de prueba. Algún exceso de mezcla de color es removido de la solución limpiadora. El precipitado es evaluado por la medida del azul (hemoglobina glucosilada) y el rojo (hemoglobina total); la proporción entre ellos será proporcional al porcentaje de HbA1c en la muestra de sangre.

Se tomó una alícuota con sangre total, que se destinó para determinar la HbA1c. Se toma un tubo capilar con ayuda de las pinzas y se llena con sangre, cuidando de no dejar burbujas. Este capilar se coloca en un tubo eppendorf que dentro contiene el reactivo/R1 (incubación), agitar el tubo aproximadamente por 5 segundos. Presionar el botón Guía y después el analizador comenzara el modo Guía con la voz de “Inicio incubación”.

Una vez que la incubación ha sido completada, se moverá a la pantalla “muestra de gota”. Agitar el reactivo/R1 y recolectar 25 µl y verterlo a gotas a la membrana del cartucho, no en un tiempo mayor de 15 segundos. Ir a la pantalla de “Lavado” con una voz de “solución de lavado gota” recolectar 25 µl de Reactivo/R2 y verter las gotas al centro del cartucho. Cuando el reactivo es vertido, asegurar que la punta de la pipeta no toque la membrana y no tenga burbujas. Una vez que el “lavado” es completado, la bandeja se abre con una voz de “Insertar cartucho”. Colocar el cartucho con el proceso de “lavado” dentro del lugar de instalación del cartucho.

Cuando se presiona el botón “medición” con un cartucho instalado en la bandeja, la bandeja se retira y comienza el proceso de medición. El resultado de la prueba es desplegado y la bandeja se abre al mismo tiempo. Después de checar el resultado de la prueba, remover el cartucho en la bandeja y presionar el botón “Siguiente” o “Imprimir” e ir a la opción “Modo de medición”.

X. 4. METODOLOGÍA COMPLEMENTARIA

X. 4. 1. Diseño de nucleótidos

La secuencia del gen SLC16A11 se obtuvo en la página de National Center for Biotechnology Information (NCBI) y el diseño de oligonucleótidos se realizó en el programa de PerlPrimer.

Para el diseño de los oligonucleótidos se consideraron los siguientes puntos:

- Tamaño de 20 a 25 nucleótidos
- Tm similar entre los oligonucleótidos, una diferencia no mayor a 2°C
- Secuencia en sentido 5´ a 3´
- Temperatura de fusión (Tm): 72°C

- Porcentaje de G/C en los oligonucleótidos entre 50-60%
- Evitar complementariedad consigo mismo, así como entre ellos.
- La ubicación debe permitir generar un producto de amplificación entre 150 y 600 pb.

X. 4. 2. ANÁLISIS DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Para analizar los pares de oligonucleótidos que anteriormente se diseñaron con el programa Perl Primer, y que corresponden para cada región del gen que se desea amplificar; se accedió a la página de NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

Figura 1. Evaluación de los oligonucleótidos por Primer-BLAST.

En la figura 1 a) se colocó la secuencia del oligonucleótido con dirección Forward de la región a amplificar. Figura 1 b) se colocó la secuencia del oligonucleótido con dirección reverse. Para saber si estas secuencias pueden amplificar en otra región del genoma en Database se selecciona Genome (reference assembly from selected organisms) (Figura 2 c) y en Organism *Homo sapiens* (Figura 2 d).

Figura 2. Evaluación de los oligonucleótidos por Primer-BLAST en el Genoma.

Figura 3. Ventana de Resultados.

Primer pair 1	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GAACCATAGTTCGAGGGAGGCA	23	62.25	52.17	7.00	0.00
Reverse primer	CTCCTGTCACCTCCTTC	17	52.79	58.82	3.00	0.00

Products on target templates

>NC_000017.11 Homo sapiens chromosome 17, GRCh38 Primary Assembly

product length = 293
 Features associated with this product:
[monocarboxylate transporter 11](#)
[monocarboxylate transporter 11 isoform X1](#)

Forward primer 1 GAACCATAGTTCGAGGGAGGCA 23
 Template 7043171 7043149

Reverse primer 1 CTCCTGTCACCTCCTTC 17
 Template 7042879 7042895

>NC_000015.10 Homo sapiens chromosome 15, GRCh38 Primary Assembly

product length = 2248
 Features flanking this product:
[477520 bp at 5' side: transmembrane channel-like protein 3](#)
[189316 bp at 3' side: RNA-binding protein MEX3B](#)

Reverse primer 1 CTCCTGTCACCTCCTTC 17
 Template 81853843C.C..... 81853827

Reverse primer 1 CTCCTGTCACCTCCTTC 17

Se muestran las pares de bases y la región que amplificaría con este par de oligonucleótidos. Se tomó cuidado de que no se amplificara un producto del mismo tamaño al de interés. Este mismo procedimiento se siguió para cada par de oligonucleótidos.

