

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**Relación entre el polimorfismo A-2518G del gen MCP-1 y las
complicaciones microvasculares de la Diabetes Mellitus Tipo 2 en
pacientes mexicanos**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA:

AMAIRANY TORRES ALVAREZ

DIRECTORA

DRA. LILIA LÓPEZ CÁNOVAS

CODIRECTOR

DRA. MARÍA ELIZBETH ALVAREZ SÁNCHEZ

POSGRADO
EN CIENCIAS
GENÓMICAS

Ciudad de México, enero de 2019.

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

INTEGRACIÓN DEL JURADO:

Presidente: Doctora Elisa Irene Azuara Liceaga, UACM
Secretario: Doctora Lilia López Cánovas, UACM
Primer Vocal: Doctora María Elizbeth Alvarez Sánchez, UACM
Segundo Vocal: Doctor Mauricio Castañón Arreola

Lugar donde se realizó el posgrado:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

DIRECTOR DE TESIS:

Doctora Lilia López Cánovas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

CODIRECTOR DE TESIS:

Doctora María Elizbeth Alvarez Sánchez
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Agradecimientos

Por este medio quiero expresar mi agradecimiento a aquellas instituciones y personas que fueron imprescindibles para la realización y guía durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la ayuda económica que me brindó mediante la beca otorgada durante el periodo de julio de 2016 a julio de 2018 con No. de becario: 788913 y a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por las facilidades que me fueron proporcionadas a lo largo de mi formación en esta institución y por los recursos proporcionados a través del programa 11 de Proyectos Estudiantiles.

Agradezco al personal del Hospital General de Iztapalpa, y de forma muy especial al Dr. Fernando Fernández Pérez por las facilidades brindadas para la toma de muestras de pacientes y para el desarrollo de mis habilidades para mejorar mi desempeño en la interacción con los pacientes, agradezco también al personal del Centro de Salud Metropolitano en Ciudad Nezahualcóyotl, particularmente al Dr. Fernando Rodríguez Cortés, por todas las facilidades brindadas durante mi estancia en esta clínica para conseguir muestras de calidad y suficientes para la realización de este proyecto y finalmente a la Dra. Areli Yacelin Pérez Navarrete, Médico del plantel Del Valle de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, por su invaluable colaboración en la realización de la campaña de detección precoz de diabetes, hipertensión y obesidad que se realizó durante la realización de este proyecto.

Debo agradecer así mismo a la Dra. Lilia López Cánovas, por guiarme en la realización de esta tesis con tanta paciencia. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis.

Quiero expresar también mi agradecimiento a la Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez por su orientación al realizar esta investigación.

Así mismo es necesario agradecer a la Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga, al Dr. Mauricio Castañón Arreola y al Dr. Mario César López Camarillo por su paciencia, amabilidad y disponibilidad para ayudarme a mejorar la forma en que adquiero y formulo mis ideas.

Agradezco también a los profesores-investigadores del Posgrado en Ciencias Genómicas, particularmente al Dr. Máximo Martínez por su apoyo en el desarrollo de las técnicas que se llevaron a cabo para cumplir los objetivos planteados en este trabajo y a la Dra. Martha Yocupicio por haber provisto amablemente el set de primers para GAPDH que se empleó en este trabajo.

Además, agradezco la colaboración del Dr. Eduardo Carrillo Tapia para la secuenciación de amplicones que comprenden al polimorfismo A-2518G de *MCP-1* y a las secretarías del Posgrado en Ciencias Genómicas, Caty, Viviana y Danna por facilitar tanto como les fue posible mi estancia en este programa.

Finalmente agradezco a todos los integrantes del Posgrado en Ciencias Genómicas, especialmente a mis compañeros de laboratorio, Alejandra, Maribel, Carlos y Euclides, además de mi compañera de generación, Iraiz, por auxiliarme en tanto les fue posible a familiarizarme con las dinámicas de trabajo en las que me involucré para el desarrollo de esta tesis.

Dedicatoria

Como cualquier meta cubierta en mi vida, el completar este proceso, que fue la culminación de la Maestría en Ciencias Genómicas mediante la elaboración de esta tesis, no habría sido posible sin el apoyo emocional y fáctico de quienes me rodean y han hecho todo para que, desde mi nacimiento hasta este momento pueda completar cada proceso satisfactoriamente.

Algunas de estas personas han estado conmigo desde mucho antes de nacer, procurando mi bienestar, casi siempre a pesar del suyo, sacrificando más de lo que muchas personas serían capaces siquiera de entender. Por supuesto, me refiero a mis padres, Ma. Victoria Alvarez B. y J. Trinidad Torres O., quienes con mucho cariño han vigilado mi crecimiento.

Por otro lado, hay quienes han coincidido en mi vida después, como es el caso de mi pequeño hermano, Raúl, a quien adoro con toda mi alma y que siempre, sin importar que estuviera haciendo, tuvo tiempo de escucharme y darme alguna palabra de ánimo, un abrazo o un cariñoso beso. Hermanito, en compensación por arruinar tu cumpleaños, este trabajo es para ti, con todo mi amor.

Anita, eres de las pocas personas en mi familia que siempre ha estado conmigo, no siempre felices y disfrutando, mas bien muchas veces discutiendo, pero con todo y eso, aprecio que siempre has estado, que sin importar las diferencias que hemos llegado a tener, siempre puedo voltear a ti si tengo algún problema, es algo que no puedo dejar de agradecer.

Alondrita, eres la más pequeña de las personas que tengo en mi vida, y sin embargo ocupas un gran puesto en mi mente y corazón, deseo que seas tan grande como te lo propongas y que obtengas todo lo que sea bueno para ti. Quiero que leas esto en el futuro y te ayude a darte ánimos, y por que no, a inspirarte a ser siempre mejor, en lo que tú quieras.

En mi vida, no sólo he tenido la buena fortuna de tener una familia que adoro y me llena de orgullo, sino que también he tenido en mi camino a personas que, sin compartir un nexo de sangre han hecho cosas por mi que no esperarías de muchas de aquellas personas con quienes sí lo comparto.

Tía Tencha, es usted para mí no solo una persona muy amada, es toda una inspiración de lo que es vencer a las dificultades más grandes que puede haber en la vida, con gran fuerza y ánimo, cuando la veo a usted, cuando hablo con usted sé como se ve una persona con amor verdadero a la vida.

Y Yolanda, simplemente, sin tu ayuda esto no habría terminado bajo ningún concepto, gracias por ayudarme a mantenerme cuerda y centrada en las cosas que realmente importan a mi plan y a mis objetivos personales, sé que esto no es más que una parte de ese entrenamiento continuo que es la vida, y espero haber aprendido lo que debía.

Profa. Machuca, le agradezco infinitamente su orientación y ayuda antes, durante y sé que aún después del posgrado, no solo en lo conceptual sino en lo personal, soy realmente afortunada de haber contado con usted para comprender mejor el ambiente en el que me vi envuelta durante todo este tiempo.

Profesor Martín, Lupita y Ulises, si bien no les he involucrado en el proceso de producción de este documento, quiero plasmar aquí mi afecto por ustedes, son parte importante de mi familia y les agradezco que me permitan contemplarlos así, que me ayuden día con día a ser una mejor versión de mí y a no perder de vista mis objetivos.

Además de estas personas que me han guiado e inspirado a lo largo de mi vida y hasta este punto, están aquellos con quienes he crecido y evolucionado, quienes me han visto crecer y a quienes yo he podido ver a la vez, mis queridos amigos.

Paola, tú fuiste la primera persona a la que pude llamar así, y me da gusto que, a pesar del tiempo y la falta de contacto, aún pueda hacerlo sin pesar que estoy exagerando, y espero contar con tu amistad mucho tiempo más y que seamos capaces de apreciar el crecimiento una de la otra.

Martha, Karen, Eunice, Lupita, gracias por ser mis hermanitas, me ha encantado seguir con ustedes, seguir de cerca cada paso y éxito que han acumulado, y permitirles estar cerca de los míos. Por supuesto, quiero además agradecer mucho a Lupita por esos viajes catárticos a casa en los que ambas descansábamos y nos alegrábamos el día, es algo que realmente

extrañaré cuando no esté aquí, pero estoy tranquila por que sé que lo que haces lo harás siempre de forma impecable, como es que haces siempre las cosas.

