



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

“Comparación De Los Biomarcadores, Insulina, 16s rRNA, Lipopolisacárido E Interleucina 6 Entre Sujetos
Prediabéticos Y Controles”.

T E S I S

Que Presenta

Diana Helena Ramírez Velasco

Para Obtener el Grado de
DOCTORA EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE

BIOMEDICINA MOLECULAR

Director de la Tesis

DRA. MARÍA TERESA ESTRADA GARCÍA

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN bajo la tutoría de la Dra. María Teresa Estrada García. Así mismo se contó con la asesoría del Dr. César Iván Elizalde Barrera, Dr. Alberto Francisco Rubio Guerra, Dra. Rosaura Hernández Rivas, Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete y el Dr. Michael Schnoor.

Tabla de Contenido

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	6
FISIOLOGÍA DE LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA	8
RESISTENCIA A LA INSULINA	10
LA INFLAMACIÓN CRÓNICA SUBCLÍNICA	11
Los índices HOMA (Homeostasis Model Assessment) para insulina y la funcionalidad de las células β como método para evaluar la resistencia a la insulina	15
Índice HOMA-IR y HOMA-B	15
JUSTIFICACIÓN	17
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	18
HIPOTESIS	18
OBJETIVOS	18
MATERIAL Y METODOS	19
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	22
RESULTADOS	23
Comparación del índice de masa corporal entre controles y sujetos con RI	23
Comparación de colesterol, triglicéridos, HDL y LDL entre controles y sujetos con RI	23
Comparación del índice de masa corporal entre controles y sujetos con RI	24
Características de la población de estudio	25
Comparación de la concentración del lipopolisacárido (LPS) entre controles y sujetos con RI.....	28
Comparación de las concentraciones del LPS entre controles y sujetos con prediabetes.	29
Correlación de colesterol, triglicéridos, HDL y LDL con la concentración de lipopolisacárido	30
Identificación de 16s rRNA en las muestras de sangre sujetos controles y con RI	32
Comparación de la concentración de 16s rRNA entre controles y sujetos con prediabetes.....	33
Correlación de colesterol, triglicéridos, HDL y LDL con la concentración de 16s rRNA.....	34
Correlación entre el índice HOMA _{IR/B} con la concentración de 16s rRNA y LPS	35
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIONES	39
PERSPECTIVAS	40
BIBLIOGRAFÍA	41

RESUMEN

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) es un problema de salud pública en México, el cual es el octavo país con mayor número de casos en el mundo. En México el 34% del gasto en salud pública corresponde al tratamiento de la diabetes mellitus y de este, el 84% es para el tratamiento de las complicaciones de esta enfermedad por lo que el enfoque debe cambiar hacia la medicina preventiva, lo cual no solo impactara en el gasto en salud, sino en la disminución de muertes por esta enfermedad. Por lo que es importante identificar de forma temprana a los sujetos en riesgo de desarrollar DMT2. Los factores de riesgo para la diabetes mellitus tipo 2 incluyen antecedentes heredofamiliares, obesidad, glucosa alterada en ayuno, resistencia a la insulina e hiperinsulinemia. La combinación de la resistencia a la insulina junto con la hiperinsulinemia compensatoria previene el desarrollo de una hiperglucemia, sin embargo, la RI incrementa el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares. Parece ser que el incremento en la concentración de 16s rRNA en sangre es un factor de riesgo no independiente para el desarrollo de DMT2. Además, se ha demostrado que la concentración de LPS se encuentra incrementada en sujetos diabéticos comparada con controles. Los objetivos fueron identificar sujetos con RI y prediabéticos, así como caracterizar los biomarcadores (16s rRNA y LPS) en estos sujetos y controles. Durante el periodo 2013-2019, se reclutaron 323 sujetos a los cuales se les tomaron sus datos antropométricos y se les determinaron sus concentraciones en sangre de glucosa, insulina, colesterol, triglicéridos, lipoproteínas de baja densidad, lipoproteínas de alta densidad (HDL), interleucina 6 (IL-6) e insulina. Así como se evaluó el HOMA-IR y B y el índice HOMA_{IR/B}. En un grupo mas pequeño de sujetos con RI, prediabéticos y controles se les determinó en sangre las concentraciones de LPS y del 16s rRNA por ELISA y PCR tiempo real, respectivamente. Mientras que las concentraciones del 16s rRNA y LPS no mostraron ninguna correlación en los sujetos con RI, en los prediabéticos se encontraron concentraciones significativamente más elevadas del 16s rRNA. Los 66 sujetos con RI tuvieron un IMC, un HOMA-B y un índice HOMA_{IR/B} significativamente mayor que los 257 controles. De manera interesante, estos sujetos con RI también tienen concentraciones significativamente mayores de triglicéridos y HDL. Los sujetos con HOMA-IR elevado muestran una correlación significativamente negativa con las concentraciones de IL6. Los resultados revelaron que los sujetos con RI presentan dislipidemias y un IMC mayor que los controles. Sugerimos que, si se toma la concentración de insulina de manera rutinaria y los sujetos con RI sean considerados prediabéticos, esto permitirá identificar un mayor grupo de sujetos en riesgo de desarrollar DMT2 y poder tomar medidas para que no desarrollen la enfermedad o al menos retrasen su aparición.

ABSTRACT

Type two diabetes is a public health problem in México and is the eight country with higher number of cases worldwide. In Mexico 34% of what is spent on diabetes mellitus health goes for treatment of diabetes complications, thus diabetes treatment should focus on prevention, which will not only might impact on health expend but as well, it will diminish the death toll due to diabetes. Therefore, the early identification of a subject in risk of developing DMT2 is important. Risk factors for diabetes mellitus type 2, include family history, obesity, impaired fasting glucose, insulin resistance and hyperinsulinemia. The combination between insulin resistance and compensatory hyperinsulinemia prevents hyperglycemia development, however, it increases the risk of presenting cardiovascular diseases. It seems that higher concentrations of 16s rRNA in blood is not an independent risk factor for DMt2 development. Furthermore, it has been demonstrated that LPS concentrations are higher in diabetic subjects than controls. The aims were to identify subjects with insulin resistance (IR) and prediabetics, as well to characterize the biomarkers (16s rRNA y LPS) among control subjects and with insulin resistance or prediabetes. During 2013-2019, 323 subjects were recruited to whom their anthropometric data were taken and their concentrations of blood glucose, insulin, cholesterol, triglycerides, lipoproteins of low and high density (HDL), interleukin 6 (IL-6) and insulin. Also, we evaluated HOMA-IR and -B and the HOMA_{IR/B} index. The blood concentrations of LPS and 16s rRNA were determined in a smaller group of subjects with IR, prediabetics and controls by ELISA and real time PCR, respectively. While 16s rRNA and LPS concentrations did not showed any correlation among IR subjects significantly higher concentrations of 16s rRNA were found among prediabetics. The 66 IR subjects had a higher, body mass index, HOMA-B and HOMA_{IR/B} index than the 257 controls. Interestingly IR subjects had significant higher concentrations of triglycerides and HDL. IR subjects had dyslipidemias and a higher BMI than controls. Suggesting that if insulin concentrations are determined routinely and IR subjects are considered prediabetics, these actions will allow to identify a higher number of subjects in risk of developing DMT2 and to take actions to stop or delay DMT2 disease development.

INTRODUCCIÓN

DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica causada por una deficiencia adquirida y/o hereditaria de la producción de insulina por el páncreas o por una alteración en la efectividad de la insulina. Es una enfermedad heterogénea, ya que la presentación y la progresión de la enfermedad puede variar considerablemente. (ADA, 2017)

La diabetes se clasifica en:

- Diabetes mellitus tipo 1: la cual es debido a una destrucción autoinmune de células β que conlleva a una deficiencia absoluta de insulina.
- Diabetes mellitus tipo 2: la cual es debido a una pérdida progresiva de la secreción de insulina por las células β y se acompaña de la resistencia a la insulina.
- Diabetes mellitus gestacional: es la diabetes que se diagnostica en el segundo o tercer trimestre del embarazo y que no se encontraba previamente.
- Otros tipos de diabetes: en este apartado se incluyen a los síndromes monogénicos de diabetes (MODY), enfermedades del páncreas exocrino (fibrosis quística) y diabetes inducida por fármacos (glucocorticoides).(ADA, 2017)

El mecanismo por el cual se desarrolla la diabetes mellitus aun no esta bien definida, sin embargo, se conoce que existe una disminución de la secreción de insulina por las células β pancreáticas y hay una resistencia a la insulina en tejidos periféricos. La diabetes mellitus tipo 2 se encuentra asociada principalmente a defectos en la secreción de insulina debido a una inflamación subclínica.(ADA, 2017)

DIABETES MELLITUS TIPO 2

La diabetes mellitus tipo 2 se ha convertido en un grave problema de salud pública en México, tanto por su alta morbi-mortalidad, además de que genera numerosas discapacidades en toda la población incluyendo la económicamente activa (Barraza-Llorens et al., 2015).

La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2012, mostró que en México la prevalencia de diabetes era de 9.4%, 2.4% por arriba de la encuesta de ENSANUT 2006 que fue del 7%. Los resultados de esta encuesta muestran que la vigilancia médica y la prevención de las complicaciones especificadas en la

NOM-015-SSA2-2010 para la prevención, el tratamiento y el control de la diabetes mellitus están lejos de alcanzarse. (“Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016,” 2016)

La transición de un estado de normogluemia hacia la prediabetes inicia con la presencia de la resistencia a la insulina y con una hiperinsulinemia compensatoria. En cuanto la hiperinsulinemia es incapaz de compensar la resistencia a la insulina, los niveles de glucosa incrementan, desarrollándose la diabetes mellitus tipo 2. (Villanueva-Sosa, Cordero-Franco, & Salinas-Martínez, 2015). La diabetes mellitus tipo 2 se diagnostica presentando una glucosa alterada al azar mayor a 200mg/dl o cuando en dos ocasiones el sujeto presenta una glucosa en ayuno mayor o igual a 126mg/dl, o una hemoglobina glucosilada mayor a 6.5% o cuando 2 horas después de la ingesta de 75 g de glucosa, esta se encuentra mayor o igual a 200mg/dl.

En México, como muestran los datos de ENSANUT 2012, la diabetes mellitus tipo 2 es una enfermedad que se ha incrementado debido a diversos factores: la falta de una detección oportuna, hasta el momento no se han atendido las causas ni se han reducido los factores de riesgo que desencadenan la enfermedad. Además, la diabetes tipo 2 produce numerosas complicaciones agudas y crónicas. En 2013, los costos implicados en la atención médica de la diabetes mellitus tipo 2 se estimaron en \$179,495.3 millones de pesos, donde el 87% de estos costos correspondieron a la atención médica y medicamentos asociados a las principales complicaciones de la enfermedad.

PREDIABETES

La prevalencia estimada de la diabetes mellitus tipo 2 en la ENSANUT no incluye aquellos sujetos quienes no han sido diagnosticados o están en alto riesgo de desarrollar la enfermedad. (Barraza-Llorens et al., 2015) La prediabetes se define como un incremento de los niveles séricos normales de glucosa pero que se encuentra por debajo del límite para ser considerado diabético. Los sujetos con prediabetes tienen un mayor riesgo para presentar diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares, estadísticas a nivel mundial refieren que el 5 al 10% de estos pacientes desarrollan diabetes anualmente y el 70% va a desarrollar diabetes mellitus tipo 2 durante su vida. (Villanueva-Sosa et al., 2015)

En 1997 y 2003 el Comité de Expertos en el Diagnóstico y Clasificación de Diabetes Mellitus reconoció a un grupo de individuos que no cumplía con los criterios diagnóstico, mencionados anteriormente para diabetes tipo 2, pero que sin embargo, sus niveles de glucosa estaban por arriba del límite normal y por debajo de los para el diagnóstico de diabetes tipo 2. (ADA, 2017) Este grupo de pacientes presentaban un incremento en

el riesgo para padecer diabetes mellitus y complicaciones vasculares. (Díaz, Cabrera, Orlandi, Araña, & Díaz-Horta, 2011)

La prediabetes se define como un estado metabólico en el cual los niveles de glucosa son mas altos de lo normal, pero no lo suficiente para realizar el diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2. Por lo que el diagnóstico de prediabetes se realiza cuando un sujeto presenta una glucosa en ayuno de 100mg/dl a 125mg/dl o una determinación de glucosa 2 horas después de la ingesta de 75 g de glucosa y que se encuentre en 140 - 199mg/dl o una hemoglobina glicosilada de 5.7% a 6.4%.(ADA, 2017)

FISIOLOGÍA DE LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA

La insulina es una hormona peptídica secretada por las células β de los islotes de Langerhans pancreáticos, contiene 51 aminoácidos y tiene un peso molecular de 5802 daltones. La insulina se encarga de mantener una concentración de glucosa en sangre de entre 70 a 100 mg/dl, facilitando el consumo celular de la glucosa por los tejidos, principalmente el hígado, el tejido adiposo y el músculo, regulando el metabolismo de los carbohidratos, de los lípidos y de las proteínas.(Wilcox, 2005)

En los sujetos sanos, la glucosa estimula las células β del páncreas para que se secrete insulina. La glucosa entra a la célula β pancreática por medio de los transportadores de glucosa (GLUT) tipo 2 (GLUT 2), incrementando la concentración de ATP cerrando los canales de ATP sensibles a K^+ , lo que resulta en una despolarización de la membrana de las células β pancreáticas y abriendo los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje; es precisamente la entrada del calcio a las células lo que desencadena la liberación de insulina.(Seino, Shibasaki, & Minami, 2011)