X. 4. 3. Síntesis de oligonucleótidos

Una vez confirmada la secuencia de los oligonucleótidos, se mandaron a sintetizar en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

X. 4. 4. Protocolo para curva de temperatura-cloruro de magnesio

Se rotularon 8 tubos de 1.5 ml para realizar las mezclas de PCR a diferentes concentraciones de MgCl₂ (0.5-4.0 mM). Posteriormente se rotularon 96 tubos para PCR, a 12 temperaturas diferentes: 54°C, 55.1°C, 56°C, 58°C, 61°C, 63.6°C, 64.8°C, 67.1°C, 69.2°C, 70.9°C, 71.4°C, 72°C. de cada una de las concentraciones de cloruro de magnesio. Para preparar las 8 mezclas diferentes para cada una de las concentraciones de cloruro de magnesio a evaluar, colocando las siguientes cantidades de reactivo como se muestra en la siguiente tabla:

Concentración MgCl ₂	Volumen	H ₂ O	MgCl ₂	dNTPs	Oligo sen (1)	Oligo antisen (2)	Buffer MgCl ₂	Taq Pol	DNA
0.5	100	98	2.1	2.6	2.6	2.6	13	1.3	7.8
1	100	95.8	4.3	2.6	2.6	2.6	13	1.3	7.8
1.5	100	93.6	6.5	2.6	2.6	2.6	13	1.3	7.8
2	100	91.5	8.6	2.6	2.6	2.6	13	1.3	7.8
2.5	100	89.3	10.8	2.6	2.6	2.6	13	1.3	7.8
3	100	87.1	13	2.6	2.6	2.6	13	1.3	7.8
3.5	100	85	15.1	2.6	2.6	2.6	13	1.3	7.8
4	100	82.8	17.3	2.6	2.6	2.6	13	1.3	7.8

Se vortexeó la mezcla y se colocaron 10 µl de ésta en cada uno de los 12 tubos de PCR. Posteriormente, se colocaron los tubos en el termociclador de forma horizontal, de menor a mayor concentración de cloruro de magnesio de (izquierda a derecha). Una vez colocados los tubos se eligió el programa GraPfinal en el termociclador Labnet MultiGene™ Gradient PCR Thermal Cycler TC9600-G-230V.

X. 4. 5. Purificación de ADN

Protocolo de purificación a partir de 100 µl de sangre

Catalogo No. CMG-101

Lote No. B100-0109035

Se utilizó Chemagic DNA Blood100 kit “Perkin Elmer”, los componentes son:

Reactivo	Cantidad
Perlas magnéticas	1.4 ml
Buffer de Lisis 1	12.5 ml
Buffer de unión 2	36 ml
Buffer de lavado 3	60 ml
Buffer de lavado 4	60 ml
Buffer de lavado 5	100 ml
Buffer Elución 6	10 ml

1. En un tubo para microcentrifuga de 1.5 ml, agregar 100 μ l de sangre y 125 de buffer de lisis 1. Mezclar de 8 a 10 pipeteados e incubar durante 5 min a temperatura ambiente.
2. En otro tubo para microcentrifuga de 1.5 ml, colocar 14 μ l de perlas magnéticas y 360 μ l de buffer de unión 2. Esta mezcla se agrega al primer tubo, mezclar con 10 pipeteados e incubar durante 5 min a temperatura ambiente.
3. Después de la incubación, colocar el tubo en la posición del imán durante 2 min.
4. Desechar sobrenadante y quitar el tubo de la posición de imán.
NOTA: el sobrenadante es oscuro y las perlas no se serán visibles, por lo tanto es importante para pipetear el sobrenadante hacerlo del lado opuesto del tubo donde está la fuerza magnética, para no aspirar las perlas magnéticas.
5. Añadir 600 μ l de buffer de lavado 3 y resuspender a fondo las perlas y pipetear el botón del pellet arriba abajo por 15 veces.
6. Colocar en la posición del imán por 1 min. Pasado el tiempo aspirar y decantar el sobrenadante.
7. Retirar de la posición de imán y agregar 600 μ l de buffer de lavado 4. Pipetear 15 veces. Colocar en la posición del imán por 1 min. Pasado el tiempo aspirar y decantar el sobrenadante.
8. Retirar el tubo de la posición del imán.
9. Volver a colocar los tubos en la posición del imán, añadir suavemente por las paredes del tubo 1 ml de buffer de lavado 5, teniendo cuidado de no destruir el sedimento por 90 segundos. Pasado el tiempo desechar el sobrenadante con mucho cuidado.
NOTA: la resuspensión del pellet en este paso (buffer de lavado 5), reduce el rendimiento final de ADN.
10. Quitar el tubo de la posición del imán.
11. Añadir 100 μ l de Buffer de elución 6 al tubo y resuspender a fondo, pipetando el sedimento hacia arriba y hacia abajo de 10 a 15 veces. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente, agitando ocasionalmente para incrementar la elución completa de ADN.
OPCIONAL: incubar la suspensión 5 minutos a 55°C, agitando ocasionalmente para incrementar la elución completa del ADN.
12. Colocar el tubo en la posición del iman durante 2 minutos.
13. Transferir el eluido que contiene el ADN purificado a un tubo limpio y rotulado.