Eco, gracias por escucharme, a cualquier hora y darme ánimos siempre que podías, siempre te he considerado un gran amigo, uno de mis amigos más importantes, y creo que has tomado parte importante en todo esto.

A mis amigos, Carlos y Alejandro, los adoro, nunca creí que al salir de la facultad saldría no solo con un título universitario, el objetivo principal, sino que además conocería a dos amigos que querría seguir frecuentando, de forma sincera, y en los cuales sé que puedo confiar para cualquier cosa. No saben cuanto aprecio que estén en mi vida y que me permitan estar en la suya, en todo lo que hemos vivido juntos, creo que nunca disolvimos ese equipo de laboratorio de 4° semestre pese al tiempo y los diferentes caminos que hemos tomado, es agradable saber que siempre tenemos a dónde volver.

Finalmente, Iraíz, gracias por permitirme acompañarte en esta aventura que fue la Maestría en Ciencias Genómicas, Me llevo un recuerdo grato de ti y espero que el día en que concluyamos este ciclo no sea también el momento de desaparecernos una de la otra, después de todo creo que es la primera vez que puedo decir que me agradó convivir con la generación completa de estudios en la que me encontré. En verdad, gracias por todo.

Agradezco la riqueza de experiencias que he vivido hasta el día de hoy, y el haber contado hasta este momento con tan excelente compañía, espero de corazón seguir contando con todas estas personas y con aquellas a quienes, por cuestiones de espacio pudiera haber omitido.

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
-------------	-------------

AGE	Productos de glicación avanzada del inglés Advanced Glycation End-Products
cRAGE	Receptor de Productos de Glicación Avanzada celular
CCL2	Quimiocina con motivo C-C ligando 2, del inglés C-C Motif Chemokine Ligand 2 (Ver MCP-1)
CCR2	Receptor 2 de quimiocina con motivo CC, del inglés C-C Motif Chemokine Receptor 2
DM	Diabetes mellitus
DMT1	Diabetes mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico, del inglés Deoxyribonucleic Acid
ESM	Error Estándar de la Muestra
EVC	Evento Vascular Cerebral
EVP	Evento Vascular Periférico
GAP	Proteína Aceleradora de la GTPasa, del inglés GTPase Accelerator Protein
GLUT	Transportador de glucosa, del inglés Glucose Transporter
ICAM	Molécula 1 de adhesión intercelular, del inglés Intercellular Adhesion Molecule 1
IMC	Índice de Masa Corporal
IR	Receptor de insulina, del inglés Insulin Receptor
IRS	Sustrato del receptor de insulina, del inglés Insulin Receptor Substrate
kDa	KiloDalton
Mac-1	Antígeno 1 de macrófago, del inglés Macrophage-1 antigen
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos, del inglés Monocyte Chemoattractant Protein

μg	Microgramos
ml	mililitro
mM	milimolar
μL	Microlitros
N/A	No aplica
NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, del inglés Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
ng	Nanogramo
NK	Natural Killer
pb	Pares de bases
pg	Picogramo
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasa, del inglés phosphatidylinositide 3-kinases
PDK1	Cinasa dependiente de fosfoinositidos-1, del inglés Phosphoinositide-dependent kinase-1
PKB	Proteín Cinasa B
PKC	Proteín Cinasa C
RAGE	Receptor de productos de glicación avanzada del inglés Receptor for Advanced glycation End-Products
RD	Retinopatía diabética
RNA	Ácido Ribonucleico, del inglés Ribonucleic Acid
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno, del inglés Reactive Oxygen Species
sRAGE	Receptor de Productos de Glicación Avanzada soluble
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido, del inglés Single Nucleotide Polymorphism
vWFA	Factor tipo A de von Willebrand, del inglés von Willebrand factor type A

Índice de contenidos

Agradecimientos	i
Dedicatoria.....	iii
Abreviaturas.....	vi
Índice de contenidos	viii
Índice de tablas.....	xi
Índice de figuras	xii
Resumen	1
Abstract.....	2
Introducción	3
1. Diabetes mellitus.....	3
1.1. Mecanismos celulares y moleculares relacionados con la fisiopatología de la DMT2	4
1.2. Signos y síntomas de la DMT2.....	7
1.3. Factores de riesgo de la DMT2	8
1.4. Epidemiología de la DMT2	10
1.5. Complicaciones vasculares de la DMT2.....	12
2. Productos de glicación avanzada (AGEs).....	16
3. Receptor de productos de glicación avanzada (RAGE)	18
4. Proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1)	19
4.1. Estructura de MCP-1	20
4.2. Gen <i>MCP-1</i>	21
4.3. Expresión y regulación de <i>MCP-1</i>	21

4.4. Funciones de MCP-1.....	22
5. Antígeno de macrófago-1 (Mac-1)	23
5.1.1. Estructura de Mac-1.....	23
5.1.3 Funciones y expresión de Mac-1	24
Antecedentes particulares	25
1. El polimorfismo A-2518G del gen <i>MCP-1</i>	25
2. El rol de MCP-1 en las enfermedades crónico-inflamatorias	28
3. El polimorfismo A-2518G de <i>MCP-1</i> y la expresión de <i>MCP-1</i> en las complicaciones vasculares y microvasculares de la DMT2	30
4. El polimorfismo A-2518G de <i>MCP-1</i> en población mexicana.....	31
5. La participación de Mac-1 en las complicaciones microvasculares de la diabetes	33
Hipótesis	35
Justificación	36
Objetivos.....	37
Objetivo general	37
Objetivos particulares	37
Estrategia experimental	38
Materiales y métodos.....	39
1. Tipo de estudio	39
2. Aprobación del comité de ética	39
3. Población de estudio.....	39
4. Colecta de muestra y toma de datos	41
5. Separación de plasma y células sanguíneas	42
6. Obtención de leucocitos.....	42
7. Extracción de DNA.....	42

8. Genotipificación del polimorfismo A-2518G de <i>MCP-1</i> por medio de PCR-RFLP	43
9. Cuantificación de MCP-1 por ELISA tipo sandwich	43
10. Extracción de RNA	44
11. Síntesis de cDNA.....	45
12. RT-PCR semicuantitativo de <i>Mac-1</i>	45
Análisis estadístico	46
Resultados.....	47
1. Datos demográficos	47
2. Obtención de plasma, células y DNA.....	49
3. Caracterización del polimorfismo A-2518G de <i>MCP-1</i>	50
4. Concentración plasmática de MCP-1 en los participantes	53
5. Determinación de la expresión de <i>Mac-1</i>	57
Obtención de RNA	57
Expresión de <i>Mac-1</i> en células polimorfonucleares.	58
Discusión	61
Conclusiones	66
Referencias.....	68
Anexo 1. Carta de aprobación del Hospital General de Iztapalapa	81
Anexo 2. Carta de consentimiento informado	82
Anexo 3. Cuestionario.....	84
Anexo 4. Productos derivados de este trabajo	95

Índice de tablas

Tabla 1. Ejemplos de algunos de los genes asociados con la DMT2	9
Tabla 2. Relación entre el polimorfismo A-2518G de <i>MCP-1</i> y enfermedades infecciosas, autoinmunes y crónico-degenerativas evaluadas en la población mexicana.....	32
Tabla 3. Datos demográficos de los participantes.	47
Tabla 4. Concentración y rendimiento de DNA obtenido de muestras de sangre de los participantes.	49
Tabla 5. Frecuencia alélica y de genotipos del polimorfismo A-2518G de <i>MCP-1</i>	52
Tabla 6. Rendimiento y calidad del RNA obtenido de muestras de sangre de los participantes.	58