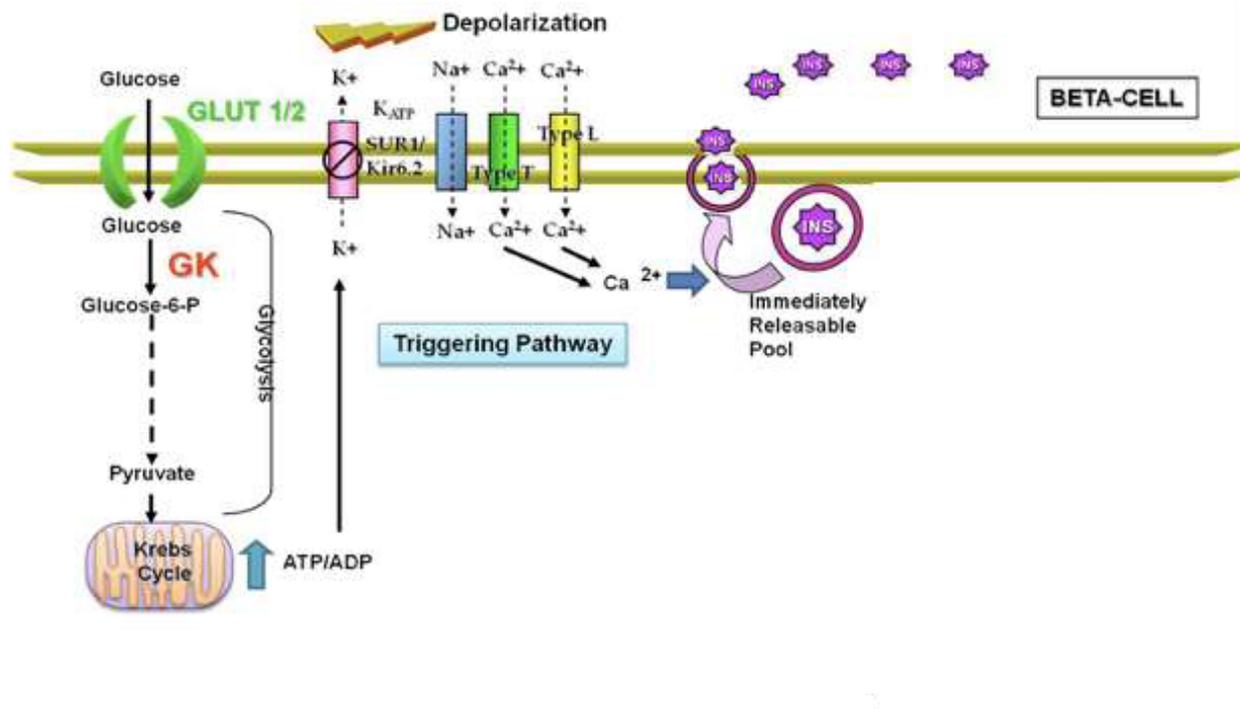


Figura1. Mecanismo de secreción de la insulina mediada por glucosa.(Lazo de la Vega Monroy & Cristina, n.d.)

Los receptores de la insulina están constituidos por dos subunidades extracelulares α , que contienen los sitios de unión de la insulina y dos subunidades intracelulares β que tiene una actividad de tirosina-quinasa. La unión de la insulina a su receptor activa a la tirosina-quinasa, resultando en una autofosforilación de los residuos de tirosina de la subunidad β , lo que provoca un cambio conformacional en el receptor exponiendo los sitios de unión para sus sustratos.(Najjar, 2003; Sesti, 2006) Hay 4 isoformas diferentes de las moléculas sustrato del receptor de insulina (ISR), las ISR1 y 2 son las que se encuentran relacionadas con el transporte de la glucosa al interior de la célula. (Najjar, 2003; Shaw, 2011) Una vez que el ISR se une al receptor de insulina, se fosforila en su residuo de tirosina, una vez fosforilado el IRS, se inician los eventos de señalización río abajo que finalmente lleva a la translocación de los transportadores de glucosa tipo 4 (GLUT 4) del citosol a la membrana plasmática, lo que permite la entrada de la glucosa al interior de la célula.

La vía de señalización de la insulina puede ser regulada por la acción de proteína tirosina fosfatasa 1B, la cual desfosforila al receptor de insulina, inhibiendo así su acción. La actividad de tirosina quinasa del receptor de la insulina es inhibida por el supresor de la señalización de citosina (SOCS, por sus siglas en ingles) 1 y 2. La expresión de las SOCS se encuentran incrementadas en los sujetos obesos e inducen la resistencia a

la insulina por inhibición de la actividad cinasa del receptor de insulina y también por competencia por el sitio de unión de las ISR.(States, 2014) La fosforilación de la tirosina es esencial para la activación de las proteínas ISR, el incremento en la fosforilación del residuo de serina en el receptor de la insulina disminuye la actividad de la tirosina-cinasa. Se ha observado de igual forma que la fosforilación de la serina (principalmente la serina 307) en los ISR se encuentran asociada a la resistencia a la insulina. (States, 2014)

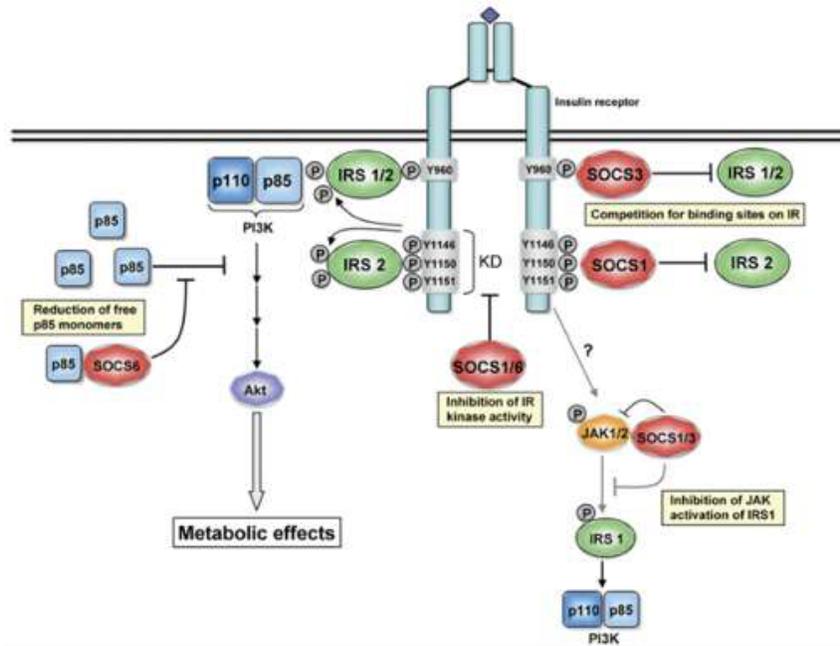


Figura 2. Mecanismos de regulación de la acción de la Insulina. (Galic, Sachithanandan, Kay, & Steinberg, 2014)

FACTORES IMPLICADOS EN LA PREDIABETES

Los factores de riesgo para la diabetes mellitus tipo 2 incluyen: antecedentes heredofamiliares, obesidad, síndrome metabólico, síndrome de ovario poliquístico, glucosa alterada en ayuno, curva de tolerancia a la glucosa alterada, así como resistencia a la insulina e hiperinsulinemia y alteración en la secreción de la insulina. De estos factores de riesgo, la resistencia a la insulina y la disfunción de la célula β son las principales anomalías fisiopatológicas en la prediabetes. (DeFronzo & Abdul-Ghani, 2011b)

RESISTENCIA A LA INSULINA

La resistencia a la insulina se define cuando órganos principalmente como el hígado, el tejido adiposo y el músculo presentan a una respuesta biológica disminuida ante una concentración normal o elevada de insulina (Chen, Chen, Wang, & Liang, 2015; Sesti, 2006; Wilcox, 2005) En etapas muy tempranas, hay un incremento compensatorio de las concentraciones de insulina. Aunque esta hiperinsulinemia puede

compensar la resistencia a la insulina en alguna de sus acciones biológicas, también en algunos tejidos en donde la sensibilidad a la insulina no ha sido afectada puede resultar en una sobreexpresión de sus acciones. (Govindarajan, Gill, Rovetto, & Sowers, 2006) La combinación de la resistencia a la insulina con la hiperinsulinemia compensatoria previene el desarrollo de una hiperglucemia, sin embargo, incrementa el riesgo de presentar enfermedades cardiovasculares.

La resistencia a la insulina es consecuencia de las alteraciones en la cascada de señalización, o puede ser causada por la presencia de anticuerpos contra la insulina o mutación en la proteína de insulina. Sin embargo, no son las únicas causas de las alteraciones en la señalización de la insulina, también pueden ocurrir mutaciones o modificaciones postraduccionales del receptor de insulina (ISR). La causa más común de la resistencia a la insulina se manifiesta a nivel celular a través de defectos post-receptor en la señalización de insulina, como es la hiperfosforilación de los residuos de Ser/Thr en las proteínas ISR. (Govindarajan et al., 2006; Gutiérrez Rodelo, Roura Guiberna, & Olivares Reyes, 2017)

Diversos agentes como las citocinas proinflamatorias, los ácidos grasos saturados, los aminoácidos, la endotelina 1, la angiotensina II y los estados de hiperinsulinemia incrementan la actividad de las cinasas, incluyendo varias isoformas de PKC, JNK, mTOR, PKA y MAPK que fosforilan a los ISR. (Gutiérrez Rodelo et al., 2017)

Actualmente se considera que dos vías por las que se induce la resistencia a la insulina son la mediada por los ácidos grasos libres (AGL) y la inducida por la inflamación crónica subclínica.

LA INFLAMACIÓN CRÓNICA SUBCLÍNICA

La inflamación es una respuesta fisiológica de protección del organismo, se presenta para controlar las agresiones físicas, químicas o biológicas y se caracteriza por un incremento en los niveles de citocinas proinflamatorias en la circulación o en los tejidos. (Gutiérrez Rodelo et al., 2017) La inflamación crónica es diferente de la aguda, la primera no está acompañada o inducida por algún proceso infeccioso y además no hay lesión tisular. (Sharma, 2011). La inflamación crónica de bajo grado es inducida por la presencia de patrones moleculares asociados a daño (DAMP, damage-associated molecular patterns) en la ausencia de una infección aguda. (Furman et al., 2019; Hotamisligil, 2006)

Se ha observado que la inflamación subclínica que asociada al síndrome metabólico se ha involucrado tanto en el inicio del síndrome como en la fisiopatología de sus complicaciones. (Pandey, Pandey, Pandey, & Pandey, 2014) Se ha descrito que el factor de necrosis tumoral (TNF), la interleucina 6 (IL-6) y la interleucina 1 β (IL-1 β), son efectores de inflamación y se mantienen presentes en el estado inflamatorio, sin embargo, no son la causa inicial de la inflamación. (De Luca & Olefsky, 2008)

El efecto de infecciones durante la vida de los individuos como citomegalovirus, virus de Epstein Barr, virus de la hepatitis C y otros agentes infecciosos en la disregulación del sistema inmune y la aparición de la inflamación crónica subclínica sigue siendo controversial. Sin embargo, se ha demostrado que la infección crónica con HIV cause senescencia del sistema inmune y se encuentra asociada a enfermedad cardiovascular y alteraciones musculoesqueléticas. Estas alteraciones son explicadas por la acumulación de lin T CD8+ senescentes que producen mediadores proinflamatorios. Los humanos han coevolucionado con diversas variedades de virus, bacteria y otros microorganismos, mientras que las infecciones crónicas aparentemente contribuyen a la inflamación crónica subclínica, es posible que no sean la causa principal.

Los receptores similares al receptor Toll (TLR) funcionan como receptores que reconocen a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS, por sus siglas en ingles). Estos receptores reconocen componentes bacterianos y virales y activan las vías de señalización inmunidad innata. Los TLR--4 son estimulados principalmente por LPS, aunque también se ha descrito su activación por los ácidos grasos. (De Luca & Olefsky, 2008; Sears & Kim, 2010) La estimulación de los TLR- 4 resulta en la activación de las vías de señalización de IKK β (inhibidor de I κ B) /NF κ B (el factor de transcripción nuclear kappa) y JNK (cinasa de tipo c-jun N-terminal cinasas) las cuales resultan en la secreción de citosinas proinflamatorias como son: IL- 1 β , IL- 6, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y a la proteína quimio atrayente de monocitos tipo 1 (MCP- 1).(De Luca & Olefsky, 2008; Sears & Kim, 2010; Shoelson, Lee, & Goldfine, 2006)

EL TNF- α es una citosina proinflamatoria, secretada principalmente por monocitos y macrófagos localizados en el tejido adiposo. La administración de TNF- α a adipocitos 3T3- L1, induce la activación de IKK β intracelular y reducen la fosforilación de las tirosinas del ISR-1.(McArdle, Finucane, Connaughton, McMorrow, & Roche, 2013) Mientras que la IL-6 es secretada por los adipocitos, el musculo esquelético y el hígado. Por lo tanto, se ha observado que la secreción de IL-6 se correlaciona con el índice de masa corporal (IMC) y promueve la fosforilación de la serina de los ISR, disminuyendo así la sensibilidad a la insulina. (McArdle et al., 2013)

Los lípidos en la Resistencia a la Insulina.