X. 4. 6. Gel de agarosa

Se utilizó un gel de 250 ml, para lo cual se pesó 5 gr de agarosa (Gel al 2%) y se agregó a un matraz Erlenmeyer al que previamente se le añadió 250 ml de TBE 1X. Para que se disolviera se utilizó el horno de microondas, se calentó durante un minuto y medio, deteniendo cada 15 segundos para poder mezclar de manera circular hasta que la agarosa se disolviera de manera homogénea. Una vez disuelta la agarosa se añadieron 15 μ l de bromuro de etidio 1mg/ml. Se homogeneizo hasta aproximadamente a los 50°C. Se vertió en la base por una de las esquinas hacia donde se va a correr el producto, esto es para que se evite la formación de ondas en el gel. Se dejó gelificar aproximadamente por 20 min, pasado este tiempo se retiraron los peines con movimientos de derecha a izquierda y de atrás hacia adelante para facilitar la entrada de aire evitando que se genere vacío y esto ocasione ruptura en el gel.

X. 4. 7. Electroforesis en gel de agarosa

En el interior de la cámara de electroforesis marca Thermo Scientific Owl A2 horizontal, se agrega el TBE 1X, a manera que cubra el gel de agarosa que se colocará posteriormente en la cámara. Cuando se introduce el gel, éste debe ser de manera inclinada para evitar que se generen burbujas y queden atrapadas por debajo del gel. Para la integridad del ADN se colocan 4 μ l de ADN total y 3 μ l de azul de bromofenol (colorante).

Para el caso de productos de PCR se colocó 12 μ l (9 μ l de producto de PCR y 3 μ l de colorante). Para el caso de las muestras con digestión enzimática se colocaron 8 μ l totales; sin colorante debido a que el buffer de la enzima ya lo contiene.

La mezcla, se realizó en placas multipozo de 96 pozos o en su defecto un trozo de parafilm fijado a la mesa de trabajo. La colocación se inicia a partir del segundo pozo, cuidando de no introducir demasiado la micropipeta, lo anterior para evitar perforar el pozo y también evitar al momento de jalar burbujas al tomar la muestra, pues al colocarla en el pozo puede ocasionar que la muestra se salga del pozo. El primer Pozo se dejó para el marcador de peso molecular. Una vez colocadas todas las muestras en cada uno de los pozos se coloca la tapa de la cámara de electroforesis. Se programó a una hora a 180 volts. Pasado el tiempo se colocó el gel en el transiluminador de luz ultravioleta (BioDoc-it[®] 220 Imaging System, UVP[®] LLC), con ayuda de la luz blanca verificar de no dejar burbujas bajo el gel. Se cerró la puerta y se prende la luz UV, si la imagen era nítida se captura la imagen.

X. 4. 8. PCR PARA CADA PAR DE OLIGONUCLEÓTIDOS.

X. 4. 8. 1. SNP's rs117767867 y rs13342692

Con el par de oligonucleótidos LMTE_HumMCT11_1 y LMTE_HumMCT11_2 se buscaron las variantes V113I (rs117767867) y D127G (rs13342692); la PCR consta de las siguientes condiciones: etapa inicial de desnaturalización de 94°C por 5 min; posteriormente 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, 67.1°C 30 segundos para el alineamiento, 72°C 30 segundos para la extensión. Con un ciclo final a 72°C por 10 minutos. Se utilizó el termociclador Labnet MultiGene™ Gradient PCR Thermal Cycler TC9600-G-230V. Se prepara un volumen final de 40 µl, de los cuales se utilizan 9 µl para realizar la electroforesis y saber si amplifico la muestra, 10 µl para la digestión enzimática con HinII y 10 µl para la enzima Bsp143I.