Índice de figuras

Figura 1. Cascada de señalización de la insulina.	6
Figura 2. Impacto económico relativo de las principales complicaciones de la diabetes en México.	11
Figura 3. Dinámica de los factores que intervienen en la aparición y progresión de la nefropatía diabética.	14
Figura 4. Secuencia del proceso de síntesis de los productos de glicación avanzada.	17
Figura 5. Ruta de señalización de RAGE en las complicaciones vasculares de la DMT2.	18
Figura 6. Estructura secundaria de MCP-1.	20
Figura 7. Estructura del gen de <i>MCP-1</i>	21
Figura 8 Estructura transmembranal de Mac-1.	23
Figura 9. Patrón de restricción de la región que comprende al polimorfismo A-2518G de <i>MCP-1</i>	26
Figura 10. Ensayo de actividad de la luciferasa por estimulación de la región que contiene al polimorfismo A-2518G de <i>MCP-1</i>	27
Figura 11 Concentración de MCP-1 en sobrenadante de cultivo.	28
Figura 12. Genotipificación del polimorfismo A-2518G de <i>MCP-1</i>	50
Figura 13. Secuenciación del polimorfismo A-2518G de <i>MCP-1</i>	51
Figura 14. Evaluación de la concentración plasmática de MCP-1 en los diferentes grupos de estudio.	53
Figura 15. Evaluación de la concentración plasmática de MCP-1 de acuerdo con el genotipo..	54
Figura 16. Evaluación de la concentración plasmática de MCP-1 estratificada por grupos y genotipos	55
Figura 17 . Evaluación de la concentración plasmática de MCP-1 de acuerdo a la condición de salud: controles vs personas con DMT2.	56
Figura 18. Evaluación de la concentración plasmática de MCP-1 de acuerdo con el Índice de Masa Corporal (IMC)	57
Figura 19. Evaluación de la expresión relativa de <i>Mac-1</i>	58

Figura 20. Evaluación de la expresión relativa de <i>Mac-1</i> respecto al control	59
Figura 21 . Evaluación de la expresión relativa de <i>Mac-1</i> respecto al control (grupo/ genotipo del polimorfismo A-2518G de <i>MCP-1</i>).	60

Resumen

La diabetes mellitus tipo II (DMT2) es un problema de salud en México y el mundo, y se caracteriza por un aumento sostenido de la glucosa en sangre. Como consecuencia de la elevación en la concentración de la glucosa, se glican las proteínas y lípidos circulantes, entre otras macromoléculas, los cuales estimulan la expresión de moléculas proinflamatorias, lo cual lleva al desarrollo de complicaciones macro y micro vasculares. Estas complicaciones son la principal causa de muerte e invalidez de los pacientes diabéticos. La aparición y progresión de dichas complicaciones está condicionada por causas ambientales y genéticas. De estas últimas se considera a la variante alélica G del polimorfismo A-2518G del gen que codifica a la Proteína Quimioatrayente de Monocitos (MCP-1) como uno de los factores de riesgo relacionados a estos padecimientos. En nuestro estudio, se detectó que en la población mexicana el genotipo más frecuente en los pacientes con DMT2 que padecían complicaciones microvasculares fue el homocigoto G, con 48.6% en comparación con los grupos de controles y de diabéticos sin complicaciones. Sin embargo, en la muestra estudiada la presencia del genotipo GG no incrementó el riesgo de padecer complicaciones microvasculares de la DMT2. Por el contrario, el riesgo de padecer DMT2 se incrementa en los portadores del alelo G (O.R.= 2.57, I.C. =1.02-6.5, $p=0.04$). La concentración plasmática de MCP-1 no difirió ($\alpha=0.05$) entre los grupos de diabéticos y controles estudiados, ni dependió de la variante A-2518G de *MCP-1*. La expresión transcripcional del gen *Mac-1*, el cual codifica una molécula de adhesión, no se incrementó en los grupos de individuos estudiados ni se relacionó con la presencia de ninguna de las variantes del gen *MCP-1* analizadas.

En conclusión, el polimorfismo A-2518G de *MCP-1* no es un factor de riesgo de las complicaciones microvasculares de la DMT2 en la población mexicana.

Abstract

Type 2 diabetes (DMT2) is a worldwide and national health issue. It's characterized by a frequently elevated glucose concentration. As a consequence of the elevated glucose concentration, proteins and lipids, among other macromolecules are glycosylated, and proinflammatory molecules are produced, thus a chronic inflammation state is generated, provoking macro and microvascular diseases. Those macro and microvascular diseases are the main cause of death and disability among people who suffers from DMT2. The onset and progression of those vascular complications are conditioned by environmental and genetic factors. Among the last ones, it's considered that the allelic G variant of A-2518G polymorphism for the Monocyte Chemoattractant Protein (*MCP-1*) gene is a possible related factor. In our study we detected among mexican population that the homozygous genotype for G was more frequent, being 48.2%, among DMT2 patients who suffered of at least one microvascular complication than the group of patients who didn't suffer from those complications, without any risk indicator being significative. There was, however, a signifcative risk value comparing all DMT2 patients against the control group (O.R.= 2.57, I.C. =1.02-6.5, p=0.04). The plasmatic concentration of MCP-1 was not significantly different ($\alpha=0.05$) among groups of patients and healthy individuals, neither by the allelic variant of A-2518G polymorphism they carried. Transcriptional *Mac-1* expression is not increased in neither of the groups studied nor is related to any of the *MCP-1* variants analyzed in this study. In summary, *MCP-1* A-2518G polymorphism is not a risk indicator for diabetic microvascular complications in Mexican population.

Introducción

1. Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad compleja caracterizada por una elevación persistente en la concentración de glucosa en sangre producto de defectos en la secreción y/o la actividad de la insulina (Pedicino, Francesca, Alessandro, Trotta, & Liuzzo, 2012).

De acuerdo con la etiopatogenia de la DM, esta enfermedad se ha clasificado en dos tipos fundamentales, denominados 1 (DMT1) y 2 (DMT2) (Lazo-de-la-Vega-Monroy & Fernández-Mej, 2013).

La DMT1 se caracteriza por una producción deficiente de insulina. En general, se considera que es de origen autoinmune por la acción de linfocitos T contra las células β pancreáticas, las cuales son las únicas células que producen insulina. Debido a que la causa de este tipo de diabetes es la falta de insulina, se puede controlar mediante la aplicación de esta hormona, por lo que se denomina como insulino-dependiente. Usualmente la DMT1 se desencadena en etapas tempranas de la vida y es el tipo menos frecuente a nivel mundial, comprendiendo alrededor del 5% de los casos totales de diabetes (Atkinson, 2012).

Por otro lado, la DMT2 se caracteriza por la resistencia a la insulina, debido a que la interacción entre la insulina y su receptor es deficiente, por lo que no se genera la señalización intracelular necesaria para que se internalice la glucosa. Este tipo de diabetes se denomina también no insulino-dependiente (Pedicino et al., 2012). La DMT2 se inicia usualmente durante la edad adulta y se vincula fuertemente no sólo con los antecedentes familiares del paciente, sino también con el estilo de vida del mismo (Botros et al., 2017). Se considera que alrededor del 95% del total de los casos de diabetes se agrupan en DMT2 (United States, Department of Health and Human Services, & Pan American Health Organization, 2010).

Además de estos dos tipos de diabetes, durante el embarazo pueden ocurrir incrementos en la concentración de glucosa en sangre, lo cual provoca la llamada diabetes gestacional. Aunque en estos casos, después del parto se regula la glicemia, el haber padecido diabetes gestacional aumenta el riesgo a desarrollar en el futuro DMT2 (Herath, Herath, & Wickremasinghe, 2017).

1.1. Mecanismos celulares y moleculares relacionados con la fisiopatología de la DMT2

La homeostasis de la glucosa se desregula durante la DMT2 debido a que se modifica la interacción de la insulina con el receptor, inhabilitando la cascada de señalización que depende de esta. En consecuencia, se afectan los mecanismos de regulación del metabolismo de lípidos, carbohidratos y proteínas, y se activan rutas de inflamación.

1.1.2 Producción y mecanismos de señalización de la insulina

La insulina es una hormona secretada por las células β pancreáticas que se localizan en los islotes de Langerhans. La forma madura de esta proteína consiste de dos cadenas, A y B, unidas por medio de puentes disulfuro. La cadena A, posee 21 aminoácidos, mientras que la B, 30 aminoácidos, para un total de 51 aminoácidos y un peso molecular de 5.8 kDa (Pandeyarajan et al., 2016). Esta hormona está implicada en la regulación de diversas rutas metabólicas, como la síntesis proteica, el metabolismo de lípidos y la mitogénesis entre otras (Boucher, Kleinridders, & Kahn, 2014), aunque su principal función es la de regular el metabolismo de los carbohidratos.

La producción de insulina en las células β pancreáticas se inicia cuando la glucosa ingresa a éstas por medio de los transportadores de glucosa GLUT2. Al ingresar la glucosa a la célula pancreática y metabolizarse a través de la glucólisis se produce ATP, con lo cual los canales de K^+ se cierran y la membrana celular se despolariza. Finalmente, al ingresar iones de Ca^{2+} se estimula la exocitosis de la insulina (Rasmussen, Zawulich, Ganesan, Calle, & Zawulich, 1990).