El incremento en suero de los ácidos grasos libres ha sido relacionado con anomalías en la vía de señalización de insulina, incluyendo la fosforilación de serina de los ISR, una reducción en la actividad de la cinasa fosfatidilinositol 3 (PI3) y un incremento en la activación de la proteína cinasa C (PKC)(Rhodes & White, 2002; Samuel, Petersen, & Shulman, 2010)

Los ácidos grasos libres al ser reconocidos por los TLR- 4 también activan la vía de señalización de NFκB tanto en los macrófagos y como en los adipocitos. (De Luca & Olefsky, 2008)

La microbiota y la resistencia a la insulina

El tracto gastrointestinal es el primer órgano que está expuesto a los componentes de la dieta, las dietas ricas en grasas saturadas han sido asociadas con una disminución en los niveles de la fosfatasa alcalina intestinal. Debido a que TLR-4 es un receptor que está involucrado en los efectos proinflamatorios del LPS, por lo que se ha sugerido que microbiota particularmente la bacteriana intestinal está relacionada con la resistencia a la insulina. (Ding & Lund, 2011; Malo et al., 2010) Hay evidencia de que una dieta rica en grasas produce un cambio en la composición de la microbiota, esta tipo de dieta también incrementa la permeabilidad del intestino, lo que conlleva a un incremento en los niveles circulantes de LPS. (Burcelin, Serino, Chabo, Blasco-Baque, & Amar, 2011; Sears & Kim, 2010)

La liberación de LPS a la circulación sistémica, tiene un impacto directo sobre varios órganos como el hígado, el pulmón, el tejido adiposo, el músculo esquelético y el corazón. Este antígeno bacteriano induce una reacción inflamatoria resultando en la resistencia a la insulina. Otras enfermedades, como la aterosclerosis se han asociado con una inflamación de bajo grado. Se ha demostrado que las bacterias en la cavidad oral correlacionan positivamente con marcadores de enfermedad cardiovascular. (Burcelin et al., 2011) Debido a lo anterior, se ha hipotetizado que la presencia de bacterias circulantes en un sujeto, puede ser uno de los pasos iniciales en la resistencia a la insulina y al desarrollo posterior de diabetes mellitus tipo 2.

El 16S rRNA está constituido de 9 regiones hipervariables, el grado de diversidad y homología es proporcional a la distancia filogenética. Por lo cual desde hace algunos años se utilizan estas regiones del 16S rRNA para identificar Phyla, Clases, Ordenes, Familias, Géneros y Especies bacterianas y de arqueas.

(Burcelin et al., 2011) En un estudio realizado por Amar et al. en 2011, se observó que la concentración de 16S rRNA en suero, al introducir este dato dentro de una escala de diferentes factores predictivos incrementaba la posibilidad de determinar si un sujeto tenía más riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2. Por lo que se infiere que la presencia de bacterias en sangre periférica puede ser un marcador de riesgo, tal vez no independiente, para desarrollar diabetes. (Amar, Serino, Lange, & Chabo, 2011)

Disfunción de la célula β Pancreática

En condiciones normales, la glucosa es el regulador más importante de la función de la célula β , ya que regula la transcripción génica de la insulina, promueve la biosíntesis de proinsulina y la secreción de la insulina por las células β . (Halban et al., 2014) La alteración en la secreción de la insulina debido a una disfunción de la célula β o pérdida de las células β , es clave en la patogénesis y en la progresión de la diabetes. La pérdida de células β y el deterioro progresivo de la funcionalidad de la célula β es una etapa temprana en la historia natural de la diabetes y es posible detectarla antes de realizar el diagnóstico de diabetes tipo 2. El tejido celular β se encuentra influenciado por un balance entre señales de proliferación y de apoptosis, el cual es modulado por factores de crecimiento, citocinas y hormonas. (Halban et al., 2014; Russo et al., 2014) Se han descrito mecanismos que conllevan a la disfunción de la célula beta entre ellos la glucolipotoxicidad y el estrés del retículo endoplásmico.

La glucolipotoxicidad

Cuando hay un incremento en la concentración de la glucosa y de los lípidos se sobrepasa la capacidad de oxidación de la mitocondria, lo que resulta en un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno. El incremento en la producción de la especies reactivas de oxígeno pueden inactivar factores de transcripción, lo que conlleva a que la célula no responda a la glucosa y almacene insulina. (Halban et al., 2014)

El estrés del Retículo Endoplásmico

El estrés del retículo endoplásmico inicia cuando la producción de insulina se incrementa, ya que incrementa la demanda de síntesis proteico en el retículo endoplásmico rugoso, lo que conlleva a un plegamiento inadecuado de las proteínas. Las proteínas mal plegadas por el retículo endoplásmico se acumulan o se liberan para su degradación. El incremento de estas proteínas activan al sistema UPR (del inglés, unfolded protein response,) el cual puede ocasionar la muerte celular. (Halban et al., 2014)

Anormalidades y Síndromes Clínicos Asociados con la Resistencia a la Insulina

Hasta el momento no se considera a la resistencia a la insulina como una enfermedad, solo como un trastorno fisiológico, pero tal vez en un futuro sí ya que incrementan el riesgo de presentar disfunción endotelial, elevación de marcadores proinflamatorios, dislipidemia e intolerancia a la glucosa. (G. Reaven, 2004) Además se ha observado que la resistencia a la insulina está asociada a un incremento de 1.5 a 2 veces en la incidencia de eventos cardiovasculares, con respecto a población que no tiene resistencia a la insulina. (DeFronzo & Abdul-Ghani, 2011a)

Los factores de riesgo cardiovasculares clásicos como son la edad, la hipoalfalipoproteinemia, la hipercolesterolemia, la presión arterial sistólica elevada y el tabaquismo, solo explican el 69% de los sujetos con enfermedad cardiovascular. En el estudio ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities) solo el 70% de los pacientes con incremento en el grosor de la intima-media presentaban dislipidemias o hipertensión u obesidad. Es muy probable que el resto de la población con engrosamiento de la intima carotídea media y de las enfermedades cardiovasculares sean atribuidos a la resistencia a la insulina. (Adeva Andany, Martínez Rodríguez, González Lucán, Fernández Fernández, & Castro Quintela, 2019; DeFronzo & Abdul-Ghani, 2011a; Ferrannini et al., 2007)

Los índices HOMA (Homeostasis Model Assessment) para insulina y la funcionalidad de las células β como método para evaluar la resistencia a la insulina.

El HOMA, es un modelo matemático utilizado para valorar la resistencia a la insulina (HOMA-IR) y la funcionalidad de las células β (HOMA-B), el cual fue descrito por primera vez en 1985 por Matthews et al. (Matthews et al., 1985; Russo et al., 2014; Tinahones, 2008) ecuación del HOMA está basada en la relación entre la producción hepática de glucosa y la secreción de insulina las células β . En un individuo sano, con un índice de masa corporal normal y sin antecedentes familiares de diabetes mellitus el HOMA-B se sitúa alrededor del 100% y el valor de corte para evaluar la resistencia a la insulina (HOMA-IR) es de 2.6.

Índice HOMA-IR y HOMA-B

Elizalde-Barrera (2017) durante su tesis doctoral en nuestro laboratorio desarrollo un índice HOMA-IR y el HOMA-B, el cual evalúa la interacción que existe entre la función pancreática y la resistencia a la insulina. En donde identificó un punto de corte de 1.35 p lo cual incremento de manera significativa el diagnóstico de los sujetos con prediabetes, con una sensibilidad de 91.7% y una especificidad de 78.6%. El índice

HOMA_{IR/B} representa la capacidad que presenta la célula beta para incrementar su función para compensar la resistencia a la insulina, si el índice disminuye la capacidad de compensación es menor. (Elizalde Barrera, Estrada García, & Rubio Guerra, 2015)

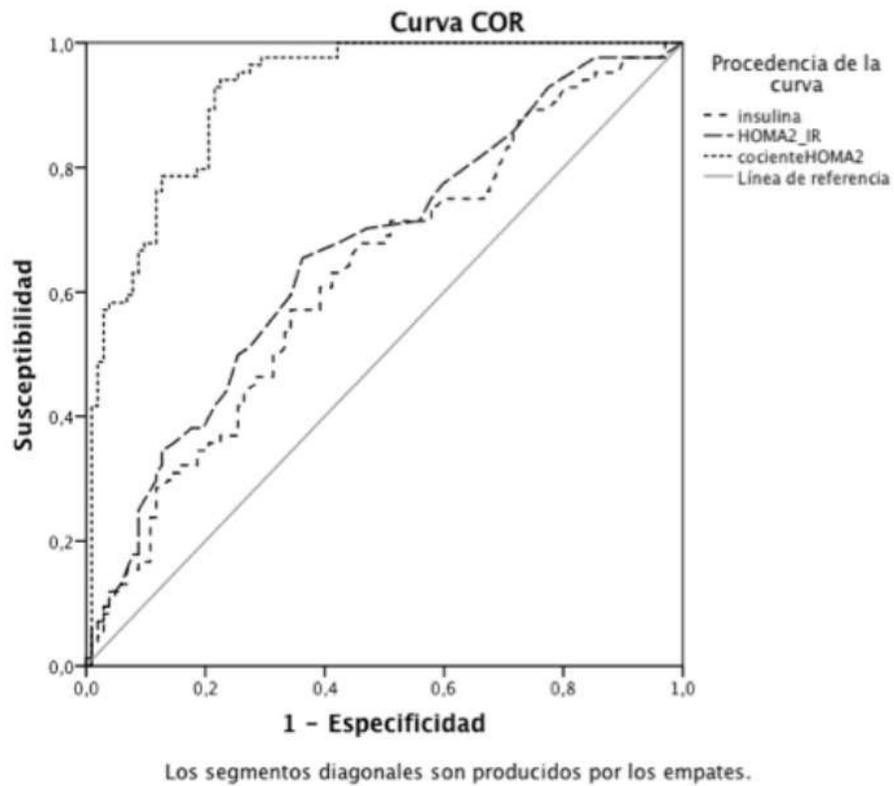


Figura 3: Comparación de las curvas ROC para las concentraciones de insulina, los índices HOMA, y el índice HOMA IR/B

JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus tipo 2 es uno de los principales problemas de salud pública en México. En la actualidad afecta tanto a la población económicamente activa como a los niños. Se estima que el costo anual de la atención de la diabetes mellitus en México es de aproximadamente de 3 872 millones de dólares por año (2016). Por lo tanto, es indispensable identificar a los sujetos que potencialmente desarrollen diabetes mellitus tipo 2 para implementar medidas preventivas y mejorar su calidad de vida. Se ha demostrado que la resistencia a la insulina es el evento fisiopatológico mas importante para el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 y además es un factor de riesgo para presentar dislipidemias, hipertensión y aterosclerosis. Debido a que la resistencia a la insulina juega un papel fundamental en el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2, es importante identificar de forma temprana a los sujetos con resistencia a la insulina antes de que desarrollen la enfermedad. Algunos estudios han mostrado que el incremento en la concentración de 16s rRNA en sangre es un factor de riesgo no independiente para el desarrollo de Diabetes Mellitus tipo 2, además se ha demostrado que la concentración de LPS se encuentra incrementada en sujetos diabéticos, pero se desconoce como se encuentran estos marcadores bacterianos tanto en sujetos con resistencia a la insulina como en prediabéticos. La caracterización de la relación entre el 16s rRNA y el LPS con la resistencia a la insulina en sujetos con diferentes factores de riesgo permitirá establecer su utilidad como biomarcador. La identificación de sujetos con resistencia a la insulina permitirá identificar un mayor número de sujetos con riesgo a desarrollar diabetes y enfermedades cardiovasculares y fortalecer las medidas de prevención para detener la pandemia de DMT2 que tenemos en México.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Las concentraciones de LPS, 16S e IL- 6 se encuentran incrementados en los sujetos con resistencia a la insulina y prediabéticos?

¿Los sujetos con resistencia a la insulina deben ser considerados prediabéticos?

HIPOTESIS

Las concentraciones de los marcadores bacterianos, 16s rRNA y LPS, así como la IL-6 se encuentran incrementados en los sujetos con resistencia a la insulina y los sujetos con resistencia a la insulina son prediabéticos

OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar sujetos con resistencia a la insulina y prediabéticos

Identificar los biomarcadores (16s rRNA y LPS) en sujetos controles, con resistencia a la insulina y prediabéticos.

Objetivo Específicos

1. Reclutar sujetos adultos que cumplan con los criterios de inclusión del estudio y acepten participar en el mismo.

Realizar la historia clínica de los sujetos, así como evaluar sus parámetros antropométricos.

Determinar colesterol, triglicéridos, HDL, LDL, glucosa e insulina en sueros de sujetos con resistencia a la insulina y sujetos controles.

2. Calcular los índices de HOMA-IR, HOMA-B mediante el software de la Universidad de Oxford y calcular el índice HOMA_{IR/B}.

3. Determinar por PCR-tiempo real de 16s rRNA de DNA aislado de sangre de total de sujetos con resistencia a la insulina y sujetos controles, así como en sujetos prediabéticos.

Estandarización de la detección del 16s rRNA.

Correlacionar la concentración de 16s rRNA con el grado de resistencia a la insulina.

4. Identificar la presencia de LPS en suero de sujetos con resistencia a la insulina, y sujetos controles y en sujetos prediabéticos.