X. 4. 8. 2. SNP rs75418188

Para la variante G340S (rs75418188) se utilizaron los oligonucleótidos LMTE_HumMCT11_5 y LMTE_HumMCT11_6 y las condiciones para la PCR fueron las siguientes: etapa inicial de desnaturalización de 94°C por 5 min; posteriormente 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, 55.1°C 30 segundos para el alineamiento, 72°C 30 segundos para la extensión. Con una extensión final a 72°C por 10 minutos. Se utilizó el termociclador Labnet MultiGene™ Gradient PCR Thermal Cycler TC9600-G-230V. Se prepara un volumen final de 30 ul, de los cuales se utilizan 9 µl para realizar la electroforesis y saber si amplifico la muestra, 10 µl para la digestión enzimática con KfII.

X. 4. 9. Digestión enzimática

X. 4. 9. 1. Digestión enzimática con HinII.

Thermo scientific FastDigest #FD0474 para 100 reacciones

1ml de buffer Fastdigest 10X

1ml de buffer Green Fastdigest

En un tubo para PCR, se agregan los siguientes reactivos siguiendo este orden:

Reactivo	Cantidad para 30 µl	Cantidad para 15 µl
Agua	17 µl	8.5 µl
Buffer Fastdigest 10X o buffer Green	2 µl	1 µl
Producto de PCR	10 µl (0.2 µg)	5 µl
Enzima FastDigest HinII	1 µl	0.5 µl

Se mezcla suavemente y se centrifuga. Incubar a 37°C por 2hrs. La inactivación es opcional, a 65°C por 5 min. Una vez pasado el tiempo se corrieron por electroforesis en gel de agarosa al 2%, a 180V por 1hr y 10 min. Si se observa en la imagen del gel de agarosa el corte con la enzima, significa que la persona no presenta el polimorfismo V113I (rs117767867), será un fragmento de 355 pb y otro fragmento de 139 pb. Se no se observa corte con la enzima, significa que la persona presenta el polimorfismo; de la misma manera será para las otras enzimas de restricción. Se diseñó de esta manera debido a que no se encontraban enzimas de restricción que realizaran corte en la ubicación del polimorfismo en la secuencia del gen SLC16A11.

X. 4. 9. 2. Digestión enzimática con Bsp143I.

Thermo scientific FastDigest #FD0784 para 40 reacciones

1ml de buffer Fastdigest 10X

1ml de buffer Green Fastdigest

En un tubo para PCR, se agregan los siguientes reactivos siguiendo este orden:

Reactivo	Cantidad para 30 µl	Cantidad para 15 µl
Agua	17 µl	8.5 µl
Buffer Fastdigest 10X o buffer Green	2 µl	1 µl
Producto de PCR	10 µl (0.2 µg)	5 µl
Enzima FastDigest Bsp143I	1 µl	0.5 µl

Se mezcla suavemente y se centrifuga. Incubar a 37°C por 1hr y 30 min. La inactivación es opcional, a 65°C por 20 min. Una vez pasado el tiempo se corrieron por electroforesis en gel de agarosa al 2%, a 180V por 1hr y 10 min.

Si existe corte con la enzima de restricción generara dos fragmentos, un fragmento de 395 pb y otro de 99 pb; lo que significa que la persona no presenta el polimorfismo D127G (rs13342692).

X. 4. 9. 3. Digestión enzimática con KfII.

Thermo scientific FastDigest #FD2164 para 20 reacciones

1ml de buffer Fastdigest 10X

1ml de buffer Green Fastdigest

En un tubo para PCR, se agregan los siguientes reactivos siguiendo este orden:

Reactivo	Cantidad para 30 μl	Cantidad para 15 μl
Agua	17 μ l	8.5 μ l
Buffer Fastdigest 10X o buffer Green	2 μ l	1 μ l
Producto de PCR	10 μ l (0.2 μ g)	5 μ l
Enzima FastDigest KfII	1 μ l	0.5 μ l

Se mezcla suavemente y se centrifuga. Incubar a 37°C por 2 hrs. La inactivación es opcional, con fenol/cloroformo. Una vez pasado el tiempo se corrieron por electroforesis en gel de agarosa al 2%, a 180V por 1hr y 10 min.

Si existe corte con la enzima de restricción generara dos fragmentos, un fragmento de 249 pb y otro de 210 pb; lo cual la persona no presentara el polimorfismo G340S (rs75418188).