La insulina es liberada al torrente sanguíneo y, a través de este, llega a sus células blanco, que son principalmente los miocitos y adipocitos (Boucher et al., 2014).

Como se mencionó anteriormente, la insulina realiza diversas funciones, sin embargo, la más importante, relacionada con el desarrollo de la diabetes, es la internalización de la glucosa a las células.

Esto se consigue de forma inicial mediante la interacción de la insulina con el receptor de insulina (IR), el cual pertenece a la familia de receptores tirosina-cinasa. El IR consiste de

dos subunidades α y dos subunidades β . Las subunidades α impiden la autofosforilación de las subunidades β hasta que interactúen con su ligando (Saltiel & Kahn, 2001).

Al interactuar la insulina con la subunidad α del IR, la subunidad β se autofosforila, con lo cual puede interactuar con el sustrato del receptor de la insulina (IRS). IRS a su vez activa la vía PI3K/AKT, la cual activa a las proteínas cinasas B y C, que a continuación activan al receptor G pequeño. Este último permite la translocación del Transportador de glucosa 4 (GLUT4) del citoplasma a la membrana celular, para que permita la entrada de glucosa al interior de las células (Figura 1) (Boucher et al., 2014). Además de esta acción, la activación de la vía PI3K/Akt enciende una gran variedad de rutas de señalización que estimulan la proliferación y reprimen la apoptosis, a la vez que aumentan la adipogénesis y la síntesis de glucógeno y de proteínas (Pinzón, Serrano y Sanabria, 2009).

En la diabetes, al haber deficiencias en la producción o en la señalización mediada por la insulina, las funciones en las que participa se ven afectadas, principalmente en lo que concierne al transporte de glucosa al interior de las células.

En la DMT2, se reporta que existe un fenómeno denominado como resistencia a la insulina, que se caracteriza por deficiencias en el mecanismo de señalización de la insulina. Se reporta que la resistencia a la insulina se asocia a la DMT2 y se presenta usualmente de 10 a 20 años antes de que sea diagnosticada, encontrándose de forma consistente en pacientes con DMT2, por lo que se considera el mejor predictor de esta enfermedad (Lillioja et al., 1993).

El fenómeno de resistencia a la insulina ocurre debido a que la cascada de señalización mediada por esa hormona o no se desencadena o se interrumpe en algún punto. Si ocurre una interacción deficiente entre la insulina y las subunidades α del IR o errores en la autofosforilación de las subunidades β , como la fosforilación de residuos de serina o treonina, no se desencadena la cascada de señalización de la insulina. La activación de

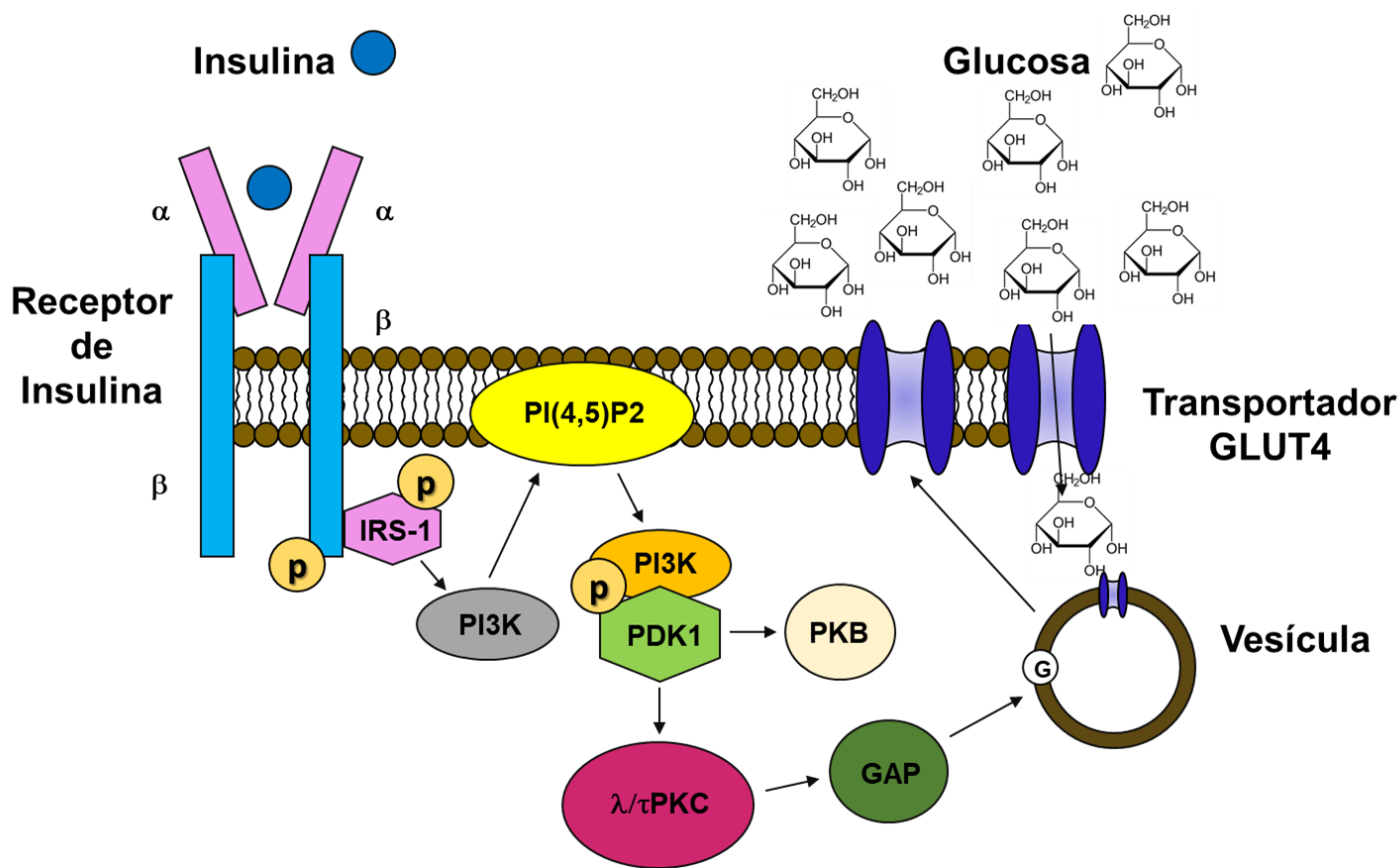


Figura 1. Cascada de señalización de la insulina. En condiciones fisiológicas la interacción de la insulina con las subunidades α del receptor de insulina desencadena una serie de reacciones de fosforilación que activan las vías de transducción (PI3K/Akt y MAPK) que finalizan con la translocación del transportador GLUT-4 a la membrana celular. IRS: Sustrato del receptor de Insulina; PI3K: Fosfoinositol 3-cinasa; PI(4,5)P2: Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; pPI3K: Fosfoinositol 3-cinasa; PDK1: cinasa dependiente de fosfoinositidos-1; PKC: Proteína cinasa C; PKB: Proteína cinasa B; GAP: Proteína aceleradora de la GTPasa. Modificado de Olivares Reyes y Arellano Plancarte, 2008.

elementos cascada abajo también puede interrumpirse, aunque exista una adecuada interacción de la insulina con su receptor, si la molécula IRS se autofosforila y no interactúa con el IR para activar la señal río abajo, así como en puntos intermedios de la cascada de señalización como en la activación de la proteína cinasa C (PKC) o proteína cinasa B (PKB), también conocida como AKT o la señalización de la proteína G pequeña que media el tráfico vesicular (Olivares Reyes y Arellano Plancarte, 2008).

Se ha planteado la hipótesis de que la resistencia a la insulina se favorece también por el aumento de metabolitos derivados de ácidos grasos como diacilglicerol, acetil coenzima

A o ceramidas, los cuales activan la cascada de cinasas serina/treonina, que fosforilan estos aminoácidos en el IRS (Boucher et al., 2014).

Así mismo, se ha reportado que en la etiopatogenia de la diabetes, al igual que en diversas enfermedades crónicas no transmisibles, están involucradas moléculas que participan en el proceso inflamatorio (Cefalu, 2009). La resistencia a la insulina está vinculada con la inflamación mediante la activación de la ruta de NFκB, que activa la fosforilación de residuos de serina y treonina del IR, que, como se expuso anteriormente, inhibe la fosforilación de los residuos de tirosina que normalmente permiten la correcta señalización de la insulina. Se ha demostrado, de forma adicional a la inhibición de los mecanismos de señalización que se modifican en la resistencia a la insulina, que algunas moléculas proinflamatorias, como IL-6, inhiben la expresión de GLUT4 (Chen, Chen, Wang, & Liang, 2015).