Correlacionar la concentración de LPS con el grado de resistencia a la insulina.

5. Identificar la presencia de IL-6 en suero de sujetos con resistencia a la insulina y sujetos controles

MATERIAL Y METODOS

Población

Sujetos reclutados de la consulta externa y del servicio de hospitalización del Hospital General de Zona No. 30 del IMSS que cumplan los criterios de inclusión y que hayan aceptado participar en el estudio.

Diseño del Estudio

Estudio transversal, analítico y de casos y controles

Criterios de inclusión

Casos: sujetos adultos de 18 a 79 años, con presión arterial normal y con prediabetes. Se corroborará el resultado inicial con una segunda prueba realizada al menos 3 días después de la primera.

Controles: sujetos adultos de 18 a 79 años con presión arterial normal y con glucosa en ayuno < 100mg/ dL.

Criterios de Exclusión

Sujetos en tratamiento con hipoglucemiantes, esteroides o hipolipemiantes.

Hipertensión arterial

Insuficiencia cardiaca

Insuficiencia renal

Insuficiencia hepática

Enfermedades reumatológicas/inmunológicas

Enfermedades infecciosas

Antecedente de Cáncer

No aceptan participar en el estudio

Aspectos éticos

A todos los sujetos se les informa sobre los objetivos del estudio. Se obtiene consentimiento informado y se mantiene el anonimato de los pacientes.

El estudio ha sido aprobado por los comités de ética del Hospital General de Zona No. 30 con Folio 38 Q 0125488.

Selección de Sujetos

Se realiza una entrevista inicial donde se aplican los criterios de inclusión y de exclusión, si el sujeto es candidato se realiza su historia clínica, en la cual se interrogó sobre antecedentes personales, enfermedades, tratamiento actual y antecedentes heredofamiliares.

Para las medidas antropométricas peso y talla se utilizó un estadímetro calibrado. La circunferencia de la cintura se tomó con una cinta métrica 1 cm por debajo de la cicatriz umbilical; la presión arterial se tomó con un esfigmomanómetro anaeroide después de al menos 10 minutos de reposo. Se dio una cita para toma de muestra de sangre.

Toma de muestra de sangre

Se citaron a los sujetos de estudio para toma de muestra de sangre venosa con al menos 10 horas de ayuno, se tomaron aproximadamente 20 mL de sangre en tres tubos diferentes. Se utilizaron 10 mL se utilizaron para medir los niveles de glucosa, colesterol, triglicéridos (Tg), lipoproteínas de alta densidad (HDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL); estas mediciones se realizaron en el laboratorio del Hospital General Regional No. 30 IMSS. Los 10 mL restantes se enviaron al Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) en el laboratorio de Biomedicina Molecular en donde se realizaron alícuotas de 5 mL de suero de sangre periférica para la realizar los ELISAS de IL6, LPS e insulina. Los otros 5 mL se alicuotaron sangre y se congelaron a -70 °C para realizar la extracción de DNA.

Determinación de las concentraciones de insulina, interleucina 6 y LPS

Las concentraciones de insulina y de IL 6 se midieron mediante kits de ELISA comerciales: DiagMex© y Bioscience © respectivamente.

Para métodos de ELISA de la insulina (número de catálogo 1606z), la IL6 (número de catálogo 88-7966-29) y el LPS MyBioSource (número de catálogo MBS266722) se utilizaron kits comerciales. Se toman 50 μ L de cada suero para el ELISA de insulina y 100 μ L para los ELISAs de IL6 y LPS, los cuales se colocaron en las placas de ELISA de 96 pozos de cada uno de los kits, todo el resto del proceso se realizó como indican las instrucciones del fabricante. Las lecturas de absorbancia de las placas se realizaron con un espectrofotómetro a 450 nm. La sensibilidad reportada por el fabricante es de 0.75 μ UI/mL de 2pg/mL y de 1.56 pg/mL para la insulina, IL6 y LPS, respectivamente.

Extracción de DNA de sangre periférica

Para la extracción de DNA sangre periférica de los sujetos se tomo una alícuota de 500 μ L del tubo con sangre y EDTA que se conservó a -70 °C. El protocolo de extracción de DNA bacteriano se realizó con el método de fenol/cloroformo (Lopes Cendes, Cendes, & Urquia Osorio, 2013), la concentración de DNA obtenido se cuantificó con un nanodrop Thermo Scientific y se realizó lecturas de absorbancia a 230 y 260nm.

PCR-tiempo real para la cuantificación del 16S

Para la cuantificación del 16S se realizó PCR- tiempo real. Para la reacción de PCR se probaron varias Taq polimerasas (Jena Bioscience, Invitrogen y Roche). Se realizaron PCR con las tres Taq polimerasas para comparar su eficiencia. Se utilizaron los primer universales: 5'- ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT- 3' y 5'- TATTACCGCGGCTGCTGGC -3'. Sin embargo, se obtuvieron varios amplicones. Por lo cual se buscaron otros primer universales.

Se utilizaron los primer universales para 16S: forward 5'-GGTCCGGCCGGGA ACTC -3'y reverse 5'-CGCTTGCTCTCGCGAGGTCGC-3' y se utilizaron tres Taq polimerasas (Jena Bioscience, Invitrogen y Roche), sin embargo, al tener una baja eficiencia se utilizó hot start Taq polimerasas. En la figura 6 de los resultados mostramos que el Máster Mix (qPCR GreenMaster UNG highROX, Jena Bioscience) fue el mejor para nuestro ensayo.

Cálculo de los índices de HOMA

Los índices de HOMA-IR y HOMA-B se calcularon a partir de los valores de glucosa e insulina obtenidos de la muestra de sangre en cada paciente. El cálculo se realizó mediante el software que puede descargarse de forma gratuita de la página de la Universidad de Oxford.

Calculo del índice HOMA_{IR/B}

El índice HOMA_{IR/B} se calculó dividiendo el valor de HOMA-IR entre el valor de HOMA-B y multiplicándolo por 100 ($[\text{HOMA-IR}/\text{HOMA-B}]/100$).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La estadística descriptiva incluyó medias, medianas, intervalos de confianza, desviación estándar, porcentajes, y percentiles.

Para la comparación de las concentraciones de insulina, IL6, LPS y 16s rRNA así como de los índices HOMA entre los casos y controles, se utilizaron las pruebas t de student y U de Mann-Whitney según su distribución paramétrica.

Para la comparación de las concentraciones de insulina, IL6, LPS y 16s rRNA, así como de los índices HOMA entre las categorías del IMC se utilizó la prueba de ANOVA de Kruskal-Wallis según su distribución paramétrica.

Las correlaciones entre los índices de HOMA y las variables antropométricas (IMC, circunferencia de cadera) así como las concentraciones de insulina, IL6 y ácidos grasos libres se realizó mediante la prueba de Spearman.

Para todas las pruebas se tomó un nivel de significancia de 0.05. Todos los análisis se realizaron mediante el paquete estadístico SPSS en su versión 20 IBM © y Prisma 8.

RESULTADOS

Población

En el periodo comprendido de agosto del 2011 a diciembre 2019 se entrevistaron un total de 353 sujetos, de los cuales 323 sujetos cumplieron con los criterios de inclusión y aceptaron participar en el estudio, todos los sujetos tienen una edad menor a 79 años y se excluyeron pacientes que tuvieran niveles de glucosa ≥ 126 mg/dl. Con base al índice HOMA IR y su punto de corte de 2.6 establecido por Matthews et. al. en 1985, que establece que los que están por arriba de este punto de corte son sujetos con resistencia a la insulina (RI). Por lo que, de los 323 sujetos, 257 cuyo valor de HOMA-IR < 2.6 (controles) y 66 sujetos por su HOMA- IR ≥ 2.6 (sujetos con RI) ver tabla 1.

Comparación del índice de masa corporal entre controles y sujetos con RI

En el gráfico 1 se muestra la diferencia de los valores de índice de masa corporal (IMC) entre los dos grupos, en donde se observa una diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0.0001$.

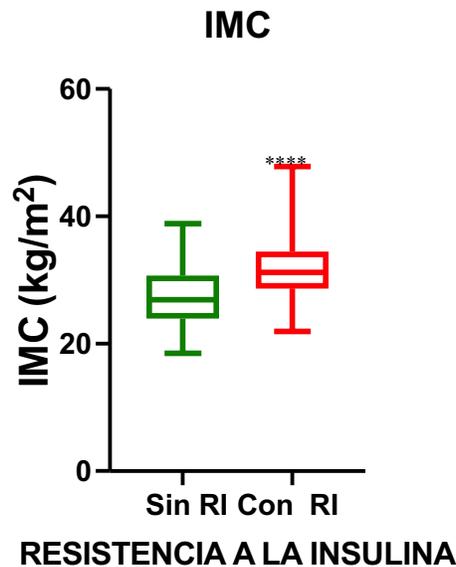


Gráfico 1: Comparación del índice de masa corporal (IMC) entre los sujetos con resistencia a la insulina y sin resistencia a la insulina. Para comparar la mediana de los dos grupos se utilizó U Mann Whitney, debido a su distribución no paramétrica, obteniéndose una $p < 0.0001$.

Comparación de colesterol, triglicéridos, HDL y LDL entre controles y sujetos con RI.

En el gráfico 2, se observa una diferencia significativa entre la concentración de colesterol ($p=0.05$), triglicéridos ($p=0.0001$) y HDL ($p=0.0016$). No se obtuvo una diferencia significativa entre los dos grupos al comparar sus valores de LDL con una $p= 0.321$.

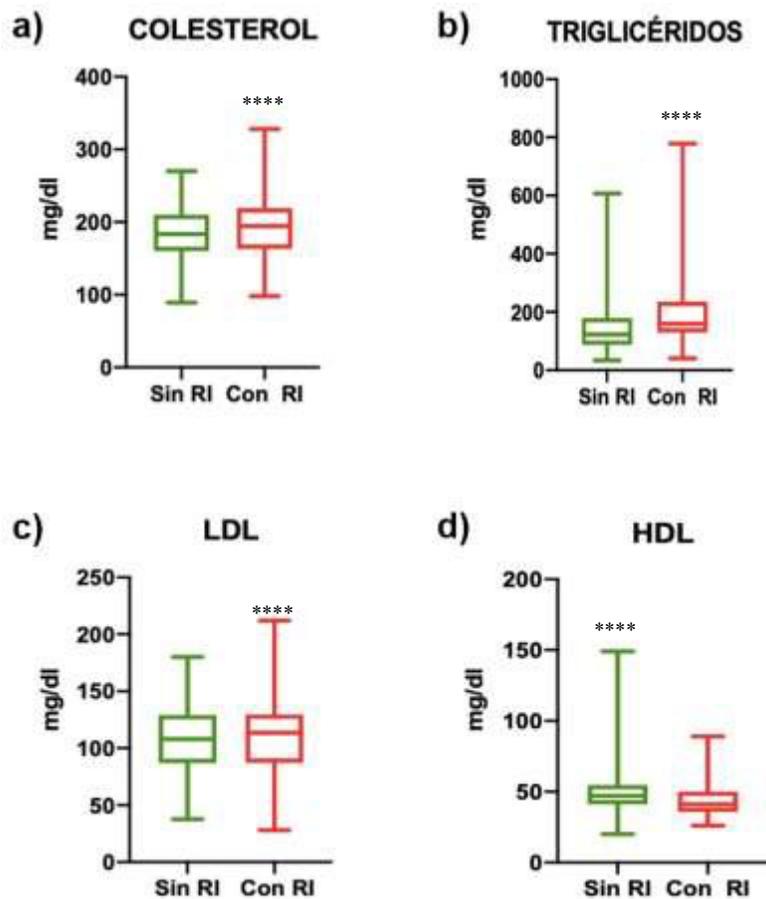


Gráfico 2: Comparación de colesterol, triglicéridos, lipoproteínas de alta densidad y lipoproteínas de baja densidad entre los sujetos con resistencia a la insulina y sin resistencia a la insulina. Para evaluar la diferencia entre la concentración de triglicéridos (b) y lipoproteínas de alta densidad (d) (HDL) se usó la prueba de U Mann Whitney, obteniendo una $p=0.0001$ y $p=0.0016$ respectivamente. Se utilizó la prueba t de Student para comparar las concentraciones de colesterol (a) y lipoproteínas de baja densidad (c) (LDL), obteniendo una $p=0.05$ y $p=0.032$ respectivamente.

Comparación del índice de masa corporal entre controles y sujetos con RI.

Se obtuvo el HOMA IR/B según la fórmula descrita por Elizalde Barrera et.al. en 2013. Se comparó el valor del HOMA IR/B en los sujetos con resistencia a la insulina vs sin resistencia a la insulina. En el gráfico 3, se puede observar que hay una diferencia significativa entre los dos grupos.

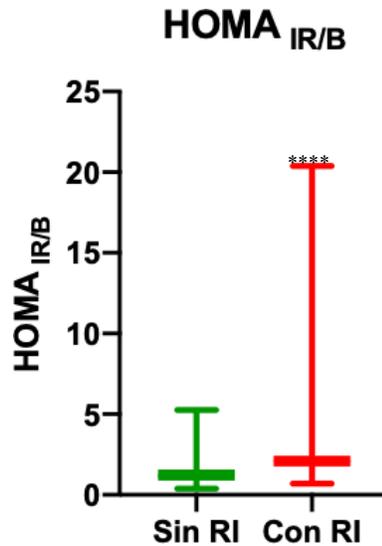


Gráfico 3. Comparación de los valores de HOMA IR/B en los sujetos sin resistencia a la insulina (n=234) y con resistencia a la insulina (n=66). Debido a su distribución no paramétrica se realiza U Mann Whitney con una $p < 0.0001$.