1.2. Signos y síntomas de la DMT2

Los signos y síntomas de la DMT2 están determinados por los mecanismos fisiológicos que intentan mantener la homeostasis celular cuando se incrementa la concentración de glucosa en sangre y por la alteración de los procesos metabólicos en los cuales está involucrada la glucosa. Los principales síntomas que padecen los pacientes diabéticos se conocen como la triada de las tres P's, polidipsia, polifagia y poliuria.

El primero de estos síntomas es la polidipsia, esto es, aumento en la necesidad de ingerir líquidos, debido a que al aumentar la osmolaridad de la sangre por el aumento de glucosa, se requiere una mayor cantidad de líquidos para mantener una concentración isotónica de la sangre (Ozougwu, 2013). Derivado del aumento en la ingesta de líquidos ocurre un incremento en la frecuencia de la micción (poliuria). Esto ocurre, ya que al haber una mayor cantidad de líquidos en el organismo, se incrementa la filtración glomerular en el riñón, provocando un aumento en el volumen de la orina (Wang, Mitu, & Hirschberg, 2008).

Otro síntoma que se presenta durante la diabetes es la polifagia. Quienes padecen DMT2 presentan una elevada concentración de glucosa en la sangre, pero los mecanismos para que esta pueda ingresar a las células y ser utilizada en la producción de energía se encuentran impedidos, por lo tanto, las células envían señales de hambre al cerebro con el objetivo de ingresar glucosa a estas. Al estar constantemente activas estas señales de

apetito en el cerebro de los pacientes, ellos padecen de hambre de forma constante (Ozougwu, 2013).

Entre los signos más comunes está la pérdida de peso. Se podría considerar que esto es contrario a la polifagia que se mencionó anteriormente, sin embargo, al haber una deficiencia en la utilización de glucosa como fuente de energía, se recurre a la grasa almacenada en el cuerpo del individuo como fuente de energía (Yang et al., 2016). Debido a que la fuente de energía son los lípidos, se producen metabolitos producto de la lipólisis, que son tóxicos, denominados cuerpos cetónicos. Estos acidifican la sangre del individuo y son potencialmente mortales (Ozougwu, 2013).

Además de los signos y síntomas antes mencionados, se debe mencionar que los individuos diabéticos son más susceptibles a padecer enfermedades infecciosas dado que el sistema inmune de estos individuos se altera, ya que se mantiene un estado inflamatorio de forma crónica (Grossmann et al., 2015).

1.3. Factores de riesgo de la DMT2

La DMT2 es una enfermedad compleja, es decir, en su etiopatogenia están involucrados factores genéticos y ambientales. Además de que se ha observado agregación familiar en los pacientes diabéticos. Hasta el 2017, se habían identificado, por medio de estudios tipo GWAS, 80 genes asociados a la enfermedad (Frau, Crowther, Ruetten, & Allebrandt, 2017). Sin embargo, estos explican solamente el 5.7% de la etiopatogenia de la enfermedad.

Los genes asociados hasta el momento a la presencia de diabetes están relacionados con el metabolismo de la glucosa y lípidos, con la cascada de señalización de la insulina, y con inflamación (Cefalu, 2009), ejemplos de estos últimos son *IL-6*, *IL-1*, *TNF- α* y *MCP-1* (Proteína quimioatrayente de monocitos), entre otros (Tabla 1) (Frau et al., 2017; Montesanto et al., 2018; Wellen, 2005).

Tabla 1. Ejemplos de algunos de los genes asociados con la DMT2

Gen asociado	Función	Autor que lo reporta
<i>TCF7L2</i>	Factor de transcripción	Frau et al, 2017
<i>HNF1A</i>	Receptor nuclear	
<i>FTO</i>	Metabolismo de los lípidos	
<i>PLCG1</i>	Regulación de cascadas de fosforilación	
<i>PPARG</i>	Metabolismo de los lípidos	
<i>COBLL1</i>	Unión a actina y cadherina	
<i>GATAD2A</i>	Regulador transcripcional	
<i>TERT</i>	Proteína asociada a la telomerasa	Montesanto et al., 2018
<i>IGF2BP2</i>	Transportador de mRNA	
<i>TNF-α</i>	Citocina proinflamatoria	Wellen, 2005
<i>IL-1,6,8,10,18</i>	Regulación de células del sistema inmune	
<i>MCP-1</i>	Quimiocina	

Por otro lado, los factores ambientales involucrados en la etiopatogenia de la diabetes son diversos y consisten principalmente en hábitos poco saludables como una mala nutrición y el sedentarismo (Pedicino et al., 2012).

Se considera que la DMT2 forma parte del síndrome metabólico, por lo que igual que en éste, la DMT2 se asocia, además de con la resistencia a la insulina, con el sobrepeso, la obesidad, la hipertensión y las dislipidemias (Alberti, Zimmet, & Shaw, 2005).

Otros factores que podrían favorecer la aparición de DMT2 son el haber padecido diabetes gestacional, ovario poliquístico, depresión y tener una edad mayor a 40 años (United States et al., 2010).

1.4. Epidemiología de la DMT2

La diabetes mellitus es un problema de salud importante a nivel mundial, ya que, en 2014, la prevalencia ascendía a 8.5% y en 2015 fue la causa de 1.6 millones de muertes. Según la OMS, en 2030 la diabetes será la séptima causa de mortalidad a nivel mundial.

Por otro lado, en México la prevalencia es del 9.4%, siendo más elevada en mujeres y en individuos mayores de 60 años (Morales, González, & Kalb, 2016). Por otro lado, la mortalidad por diabetes mellitus se ha incrementado sistemáticamente desde 1998, alcanzando las 94,029 defunciones en 2014 (Fmidete, 2016).

Por otra parte, en México solo el 15.2% de los individuos que padecen diabetes se monitorean periódicamente la hemoglobina glicosilada y el 46.4% de los pacientes diabéticos no toman ninguna medida preventiva de las complicaciones de la enfermedad (Morales et al., 2016).

El control inadecuado de la enfermedad conlleva al desarrollo acelerado de complicaciones vasculares en los pacientes diabéticos. Entre ellas se encuentran las cardiopatías y los eventos cerebrovasculares, los cuales constituyen la causa de muerte del 50 % de los pacientes con diabetes. Otra complicación frecuente es la nefropatía diabética. Se reporta que la diabetes es una de las principales causas de insuficiencia renal, y que entre el 10 y 20 % de los pacientes con diabetes mueren por esta causa (Fmidete, 2016).

Por otro lado, la diabetes y sus complicaciones no solo generan un fuerte impacto en la calidad de vida de los individuos que la padecen, sino también, impactan de forma directa e indirecta la economía personal y el gasto público.

Se estima que, hasta 2014, el costo global de la diabetes fue de 825 billones de dólares al año, y cerca del 60% de los gastos totales se llevaron a cabo en países de ingresos medios y bajos, en los cuales una parte sustancial de los gastos son cubiertos por el paciente, lo cual afecta la adherencia al tratamiento y genera problemas económicos para el individuo y personas cercanas a este (NCD Risk Factor Collaboration, 2016).

Adicionalmente, en México, al ser la diabetes mellitus un problema importante de salud, el impacto económico que posee es relevante. Se estima que en 2013, la carga económica

por DMT2 fue de 362859.82 millones de pesos, lo cual representa el 2.25 % del PIB correspondiente a ese año. De esta suma, 179,495.33 millones de pesos se emplearon para cubrir gastos directos, es decir, aquellos que derivan directamente del tratamiento de la DMT2 y sus complicaciones, por parte tanto de las instituciones de salud pública como de los individuos que padecen esta enfermedad. De este total, se estima que el 87% de los gastos directos proceden del tratamiento de las complicaciones de la DMT2. Por otro lado, se invirtió 183,364.49 millones de pesos en gastos indirectos, los cuales derivan de la pérdida de productividad del individuo, así como de la muerte prematura del mismo (Fundación Mídete, 2016).

En 2011 se reveló que el principal costo de la diabetes recae en el tratamiento de sus complicaciones vasculares, principalmente la nefropatía diabética, además de retinopatía, enfermedades cardiovasculares secundarias a la diabetes, neuropatía diabética y enfermedad cardiovascular periférica (Figura 2) (Arredondo, Icaza, 2011).

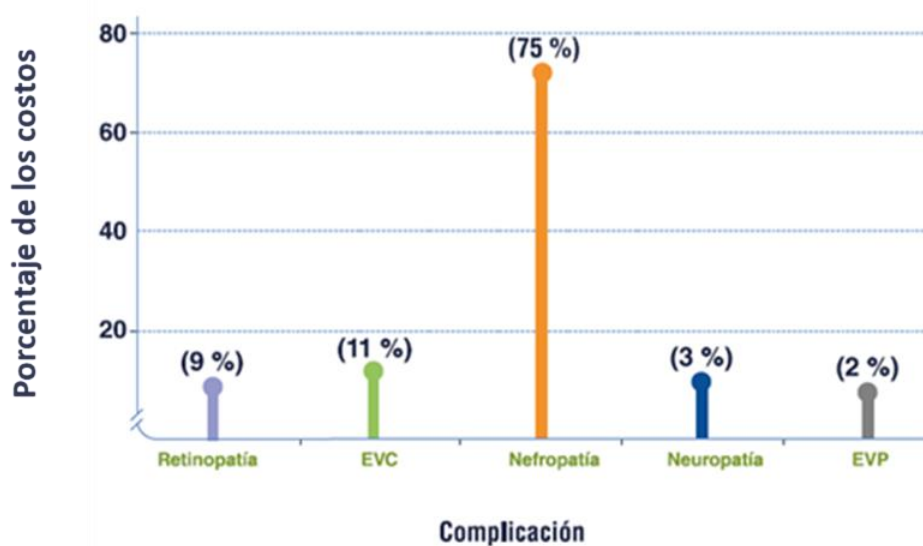


Figura 2. Impacto económico relativo de las principales complicaciones de la diabetes en México. Se observa que la complicación de mayor impacto es la nefropatía diabética. EVC: Evento Vascular Cerebral; EVP: Evento Vascular Periférico. Tomado de Arredondo Icaza, 2011.

1.5. Complicaciones vasculares de la DMT2

Los pacientes con DMT2 pueden presentar a largo plazo una gran variedad de complicaciones macro y microvasculares, las cuales afectan de forma importante la calidad de vida, capacidad laboral, y a la postre la sobrevivencia de los mismos.

1.5.1. Complicaciones macrovasculares

Se considera como complicaciones macrovasculares a aquellas que involucran daño cardiovascular, como son la cardiopatía isquémica o la insuficiencia cardíaca. Estas en general se ven mediadas por la aterosclerosis, que es la formación de placas de ateroma en las arterias con lo cual se reduce el diámetro del lumen vascular (Chawla, Chawla, & Jaggi, 2016).

Se considera que la aterosclerosis ocurre como consecuencia de la inflamación crónica que aparece durante la diabetes y del daño que sufre la pared arterial del sistema vascular periférico o coronario debido a la acumulación de los lípidos oxidados derivados de las LDL en el endotelio vascular. Posteriormente, en la pared arterial se infiltran monocitos que a continuación se diferencian en macrófagos y que finalmente se transforman en células espumosas al acumular lípidos oxidados. Estas últimas atraen linfocitos T, los cuales inducen la proliferación de células endoteliales, así como la acumulación de colágeno, y la formación de una lesión aterosclerótica con una capa fibrosa, cuya ruptura lleva a padecer infartos agudos vasculares (Fowler, 2008).

1.5.2 Complicaciones microvasculares

Las complicaciones microvasculares son todas aquellas que no involucran daño cardiovascular directo, sin embargo, ocurren donde los requerimientos de glucosa no son dependientes de la actividad de la insulina, ya que estos tejidos están expuestos a concentraciones de glucosa semejantes a las que existen en el torrente sanguíneo. El daño microvascular es el resultado de la combinación del daño directo mediado por la glucosa, el estrés oxidativo y la producción de sorbitol y productos de glicación avanzada (AGEs). Estas lesiones metabólicas provocan a su vez que existan cambios en el flujo sanguíneo y en la permeabilidad de los vasos sanguíneos, la deposición extravascular de proteínas y la coagulación (Vithian & Hurel, 2010).

1.5.2.1. Nefropatía diabética

La nefropatía diabética tiene un gran impacto en la vida de los individuos diabéticos, no solo por la carga económica que conlleva su tratamiento, sino también porque es la complicación microvascular que genera el mayor número de muertes.

En general, se consideran como factores de riesgo modificables para padecer nefropatía diabética el padecer hipertensión, dislipidemias y falta de control glicémico, mientras que entre los factores no modificables están la edad, origen étnico y perfil genético (Nazar, 2014).

De forma temprana, la nefropatía diabética se diagnostica ya que aparecen concentraciones bajas pero anormales de albumina en la orina, lo cual se denomina microalbuminuria. Esto puede presentarse incluso al momento del diagnóstico de DMT2. Entre el 20% y 40% de los pacientes con DMT2 con microalbuminuria evolucionan hacia la nefropatía establecida, y alrededor del 20% desarrollan enfermedad renal crónica. En esta última es fundamental que el paciente reciba terapia de remplazo renal como es la diálisis o el trasplante de riñón (Lim, 2014).

La nefropatía diabética se origina por la interacción de diversos factores, como son factores hemodinámicos, factores de crecimiento, factores de transcripción, moléculas de señalización celular como las citocinas y la activación de procesos inflamatorios (Figura 3) (Lim, 2014).

En la nefropatía diabética ocurren cambios funcionales y estructurales renales. En los glomérulos hay expansión mesangial, engrosamiento de la membrana basal y glomerulosclerosis nodular. En la nefropatía diabética temprana, se presenta hipertrofia tubular, precedida por fibrosis intersticial y atrofia tubular, junto con hialinosis arteriolar. En casos avanzados, ocurre la infiltración de macrófagos y linfocitos T en los glomérulos. Funcionalmente, existe hiperfiltración glomerular y un aumento en la excreción de albúmina, y de forma crónica aumenta la proteinuria y disminuye la tasa de filtración glomerular (Lim, 2014).