Características de la población de estudio

Las características antropométricas, los resultados de la química sanguínea y la evaluación del índice HOMA- IR y -B así como el índice HOMA IR/HOMA desarrollado por Elizalde-Barrea (2017) que claramente identifica a sujetos con riesgo de desarrollar DMT2 de las grupos de estudio, así como los parámetros que fueron significativos se muestran en la Tabla 1.

Las características de la población se muestran en la tabla 1.

	Sujetos sin Resistencia a la Insulina (n=257)	Sujetos con Resistencia a la Insulina (n=66)	p
Edad (años) **	43 (34- 51)	44 (37-51.5)	
IMC (kg/m ²) **	26.91 (23.95- 30.73)	31.19 (28.67- 34.45)	<0.0001
HDL (mg/dl) **	47 (41- 54.75)	41 (35.75- 50)	0.0016
LDL (mg/dl) *	107 (80- 134)	110.9 (78.79 - 143)	
Colesterol (mg/dl) *	184.8 (150.3 – 219)	194.5 (151.4- 237.5)	
Triglicéridos (mg/dl) **	123 (87- 179.5)	159.5 (129.5- 235.8)	0.0001
Glucosa (mg/dl) **	93 (84- 103)	103 (96- 111.3)	<0.0001
HOMA IR **	1.28 (0.70- 1.70)	3.20 (2.89- 4.033)	< 0.0001
HOMA- B **	105.4 (77.23- 138.7)	164.3 (135.4- 213.4)	<0.0001
HOMA _{IR/B} **	1.037(0.818- 1.311)	1.934 (1.616- 2.167)	<0.0001

Tabla 1: Características de la población en estudio.

* se muestra medias \pm SD; para el análisis entre los dos grupos se utilizó t de Student

** se muestra medianas y 1er y 3er cuartil; para el análisis entre los dos grupos se utilizó U Mann Whitney

Tabla 2. Diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 y prediabetes (ADA, 2019)		
Parámetro	Diabetes	Prediabetes
Glucosa al azar	≥ 200 mg/dL	
Glucosa en ayuno, 2 tomas, con diferencia de una semana	≥ 126 mg/dL	100 mg/dL a 125 mg/dL
Hemoglobina glicada	$\geq 6.5\%$	5.7 a 6.4%
Glucosa plasmática, 2 h posteriores a la ingesta de 75 g de glucosa	≥ 200 mg/dL	140 mg/dL a 199 mg/dL

Tabla 2. Criterios diagnósticos para diabetes mellitus tipo 2 y prediabetes (ADA, 2019)

En la tabla 3, mostramos que el 11% de los sujetos sin glucosa alterada en ayuno presentan resistencia a la insulina. En diversos estudios se ha mostrado que los sujetos con resistencia a la insulina presentan mayor riesgo de presentar enfermedades cardiovasculares, dislipidemias y diabetes.

Tabla 3. Sujetos con glucosa normal y prediabetes, con y sin resistencia a la insulina

Sujetos N=273 (%)	Con Resistencia a la Insulina, n (%)	Sin Resistencia a la insulina, n (%)
Glucosa normal, 151 (55)	17 (11)	134 (89)
Prediabetes, 122 (45)	44 (36)	78 (64)
TOTAL	61 (23)	212 (77)

Tabla 3: Características de la población en estudio de los sujetos con y sin resistencia a la insulina.

Comparación de la concentración de interleucina-6 (Il-6) entre controles y sujetos con resistencia a la insulina.

De toda nuestra población de estudio se seleccionaron a 98 sujetos controles y 32 sujetos con resistencia a la insulina y se realizó ELISAs para IL 6. Se comparó la diferencia de concentración de IL- 6 entre sujetos con resistencia a la insulina y sin resistencia a la insulina, como se puede observar en el gráfico 4, no se observó una diferencia significativa.

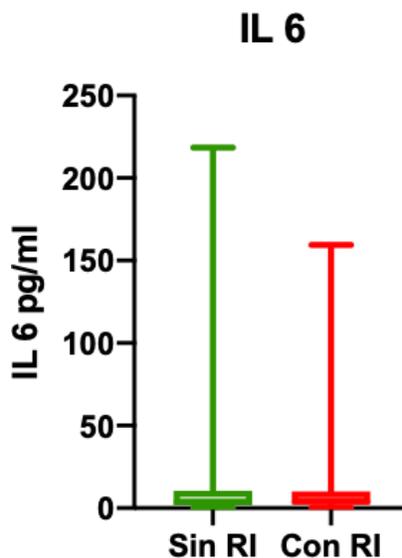


Gráfico 4. Comparación entre las concentraciones de IL 6 en sujetos con resistencia a la insulina (n=32) y sin resistencia a la Insulina (n=98). Debido a su distribución no paramétrica se realiza U de Mann Whitney con una p= 0.86

Correlación entre la concentración de interleucina 6 (IL6) y el coeficiente HOMA_{IR/B}.

En el gráfico 5, se ilustra la correlación entre la IL 6 el HOMA_{IR/B}, con resultado estadísticamente significativo con una $p=0.0097$ con una rho de Spearman de -0.2316 .

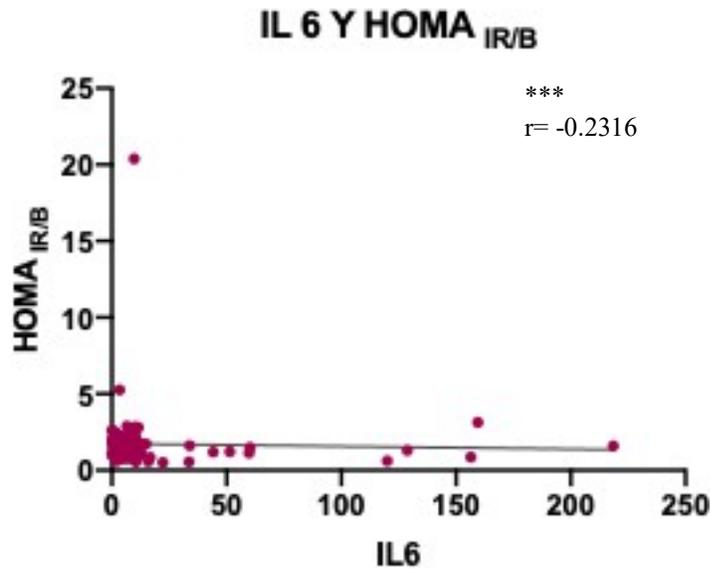


Gráfico 5: Comparación entre los niveles de IL 6 en sujetos con resistencia a la insulina ($n=130$). Debido a su distribución no paramétrica se realiza una correlación de Spearman, $r=-0.2316$ con una p de 0.0097 .

SEGUNDA POBLACION DE ESTUDIO PARA LIPOPOLISACARIDO Y 16S rRNA

Para esta segunda parte del estudio, puesto que requeríamos sangre periférica fresca se continuó reclutando pacientes en el Hospital General de Zona No. 30 del IMSS como parte del estudio registrado por Elizalde Barrera et al., en 2013. Se reclutaron 141 sujetos en total del 2015 al 2019, de los cuales 44 cumplieron con los criterios de inclusión del estudio.

Comparación de la concentración del lipopolisacárido (LPS) entre controles y sujetos con RI.

A los 44 sujetos se les determinó la concentración de insulina, 36 individuos fueron controles y 8 presentaron RI. A estos 44 sujetos se les determinó por ELISA la concentración de lipopolisacárido. En el gráfico 6 se muestra la diferencia entre las concentraciones de LPS de los casos y los controles, la cual no fue significativa con una $p=0.7089$.

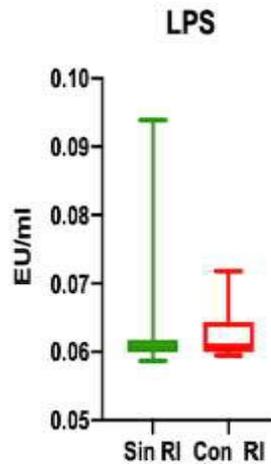


Gráfico 6: Comparación de la concentración de lipopolisacárido obtenido de sangre periférica en los sujetos con resistencia a la insulina (n=8) y sin resistencia a la insulina (n=36). Debido a su distribución no paramétrica se usó la prueba U Mann Whitney obteniendo una $p=0.7089$.

Comparación de las concentraciones del LPS entre controles y sujetos con prediabetes.

Debido a que se realiza la búsqueda de nuevos biomarcadores en sujetos con riesgo elevado de desarrollar resistencia a la insulina, se realizó una comparación entre sujetos 42, de los cuales 10 sujetos tuvieron prediabetes y 32 concentraciones normales de glucosa en ayuno normal. Como se muestra en el gráfico 7, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.3229$) entre las concentraciones de LPS entre los dos grupos.

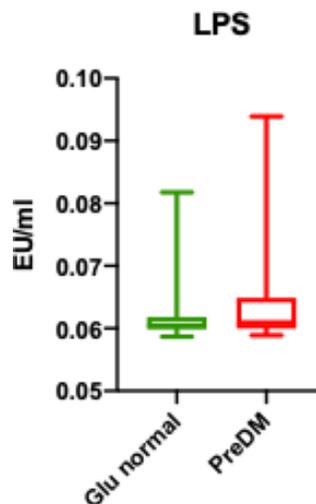


Gráfico 7: Comparación de la concentración de lipopolisacárido obtenido de sangre periférica en los sujetos con prediabetes (n=10) y con glucosa normal (n=32). Debido a su distribución no paramétrica se usó la prueba U Mann Whitney obteniendo una $p=0.54$.

Correlación de colesterol, triglicéridos, HDL y LDL con la concentración de lipopolisacárido.

Se realizó una correlación entre la concentración de LPS y colesterol, triglicéridos, HDL y LDL, debido a su distribución no paramétrica se utilizó una correlación de Spearman, obteniendo correlaciones muy bajas entre las variables y con una diferencia estadística no significativa como se muestra en el Gráfico 8.

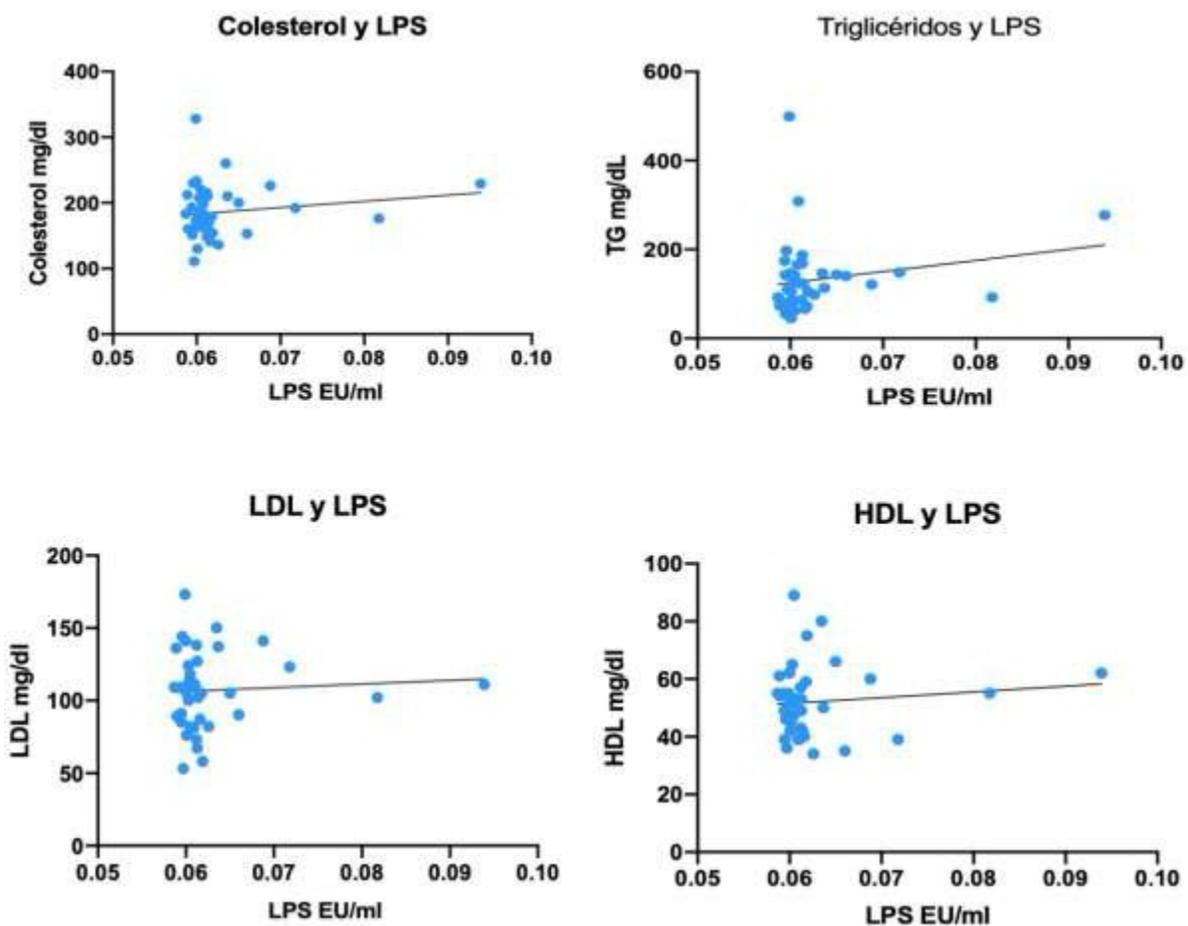


Gráfico 8: Correlación entre la concentración de lipopolisacárido obtenido de sangre periférica con colesterol, triglicéridos, lipoproteínas de alta densidad y lipoproteínas de baja densidad (n=40). Debido a su distribución no paramétrica se usó la correlación de Spearman no se observó una correlación significativa con ninguno de los lípidos estudiados. Para colesterol se obtuvo una $r=0.071$ ($p=0.662$), para triglicéridos una $r=0.216$ ($p=0.180$), lipoproteínas de alta densidad una $r=0.05046$ ($p=0.7571$) y para lipoproteínas de baja densidad una $r=0.002066$ ($p=0.989$).