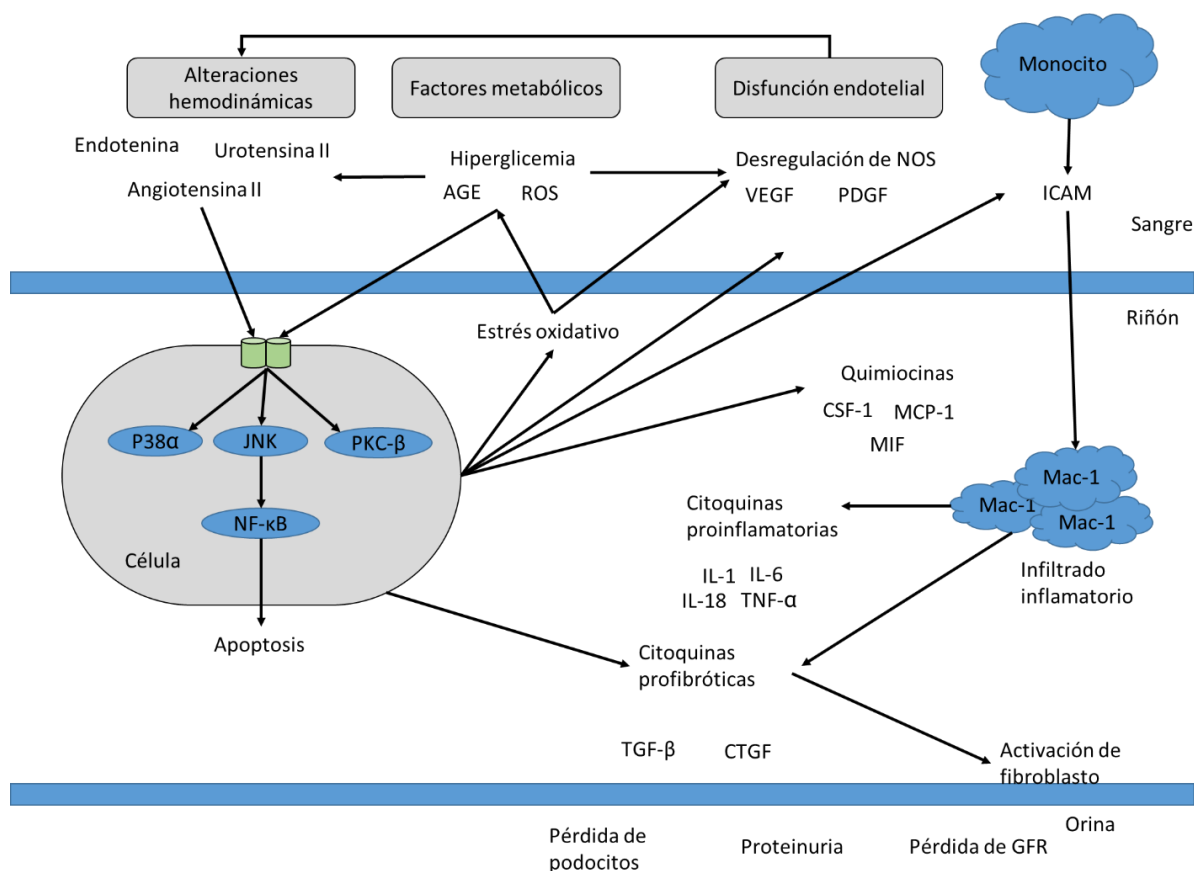


Figura 3. Dinámica de los factores que intervienen en la aparición y progresión de la nefropatía diabética. La interacción de factores metabólicos y procesos homeostáticos favorece la expresión de moléculas proapoptóticas y proinflamatorias que desencadenan daño celular en las nefronas. Modificado de Lim, 2014.

1.5.3.2. Pie diabético

El pie diabético es un pie con heridas o úlceras en una persona que padece de diabetes, y se produce debido a la disfunción de los nervios periféricos en estos pacientes (del Castillo-Tirado *et al*, 2014). El pie diabético es una de las complicaciones microvasculares más temidas entre quienes padecen DMT2, al tener como posible desenlace el perder las extremidades inferiores. Se estima que alrededor del 15% de los pacientes de DMT2 padecen lesiones ulcerosas características del pie diabético, de los cuales entre el 15 y 20% de los individuos requerirán de alguna amputación (del Castillo-Tirado *et al*, 2014). Las úlceras derivadas del pie diabético son el resultado de la interacción de diversos factores, como son la neuropatía diabética, isquemia y enfermedad vascular periférica.

Por un lado, la neuropatía periférica provoca que exista un desbalance entre la flexión y extensión del pie dañado, lo cual lleva a deformidades del mismo, que conllevan a la ruptura de la piel y ulceraciones de la misma; además, la neuropatía llevará a una disminución de la sudoración, favoreciendo la deshidratación de la piel y volviéndola más susceptible a padecer fisuras y posteriormente, infecciones. Finalmente, estas lesiones se agravan ya que, al haber pérdida de la sensibilidad, el individuo es incapaz de percatarse de las lesiones que sufre (Pendsey, 2010).

1.5.3.3. Retinopatía diabética

La retinopatía diabética (RD) es una enfermedad crónica progresiva, que se asocia a hiperglucemia prolongada, es considerada la principal causa de discapacidad visual en los adultos en edad laboral (IMSS, 2015).

A nivel fisiopatológico, la hiperglucemia mantenida induce una serie de cambios en el metabolismo glucídico y en la pared vascular, lo cual conlleva a padecer microangiopatías a nivel de las arteriolas, capilares y vénulas. Esto tiene como consecuencia la alteración de la permeabilidad de los vasos sanguíneos y, con ello, a la aparición de edema. La alteración de la pared vascular también provoca que se active la cascada proangiogénica, con la formación de nuevos vasos sanguíneos, que clínicamente producirán la retinopatía proliferante con hemorragias y tracciones sobre la retina (Aliseda y Berástegui, 2008).

La presencia de la retinopatía diabética proliferante indica que el paciente tiene un mayor riesgo cardiovascular, con una tasa aumentada de infarto agudo de miocardio, de amputación y de muerte. Si el paciente diabético no presenta retinopatía diabética, su riesgo de padecer cualquiera de estas complicaciones será del 4%, si tiene microaneurismas será del 10%, si presenta hemorragias y exudados será del 59% y si lo que presenta es una retinopatía proliferante será del 68% (Aliseda y Berástegui, 2008).

1.5.3.4. Neuropatía periférica

La neuropatía diabética es un padecimiento que aqueja aproximadamente al 50% de los individuos diabéticos. La principal característica de la neuropatía diabética es la destrucción de terminales nerviosas, lo cual tiene por principales síntomas dolor,

cosquilleo, entumecimiento, debilidad muscular y pérdida de sensibilidad. La pérdida de sensibilidad a su vez lleva al paciente a sufrir lesiones ulcerosas, que al perderse la sensibilidad son difíciles de detectar, lo cual a su vez permite la progresión de lesiones ulcerosas como pie diabético, evolucionando incluso a la amputación de la extremidad afectada (Fowler, 2008).

2. Productos de glicación avanzada (AGEs)

Los productos de glicación avanzada (AGEs) son moléculas que se forman como resultado de una reacción no enzimática entre el grupo carbonilo de una molécula de glucosa o alguno de sus derivados metabólicos y el grupo amino terminal de alguna proteína, lípido o ácido nucleico (Stirban, Gawlowski, & Roden, 2014).

En general, los AGEs se forman constantemente como subproductos del metabolismo, sin embargo, cuando estos alcanzan una abundancia excesiva, se convierten en moléculas relacionadas a un proceso patológico.

Estas moléculas pueden ingresar al organismo a partir de fuentes endógenas y exógenas. Las fuentes exógenas son principalmente a partir de alimentos ricos en lípidos y que se someten a altas temperaturas, como es el caso de las carnes grasas, que usualmente se someten a procesos de cocción agresivos (Uribarri et al., 2010).

Por otro lado, los AGEs endógenos se sintetizan a partir de la glucosa y sus derivados metabólicos, y de otras macromoléculas, como son lípidos, ácidos nucleicos y proteínas. Estas interacciones se dan de forma normal en todos los individuos y generan moléculas transitorias denominadas bases de Schiff, al interactuar el grupo amino de proteínas con el grupo carbonilo de la glucosa y sus derivados metabólicos. Estos compuestos son poco estables debido a que se forman mediante enlaces no covalentes y estas uniones se deshacen fácilmente en individuos metabólicamente sanos. Por otro lado, en individuos diabéticos, al tener una concentración de glucosa elevada de forma persistente estas moléculas tienen mayor probabilidad de interactuar entre sí, llevando a la formación de enlaces covalentes, con lo cual se generarán moléculas glicadas denominadas productos de Amadori o productos de Heyns. Estos productos, al poseer enlaces covalentes, a diferencia de las bases de Schiff, son altamente estables y pueden permanecer en el

organismo por largos periodos. Un ejemplo de estos es la hemoglobina glicosilada, que tiene una duración de 120 días en el organismo, hasta que es desechada junto con el eritrocito en el cual se encuentra. Sin embargo, no todos los productos de Heyns y de Amadori pueden ser eliminados, y debido a ello, posteriormente, se convierten en AGEs mediante una serie de procesos de oxidación, deshidratación y condensación (Figura 4) (Takeuchi, 2016).