Estandarización de la identificación del 16s rRNA en muestras de sangre por PCR tiempo real.

Para el análisis con el 16s rRNA primero se estandarizó la técnica para el PCR tiempo real, por lo cual se extrajo el DNA de la cepa *Escherichia coli* enteroagregativa 042 (EAEC 042) se realizaron varias diluciones desde 10^7 a 10^0 UFC. Posteriormente estas diluciones se inocularon en 1 mL de sangre periférica y se realizó la extracción de DNA bacteriano con la técnica de fenol/cloroformo (Lopes Cendes et al., 2013). Se corroboró el DNA por electroforesis y se cuantificó por nanodrop nanodrop Thermo Scientific y se realizó lecturas de absorbancia a 230 y 260nm. Una vez corroborado la integridad del DNA, se realizaron PCR tiempo real con los iniciadores universales 16s forward: 5'- ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT- 3' y reverse: 5'- TATTACCGCGGCTGCTGGC -3' (Clifford et al., 2012). Sin embargo, al realizar la PCR tiempo real se obtuvo una eficiencia de 141.5% (Gráfico 9)

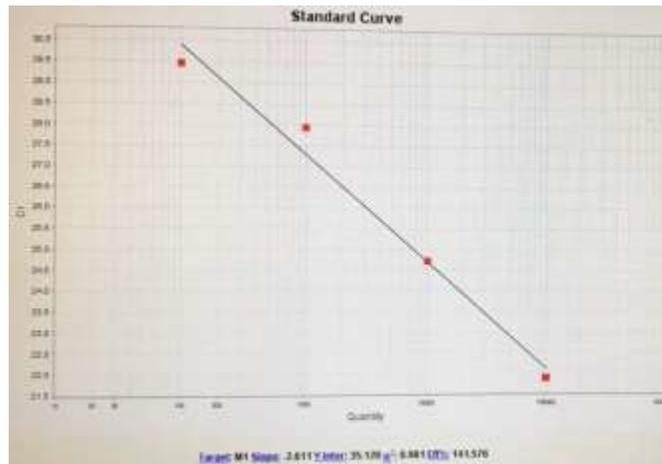


Gráfico 9: Curva de eficiencia de PCR- tiempo real con los iniciadores universales 16s forward: 5'- ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT- 3' y reverse: 5'- TATTACCGCGGCTGCTGGC -3'. Utilizando Taq polimerasa Jena/BioScience. Las condiciones para la amplificación fueron 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, Tm 60°C por 1 min y 72°C por 15 segundos. Se muestra una eficiencia de 141.5% con una $r^2=0.98$.

Debido a la eficiencia de 141.3% y productos inespecíficos que se pudieron observar en la curva de amplificación se decidió cambiar de iniciadores. Se seleccionaron los iniciadores universales 16s rRNA forward 5' GGTCCGCGCGGAACTC-3' y reverse 5'- CGCTTGCTCTCGCGAGGTCGC-3' (Simon et al., 2014). Utilizando estos iniciadores con un Máster Mix (qPCR GreenMaster UNG highROX, Jena Bioscience) se obtuvo un producto de 146 pb. Las condiciones para la amplificación del DNA fueron 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, Tm 65°C por 1 min y 72°C por 15 segundos. El último ciclo de amplificación fue seguido de un proceso para generar una curva melt. En el Gráfico 10 se puede observar la curva estándar de la

sangre periférica inoculada con EAEC 042 obteniendo una eficiencia de 99.7% con una $R^2=0.97$. Por lo cual se eligieron estas condiciones para todas las muestras de los sujetos en estudio.

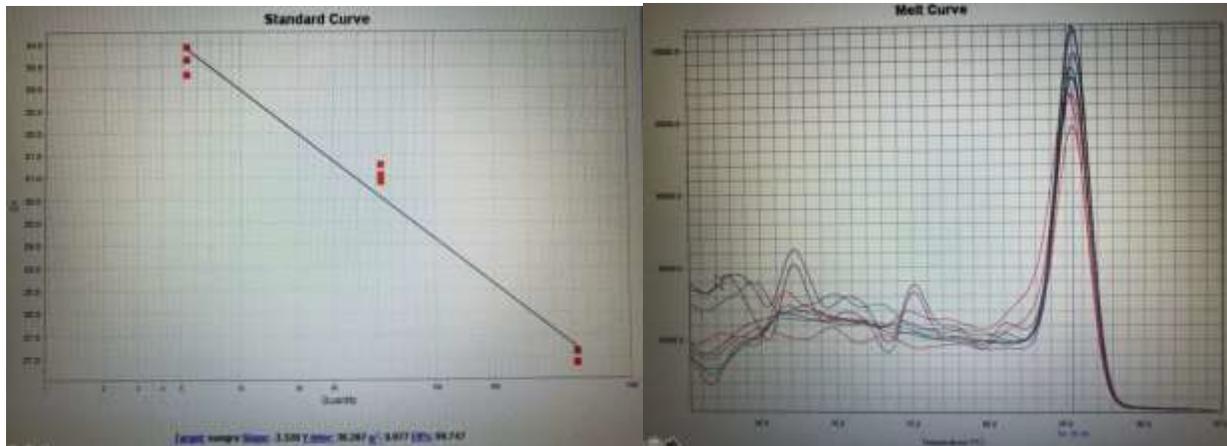


Gráfico 10: Curva de eficiencia y curva melt de PCR- tiempo real con los iniciadores universales 16s forward: 5'-GGTCCGGCCGGGAAGTCTC-3' y reverse 5'-CGCTTGCTCTCGCGAGGTTCGC-3', utilizando Máster Mix de Jena/BioScience con una T_m de 65°C por 40 ciclos. Se observa una eficiencia de 99.7% con una R^2 de 0.97. Y se observa que el amplicón de las muestras es a 81.3°C.

Identificación de 16s rRNA en las muestras de sangre sujetos controles y con RI.

Ya una vez estandarizado la PCR- tiempo real se realizó la extracción de DNA de las muestras de los sujetos, en total se realizaron 44 extracciones. Las cuales fueron las mismas muestras de las cuales se realizó el ELISA para LPS. Lo primero que se analizó fue la comparación de las concentraciones de 16s rRNA en los sujetos con y sin resistencia a la insulina. Como se puede observar en el gráfico 11, no hubo diferencias en cuanto a la concentración de 16s rRNA entre los dos grupos.

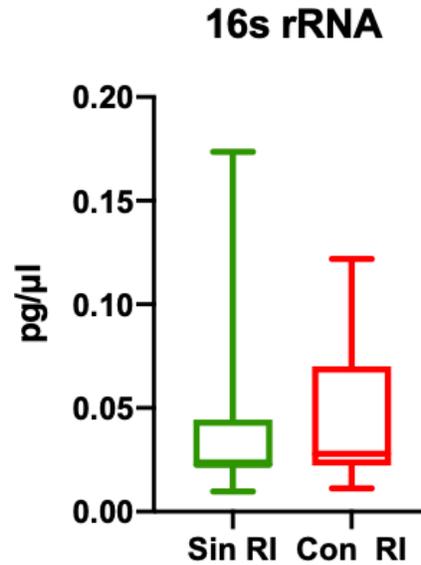


Gráfico 11. Comparación del 16s rRNA entre los sujetos con resistencia a la insulina (n=8) y sin resistencia a la insulina (n=36). Para comparar la mediana de los dos grupos se utilizó U Mann Whitney, debido a su distribución no paramétrica, obteniéndose una $p=0.4398$.

Comparación de la concentración de 16s rRNA entre controles y sujetos con prediabetes.

La comparación entre las concentraciones de 16s rRNA entre sujetos con prediabetes (n= 12) y sujetos con glucosa normal en ayuno (n=30). En el gráfico 12, se observa que hay una diferencia estadísticamente significativa con una $p=0.0004$.

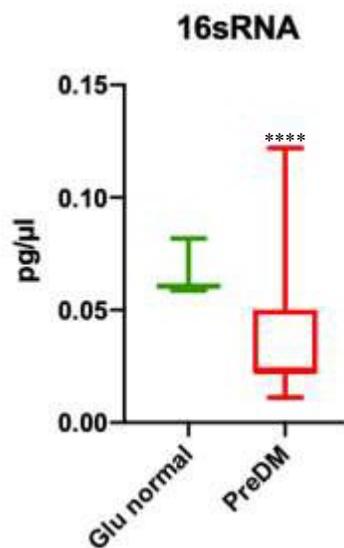


Gráfico 12. Comparación del 16s rRNA entre los sujetos con resistencia a la insulina (n=12) y sin resistencia a la insulina (n=30). Para comparar la mediana de los dos grupos se utilizó U Mann Whitney, debido a su distribución no paramétrica, obteniéndose una $p=0.0004$.

Correlación de colesterol, triglicéridos, HDL y LDL con la concentración de 16s rRNA.

En el gráfico 13, se puede observar las correlaciones que se realizaron entre el 16s rRNA y colesterol, triglicéridos, HDL y LDL, obteniendo correlaciones muy bajas entre las variables y con una diferencia estadística no significativa.

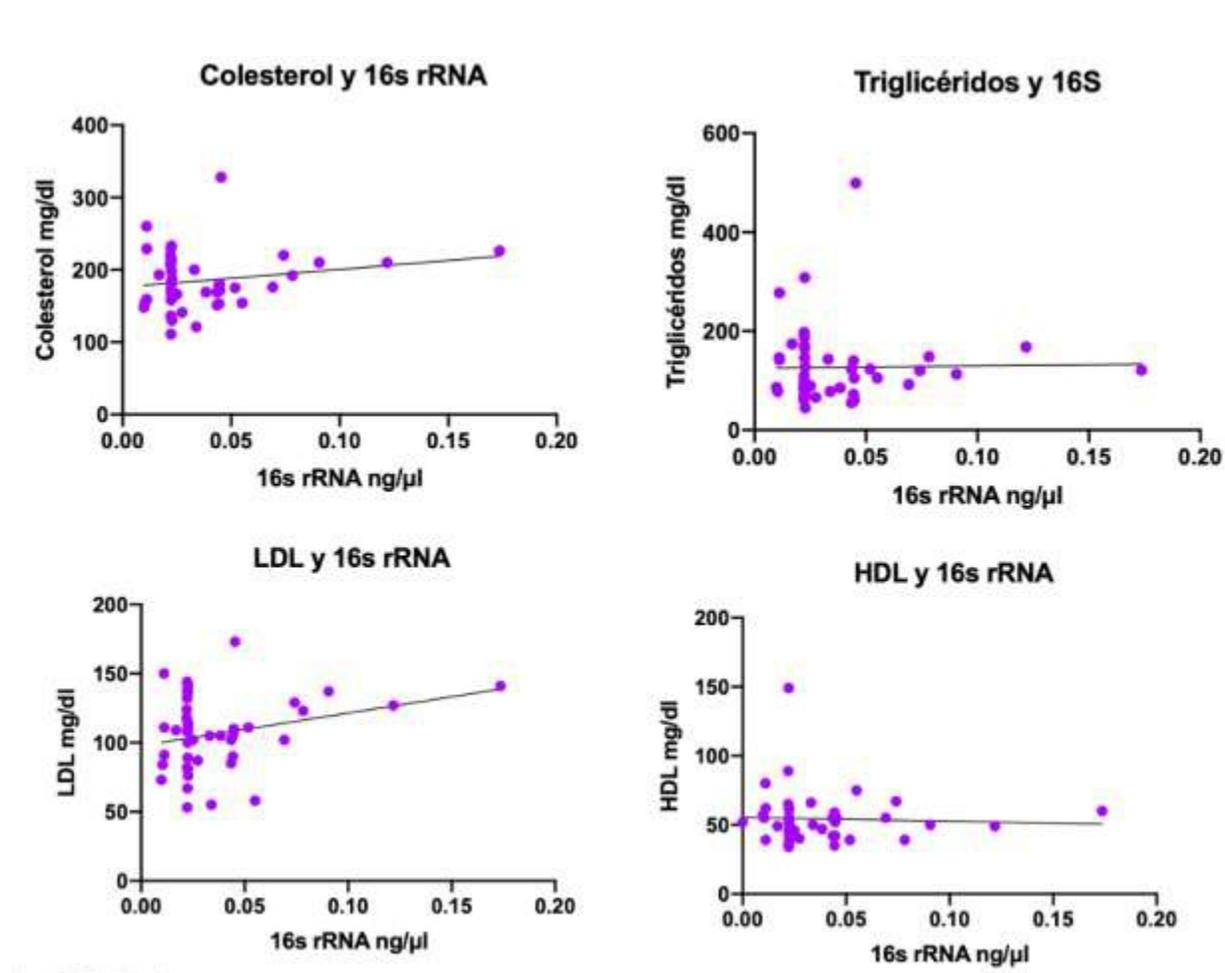


Gráfico 13: Correlación entre la concentración del 6s rRNA obtenido de sangre periférica con colesterol, triglicéridos (Tg), lipoproteínas de alta densidad (HDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL)(n=44). Debido a su distribución no paramétrica se usó la correlación de Spearman no observó una correlación significativa con ninguna de las concentraciones de lípidos estudiados. Para colesterol se obtuvo una $r = -0.1278$ ($p = 0.4027$), para triglicéridos una $r = 0.011$ ($p = 0.940$), lipoproteínas de alta densidad una $r = 0.05046$ ($p = 0.7571$) y para lipoproteínas de baja densidad una $r = 0.1155$ ($p = 0.455$).

Correlación entre el índice HOMA_{IR/B} con la concentración de 16s rRNA y LPS.

También se correlacionó entre el índice HOMA_{IR/B} con los valores de LPS y 16 s rRNA (Gráfico 14), se no se observó una correlación significativa entre el índice HOMA_{IR/B} con el lipopolisacárido (LPS), ya que se obtuvo una $r = 0.2454$ ($p = 0.1220$). En el análisis de HOMA_{IR/B} con el 16s rRNA se obtuvo una r de 0.1889 ($p = 0.2034$).

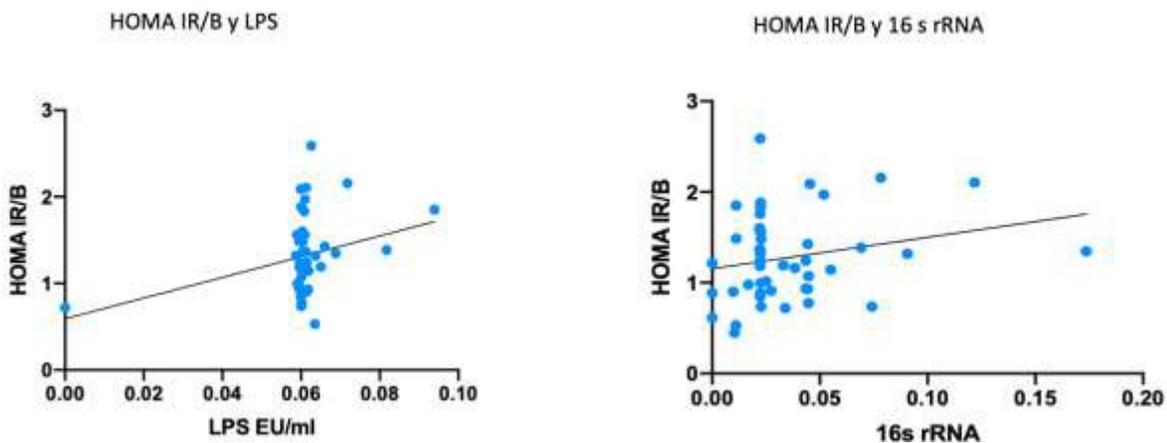


Gráfico 14. Correlación de los valores de HOMA_{IR/B} con el lipopolisacárido (LPS) y 16 s rRNA (n=47). Debido a su distribución no paramétrica se realiza rho de Spearman con p estadísticamente no significativas.

DISCUSIÓN

La diabetes mellitus tipo 2 es un problema de salud pública a nivel mundial y la morbi-mortalidad asociada a diabetes es muy alta en México, puesto que ocupamos el séptimo lugar de los 10 países con mayor número de personas con DMT2 en el mundo (Colchero et al., 2020). En los últimos años, el número de personas con diabetes mellitus, en el mundo, se ha duplicado, para 2015 había 415 millones de personas con DMT2. La prevalencia de obesidad ha incrementado paralelamente con la epidemia de diabetes mellitus. (Pérez Díaz, 2016)

Los factores de riesgo asociados a diabetes mellitus incluyen antecedentes de diabetes mellitus, obesidad., sedentarismo solo explican el 80% de los casos. Por lo que es claro que otros factores dependientes o independientes incluyendo ambientales juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. (Llorente, Enrique, Rivas, & Borrego, 2016)

A pesar de que el diagnóstico de la DMT2 continúa siendo glucocéntrico, los valores diagnósticos se han modificado con el tiempo ya que se ha disminuido los valores de corte para determinar hiperglucemia y para realizar su diagnóstico. Sin embargo, estos nuevos parámetros han permitido identificar un estado fisiológico previo a la aparición de diabetes, al cual se le ha denomina prediabetes. Los sujetos que se encuentran en el estado de prediabetes no solo están en mayor riesgo de desarrollar diabetes en algún momento de su vida sino también tienen un mayor riesgo de presentar enfermedades cardiovasculares.

La transición entre un estado de normoglucemia hacia la prediabetes inicia con la presencia de la resistencia a la insulina que resulta en una hiperinsulinemia compensatoria. La resistencia a la insulina se considera como un tronco común fisiopatológico entre la DMT2, la hipertensión arterial y obesidad central. Una vez identificada la resistencia a la insulina, se ha identificado que en las poblaciones diabetogénicas, se ha incrementado en paralelo con el incremento en la prevalencia de obesidad, dislipidemias y prediabetes. (G. M. Reaven, 2005)

El papel de la insulina en la regulación (G. M. Reaven, 2005) y toma de la glucosa es claro, así como lo que sucede en el paciente cuando desarrollo RI y su efecto sobre la diabetes.

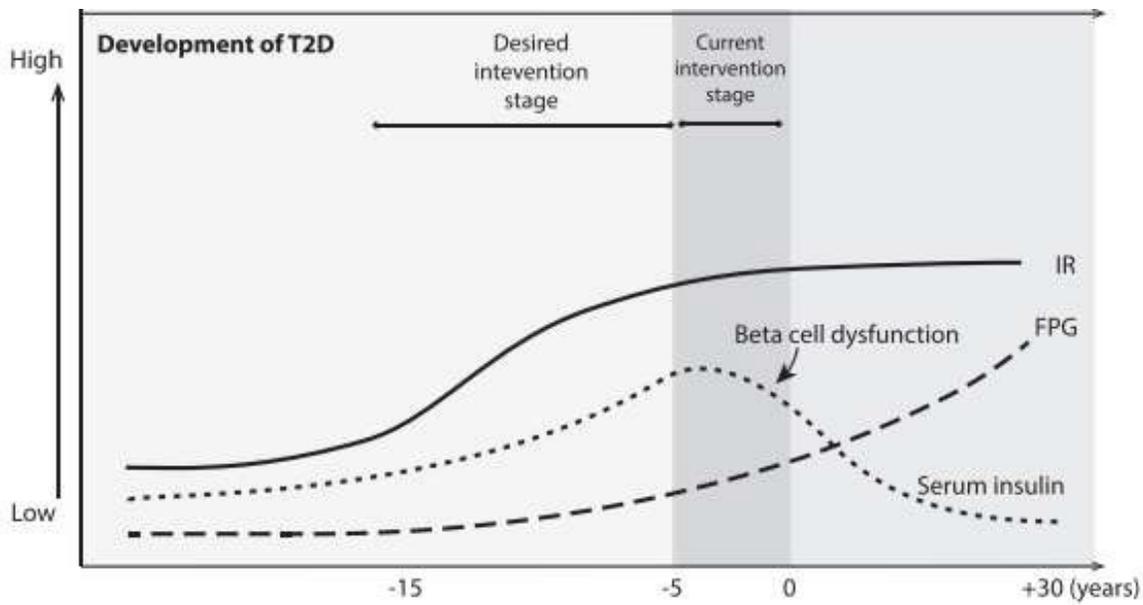


Figura 4: Objetivo futuro de la intervención para prevenir la diabetes tipo 2. La intervención actual tiene lugar en la etapa (prediabetes), alrededor de 5 años antes de que se desarrolle la diabetes tipo 2. Creemos que la etapa de resistencia a la insulina, pero con glucosa normal, anterior a la etapa prediabética, será una mejor fase de la intervención para prevenir el tipo 2 diabetes.

La inflamación crónica subclínica es parte de la fisiopatología de las enfermedades crónicas como las cardiovasculares, el cáncer, el hígado graso y la diabetes. Hasta el momento se han propuesto diferentes biomarcadores que indican la presencia de inflamación crónica y que tal vez contribuyen a la aparición de la resistencia a la insulina. (Furman et al., 2019) El identificar factores que contribuyen a la presencia de resistencia a la insulina o la prediabetes es de suma importancia, puesto que en la actualidad los sistemas de salud deben enfocarse en la identificación de sujetos en riesgo de desarrollar diabetes y enfermedades cardiovascular, puesto que la mayoría del gasto de salud al menos en México son para combatir las secuelas causadas por la diabetes y las enfermedades cardiovascular. (Barraza et al., 2015) el identificar a los sujetos de riesgo para desarrollar estas enfermedades permitirá cambiar el enfoque nacional de salud pública hacia uno preventivo disminuyendo no solo los costos en salud sino muertes y mejorando la calidad de vida de la población.

Por lo que en el presente estudio, por un lado planteo identificar biomarcadores que nos permitan identificar sujetos en riesgo de desarrollar resistencia a la insulina o prediabetes, así como identificar sujetos con resistencia a la insulina que no presentan glucosa alterada en ayuno y que no son clasificados como

prediabéticos. Para responder la primera pregunta se propuso la búsqueda de 16s rRNA y LPS, para identificar la presencia de dos componentes bacterianos, uno como indicador de la presencia de bacterias en el sujeto y otro componente directamente involucrado en disparar respuestas inflamatorias, respectivamente (Furman et al., 2019), ya que se ha descrito que ciertas infecciones bacterianas pueden actuar en sinergia con los factores de riesgo vascular clásicos y contribuyendo a la inflamación crónica subclínica la cual tiene un papel importante en la fisiopatología tanto de la diabetes como de las enfermedades cardiovasculares (Bernardino de la Serna, Sancho Bueso, García Iglesias, Lavilla Uriol, & Gil Aguado, 2000).

Con la finalidad de buscar nuevos biomarcadores que ayuden a definir mejor a los sujetos con alto riesgo de desarrollar resistencia a la insulina, se diseñó un estudio transversal que incluyó a sujetos con resistencia a la insulina y un grupo control, a los cuales se les evaluaron factores de riesgo clásicos para desarrollo de diabetes y enfermedades cardiovasculares como el IMC y dislipidemias, y se les realizó a un subgrupo la búsqueda del 16s rRNA y del LPS.

Observamos que las concentraciones de 16s rRNA y LPS no se encuentra incrementada en sujetos con resistencia a la insulina, ya que es probable que no sea un factor que contribuya al desarrollo de ésta. Sin embargo, mostramos una diferencia significativa en del 16s rRNA en sujetos con prediabetes, mientras que la concentración de lipopolisacárido, aunque se observa con mayor concentración en estos sujetos no fue estadísticamente significativo, esto tal vez se debe a que el número de sujetos con alterada en ayuno (prediabéticos) que se reclutaron fue muy bajo en el segundo estudio. Con estos datos se puede inferir que algunos productos bacterianos, pueden participar en la fisiopatología de la prediabetes. Ya se ha demostrado que bacterias como *Chlamydia pneumoniae* se encuentran presentes en la placa ateromatosa y se ha sugerido que la aterosclerosis podría ser una suma de factores que irían desde procesos infecciosos hasta tóxicos o metabólicos. (Bernardino de la Serna et al., 2000) En los últimos años se han asociado diversos agentes infecciosos con la presencia de enfermedades, que van desde enfermedades metabólicas hasta la presencia de algunos cánceres. (Bernardino de la Serna, Sancho Bueso, García Iglesias, Lavilla Uriol, & Gil Aguado, 2000) Es por ello, que en nuestro grupo de trabajo que se buscó la identificación de productos bacterianos en sujetos con alto riesgo de presentar diabetes mellitus.

Al evaluar todos los sujetos, se encontró de manera importante que el incremento de peso es uno de los principales factores para desarrollar resistencia a la insulina, además, también se observó que los niveles

de colesterol, triglicéridos y lipoproteína de alta densidad se encuentran en mayores concentraciones en los sujetos RI comparados con los controles. (Li et al., 2014). Como se muestra en la tabla XXXX es claro que hay individuos con RI que no tienen glucosa alterada en ayuno, lo cual ha permitido incrementar el número de sujetos que potencialmente pueden desarrollar diabetes, además se observó que estos sujetos muestran claramente dislipidemias. Hasta el momento se consideraba a la RI como un estado fisiopatológico que incrementa el riesgo de presentar dislipidemias, disfunción endotelial y prediabetes. (G. M. Reaven, 2005). Sin embargo, nuestros resultados revelan que la identificación de sujetos con RI, incrementa el número de sujetos que pueden ser diagnosticados como prediabéticos o sujetos en riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, lo que permitirá realizar intervenciones tempranas de prevención en estos sujetos como cambios en alimentación, incremento en la actividad en la vida diaria y en caso de ser necesario, iniciar tratamiento. (Lahsen M & Liberman G, 2003) Además el índice HOMA_{IR/B} (Elizalde- Barrera 2017) claramente muestra que estos sujetos con RI están agrupados dentro de los sujetos prediabéticos. Por lo que nosotros proponemos que se debe de incluir la determinación de insulina en las pruebas para diagnosticar a los sujetos para desarrollar diabetes. Con respecto a los biomarcadores de manera interesante se observó que las concentraciones del 16s rRNA y del LPS no se encuentran incrementados en la presencia de obesidad y de manera importante tampoco en los pacientes con RI, sugiriendo que estos factores no contribuyen por si solos a la RI, tampoco.

Con base en nuestros resultados podemos inferir que las bacterias pueden contribuir a la presencia de prediabetes que, junto con la resistencia a la insulina, antecedentes heredofamiliares y la obesidad pueden favorecer el desarrollo de la enfermedad.

CONCLUSIONES

En este estudio presentamos la posibilidad de que la concentración de 16s rRNA, junto con otros factores de riesgo pueden identificar a sujetos con alto riesgo de desarrollar prediabetes. Con base en estas observaciones son necesarios más estudios para poder considerar a la concentración del 16s rRNA como un factor de riesgo ya se asociado o independiente a la presencia de prediabetes. Aunque el lipopolisacárido se encuentra en una concentración mayor en los sujetos con prediabetes no hubo una diferencia significativa estadística, por lo cual una prospectiva del estudio es incrementar los sujetos de estudio para poder observar si realmente existe una correlación. La insulina debe de determinarse en las químicas sanguíneas de manera

cotidiana, así como la determinación del índice $HOMA_{IR/B}$ esto permitirá identificar a sujetos con valores normales de glucosa en ayuno con riesgo de desarrollar diabetes y enfermedades cardiovasculares

PERSPECTIVAS

Incrementar el tamaño de muestra de los sujetos con resistencia a la insulina para evaluar nuevamente los parámetros de 16s rRNA y LPS y tal vez evaluar otros productos bacterianos como flagelina.

Implementar en los laboratorios clínicos la determinación de insulina y determinar el índice $HOMA_{IR/B}$.

BIBLIOGRAFÍA

- Adeva Andany, M. M., Martínez Rodríguez, J., González Lucán, M., Fernández Fernández, C., & Castro Quintela, E. (2019). Insulin resistance is a cardiovascular risk factor in humans. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, 13(2), 1449–1455.
<https://doi.org/10.1016/j.dsx.2019.02.023>
- Amar, J., Serino, M., Lange, C., & Chabo, C. (2011). Involvement of tissue bacteria in the onset of diabetes in humans : evidence for a concept, 3055–3061. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2329-8>
- American, D. A. (2017). Classification and Diagnosis of Diabetes. Sec 2. *Diabetes Care*, 40(January), 11–24. <https://doi.org/10.2337/dc17-S005>
- Barraza-Llorens, M., Guajardo-Barron, V., Picó, J., García, R., Hernández, C., Mora, F., ... Urtiz, A. (2015). *Carga económica de la diabetes mellitus en México , 2013. Funsalud*.
- Barraza, M., Colaboradores Verónica, L., Guajardo, J., Cristian, B., Viveros, H., Javier, F., ... Crable, E. (n.d.). *Coordinación general del estudio*. Retrieved from <http://www.funsalud.org.mx>
- Bernardino de la Serna, J., Sancho Bueso, T., García Iglesias, M., Lavilla Uriol, P., & Gil Aguado, A. (2000). Atherosclerosis e infección. *Formación Continuada Del Médico Práctico*, 36(9), 332–343.
- Burcelin, R., Serino, M., Chabo, C., Blasco-Baque, V., & Amar, J. (2011). Gut microbiota and diabetes: From pathogenesis to therapeutic perspective. *Acta Diabetologica*, 48(4), 257–273.
<https://doi.org/10.1007/s00592-011-0333-6>
- Chen, L., Chen, R., Wang, H., & Liang, F. (2015). Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. *International Journal of Endocrinology*. <https://doi.org/10.1155/2015/508409>
- Clifford, R. J., Milillo, M., Prestwood, J., Quintero, R., Zurawski, D. V., Kwak, Y. I., ... Mc Gann, P. (2012). Detection of bacterial 16S rRNA and identification of four clinically important bacteria by real-time PCR. *PloS One*, 7(11), 7–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048558>
- Colchero, A., Gómez, R., Ruy Lopez, R., Lopez Hernández, D., Sánchez Díaz, I., Silverman Retana, O., & Bautista Arredondo, S. (2020). Heterogeneity in average cost per patient with type 2 diabetes at primary health facilities in Mexico: comparing comprehensive diabetes management medical offices with general practice. *Research Square*, (1), 6–8. <https://doi.org/10.16309/j.cnki.issn.1007-1776.2003.03.004>
- De Luca, C., & Olefsky, J. M. (2008). Inflammation and Insulin Resistance. *FEBS Letters*, 582(1), 97–105.
- DeFronzo, R. A., & Abdul-Ghani, M. (2011a). Assessment and treatment of cardiovascular risk in prediabetes: Impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *American Journal of*

- Cardiology*, 108(3 SUPPL.), 3B-24B. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2011.03.013>
- DeFronzo, R. A., & Abdul-Ghani, M. A. (2011b). Preservation of β -cell function: The key to diabetes prevention. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(8), 2354–2366. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-0246>
- Díaz, O., Cabrera, E., Orlandi, N., Araña, M., & Díaz-Horta, O. (2011). Aspectos epidemiológicos de la prediabetes, diagnóstico y clasificación. *Revista Cubana de Endocrinología*, 22(1), 3–10.
- Ding, S., & Lund, P. K. (2011). Role of intestinal inflammation as an early event in obesity and insulin resistance. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 14(4), 328–333. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e3283478727>
- Elizalde Barrera, C. I., Estrada García, M. T., & Rubio Guerra, A. F. (2015). *Correlación del índice HOMA de resistencia a la insulina con los niveles de ácidos grasos libres y citocinas en sujetos con glucosa en ayuno normal y elevada*. *Journal of Chemical Information and Modeling*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. (2016), 2016, 1–154.
- Ferrannini, E., Balkau, B., Coppock, S. W., Dekker, J. M., Mari, A., Nolan, J., ... Mota, L. (2007). Insulin resistance, insulin response, and obesity as indicators of metabolic risk. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92(8), 2885–2892. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-0334>
- Furman, D., Campisi, J., Verdin, E., Carrera-Bastos, P., Targ, S., Franceschi, C., ... Slavich, G. M. (2019). Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nature Medicine*, 25(12), 1822–1832. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0675-0>
- Galic, S., Sachithanandan, N., Kay, T. W., & Steinberg, G. R. (2014). Suppressor of cytokine signalling (SOCS) proteins as guardians of inflammatory responses critical for regulating insulin sensitivity. *Biochemical Journal*, 461(2), 177–188. <https://doi.org/10.1042/BJ20140143>
- Govindarajan, G., Gill, H., Rovetto, M., & Sowers, J. R. (2006). What is insulin resistance? *Heart and Metabolism*, (30), 30–34.
- Gutiérrez Rodelo, C., Roura Guiberna, A., & Olivares Reyes, J. A. (2017). Molecular Mechanisms of Insulin Resistance: An Update MEDICAL GAZETTE OF MEXICO REVIEW ARTICLE Correspondence. *Gac Med Mex*, 153, 214–242.
- Halban, P. A., Polonsky, K. S., Bowden, D. W., Hawkins, M. A., Ling, C., Mather, K. J., ... Weir, G. C. (2014). β -Cell failure in type 2 diabetes: Postulated mechanisms and prospects for prevention and treatment. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99(6), 1983–1992. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-1425>

- Hotamisligil, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444(7121), 860–867.
<https://doi.org/10.1038/nature05485>
- Lahsen M, R., & Liberman G, C. (2003). Prevención De Diabetes Mellitus Tipo 2. *Revista Chilena de Nutrición*, 30(2). <https://doi.org/10.4067/s0717-75182003000200002>
- Lazo de la Vega Monroy, M. L., & Cristina, F. M. (n.d.). Oxidative Stress in diabetes mellitus and the Role of Vitamins with Antioxidant Actions. In *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases- A Role for Antioxidants* (pp. 209–232).
- Li, N., Fu, J., Koonen, D. P., Kuivenhoven, J. A., Snieder, H., & Hofker, M. H. (2014). Are hypertriglyceridemia and low HDL causal factors in the development of insulin resistance? *Atherosclerosis*, 233(1), 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.12.013>
- Llorente, Y., Enrique, P., Rivas, D., & Borrego, Y. (2016). Factores de riesgo asociados con la aparición de diabetes mellitus tipo 2 en personas adultas. *Revista Cubana de Endocrinología*, 27(2), 123–133.
Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-29532016000200002
- Lopes Cendes, I., Cendes, F., & Urquia Osorio, H. (2013). Análisis Molecular por Secuenciación del Exoma (Whole exome sequencing) para Identificación de Variantes Potencialmente Patogénicas en Encefalopatías Epilépticas en la Infancia (EEI) en América Latina. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Malo, M. S., Alam, S. N., Mostafa, G., Zeller, S. J., Johnson, P. V., Mohammad, N., ... Hodin, R. A. (2010). Intestinal alkaline phosphatase preserves the normal homeostasis of gut microbiota. *Gut*, 59(11), 1476–1484. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.211706>
- Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F., & Turner, R. C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28(7), 412–419. <https://doi.org/10.1007/BF00280883>
- McArdle, M. A., Finucane, O. M., Connaughton, R. M., McMorrow, A. M., & Roche, H. M. (2013). Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: Insights into the emerging role of nutritional strategies. *Frontiers in Endocrinology*, 4(MAY), 1–23.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00052>
- Najjar, S. (2003). Insulin Action: Molecular Basis of Diabetes. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–10.
<https://doi.org/10.1038/npg.els.0001402>
- Pandey, A. K., Pandey, G., Pandey, S. S., & Pandey, B. L. (2014). Human Biology of Diet and Lifestyle Linked Chronic Inflammatory Non- Communicable Disease Epidemic – A Review, 3(1), 25–42.
- Pérez Díaz, I. (2016). Diabetes Mellitus. *Gac Med Mex*, 152(1), 50–55. Retrieved from

https://www.anmm.org.mx/GMM/2016/s1/GMM_152_2016_S1_050-055.pdf

- Reaven, G. (2004). The metabolic syndrome or the insulin resistance syndrome? Different names, different concepts, and different goals. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 33(2), 283–303. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2004.03.002>
- Reaven, G. M. (2005). The insulin resistance syndrome: Definition and dietary approaches to treatment. *Annual Review of Nutrition*, 25, 391–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.24.012003.132155>
- Rhodes, C. J., & White, M. F. (2002). Molecular insights into insulin action and secretion. *European Journal of Clinical Investigation*, 32 Suppl 3, 3–13. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.32.s3.2.x>
- Russo, G. T., Giorda, C. B., Cercone, S., Nicolucci, A., Cucinotta, D., Leotta, S., ... Pellegrini, M. A. (2014). Factors associated with beta-cell dysfunction in type 2 diabetes: The BETADECLINE study. *PLoS ONE*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109702>
- Samuel, V. T., Petersen, K. F., & Shulman, G. I. (2010). Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet*, 375(9733), 2267–2277. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60408-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60408-4)
- Sears, D. D., & Kim, J. J. (2010). TLR4 and insulin resistance. *Gastroenterology Research and Practice*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/212563>
- Seino, S., Shibasaki, T., & Minami, K. (2011). Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. *J Clinical Investigation*, 121(6), 2118–2125. <https://doi.org/10.1172/JCI45680.2118>
- Sesti, G. (2006). Pathophysiology of insulin resistance. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 20(4), 665–679. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2006.09.007>
- Sharma, P. (2011). Inflammation and the Metabolic Syndrome, 26(4), 317–318. <https://doi.org/10.1155/2010/289645.123>
- Shaw, L. M. (2011). The insulin receptor substrate (IRS) proteins: At the intersection of metabolism and cancer. *Cell Cycle*, 10(11), 1750–1756. <https://doi.org/10.4161/cc.10.11.15824>
- Shoelson, S. E., Lee, J., & Goldfine, A. B. (2006). Review series Inflammation and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(7), 1793–1801. <https://doi.org/10.1172/JCI29069>.and
- Simon, T. D., Van Yserloo, B., Nelson, K., Gillespie, D., Jensen, R., McAllister, J. P., ... Blaschke, A. J. (2014). Use of quantitative 16S rRNA PCR to determine bacterial load does not augment conventional cerebrospinal fluid (CSF) cultures among children undergoing treatment for CSF shunt infection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 78(2), 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.06.027>
- States, I. (2014). Insulin Receptor Signaling in Normal. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6, 1–25.

Tinahones, F. J. (2008). Homeostatic Model Assessment (HOMA). Aplicaciones prácticas. *Avances En Diabetologia*, 24(4), 291–295.

Villanueva-Sosa, L. G., Cordero-Franco, H. F., & Salinas-Martínez, A. M. (2015). Prevalence of Prediabetes Based on Fasting Plasma Glucose and Glycosylated Hemoglobin in an At-Risk Mexican Population. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 13(8), 352–355.

<https://doi.org/10.1089/met.2015.0040>

Wilcox, G. (2005). Insulin and Insulin Resistance. *Clinical Biochemist Reviews*, 26(May), 19–39.