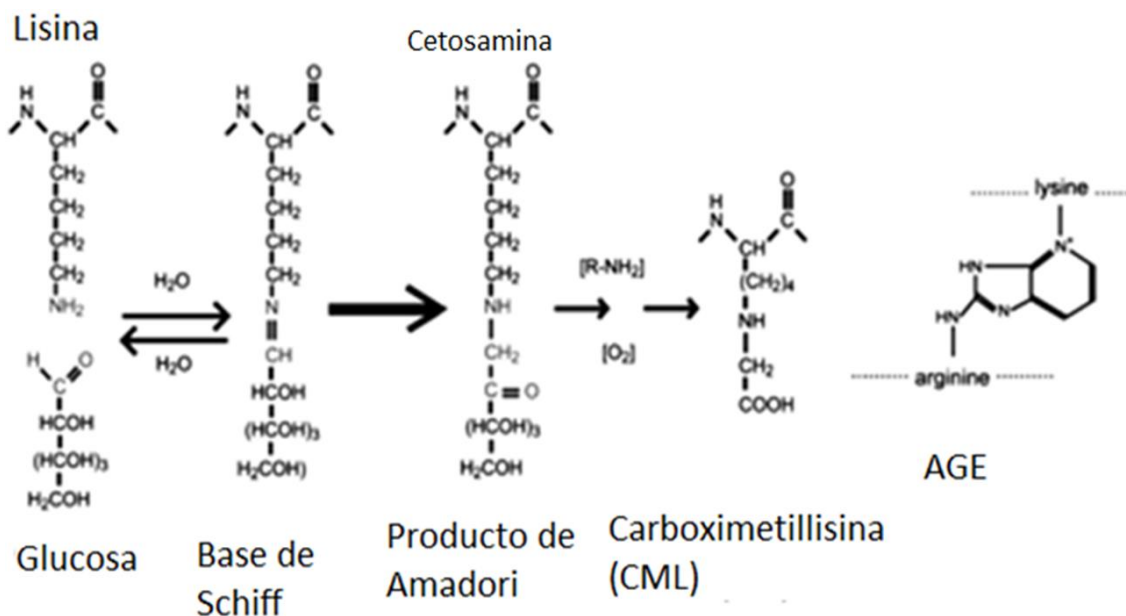


Figura 4. Secuencia del proceso de síntesis de productos de glicación avanzada. La interacción de glucosa y sus derivados metabólicos con proteínas y otras biomoléculas lleva a la síntesis de bases de Schiff, y a largo plazo, a la síntesis de productos de glicación avanzada. Modificado de Botros et al, 2017.

Los AGEs, tienen una estructura reticulada, altamente estable que los hace difíciles de eliminar, por lo que alteran la estructura de las biomoléculas a partir de las cuales se formaron. Además de las alteraciones estructurales y funcionales a las cuales pudiera llevar, también generan daño en el endotelio vascular mediante la interacción de estos productos con receptores localizados en la membrana de las células endoteliales, denominados receptores de productos de glicación avanzada (RAGE) (Botros et al., 2017).

3. Receptor de productos de glicación avanzada (RAGE)

El receptor de productos de glicación avanzada (RAGE) pertenece a la familia de las inmunoglobulinas. Su estructura general consta de dos regiones constantes (C) y una región variable (V) (Braley et al., 2016). El RAGE se presenta en tres isoformas, una celular y dos solubles. En el caso de la isoforma celular (cRAGE), además de los dominios antes mencionados, RAGE posee un dominio transmembranal y otro citoplásmico. Por otro lado, las isoformas solubles (sRAGE) se producen por dos vías, una es mediante 'splicing' alternativo (esRAGE) y otra es por el corte proteolítico de cRAGE, separando a la región C2 del dominio transmembranal (Raucci et al., 2008).

RAGE interactúa con sus ligandos, que poseen cargas negativas, por medio de las regiones V y C1, que contienen aminoácidos básicos. Algunos de sus ligandos son la proteína β amiloide, las proteínas S100 y AGEs (Koch et al., 2010).

Para la generación de una señal intracelular es necesario que RAGE se dimerice al interactuar con su ligando. Al dimerizarse RAGE, permite la activación de una cascada de señalización que lleva a la activación de rutas como PI3K/AKT, a su vez activando los factores de transcripción como AP-1 y NF κ B (Figura 5) («KEGG PATHWAY: AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications - *Homo sapiens* (human)», 2018).

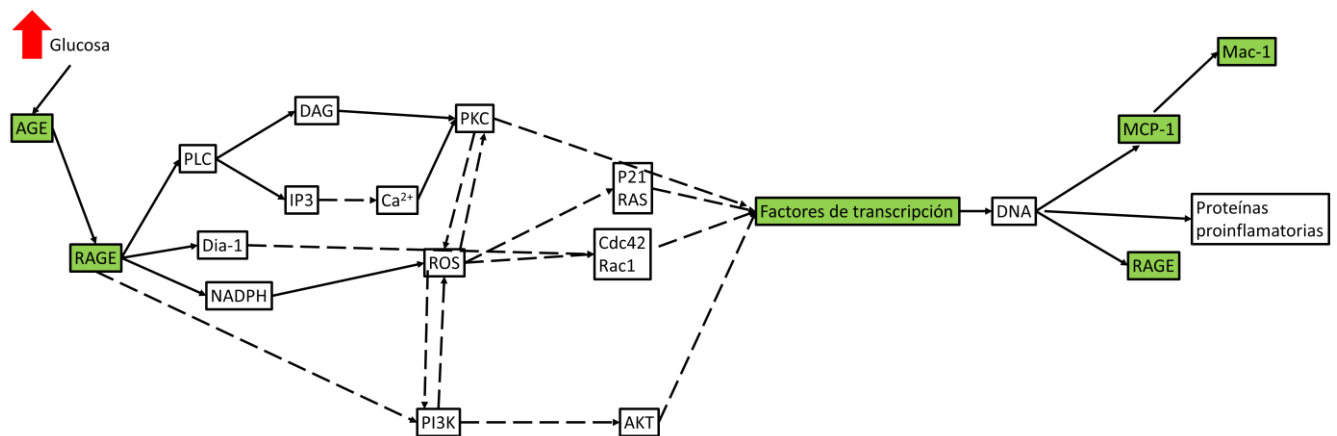


Figura 5. Ruta de señalización de RAGE en las complicaciones vasculares de la DMT2. Se muestran los puntos de señalización más relevantes para el desarrollo de las complicaciones microvasculares mediadas por AGEs y la estimulación de la expresión de moléculas de estrés oxidativo e inflamación.

La activación de esta cascada de señalización lleva a un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y moléculas proinflamatorias, como interleucinas y quimiocinas, además de generar un proceso de retroalimentación positiva en el que RAGE aumenta su expresión (Oliveira et al., 2013).

sRAGE puede generarse ya sea por medio de 'splicing' alternativo o bien, mediante el corte proteolítico de la isoforma celular en la región codificada entre los exones 9 y 10. sRAGE regula la actividad de cRAGE, ya que, al carecer del dominio intracelular, pero no de la región extracelular, puede interactuar con los ligandos, evitando la activación de la cascada de señalización intracelular (Koch et al., 2010).

RAGE se expresa en una gran cantidad de tejidos, entre ellos, el endotelio vascular, y es de gran importancia para la activación de rutas relacionadas al daño vascular, como son la ruta de hipoxia, Jak /STAT, PI3K/AKT, de Renina-angiotensina, y la ruta de las MAP cinasas, lo cual deriva en daño vascular, hipertrofia celular, aumento en la producción de radicales libres e inflamación (KEGG PATHWAY, 2018).

Un punto muy importante de esta ruta es la activación de AP-1 y NFκB, que favorecen la retroalimentación positiva de RAGE, lo cual aumenta el número de receptores disponibles para interactuar con AGEs, además de activar la expresión de quimiocinas, como la MCP-1.

4. Proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1)

MCP-1 es una proteína de la familia de las citocinas y de la subfamilia C-C, debido a los dos puentes disulfuro formados por las cisteínas que presenta en su estructura. Por esto, también se le conoce como C-C Motif Chemokine Ligand 2 (CCL2). Las citocinas de esta familia tienden a interactuar de forma preferencial con monocitos y linfocitos T (Phillips, Lutz, & Premack, 2005). Así mismo, esta proteína es una quimiocina, por lo tanto, entre sus funciones se encuentra la regulación del tráfico, extravasación y maduración de leucocitos (Phillips et al., 2005). Esta proteína interactúa con su receptor, C-C- Motif Chemokine Receptor-2 (CCR2), al estimular su dimerización y así, llevar a cabo la respuesta cascada abajo, que conlleva a la producción de moléculas de adhesión y citocinas proinflamatorias (Ueda et al., 1997, Kutlu et al., 2003, Hohensinner et al, 2006, Papadopoulou et al, 2007). Su expresión se regula por diversas modificaciones, como son

el corte del extremo amino terminal, o bien, la glicosilación de estas proteínas (Proost, Struyf & Van Damme, 2006) lo cual podría alterar su función pese a su abundancia.

4.1. Estructura de MCP-1

MCP-1 tiene un peso molecular de 11.03 kDa y está conformada por 99 aminoácidos. Presenta, además de las cisteínas que permiten la formación de dos puentes disulfuro, una α hélice y tres láminas β antiparalelas (Figura 6) (Zhang, Ernst, & Rollins, 1996).

En general, la estructura de MCP-1 está altamente conservada, pues presenta un dominio 'chemokine interleukin-8-like', característico de las quimiocinas de la familia CC, de los aminoácidos 27 al 98, y dentro de esta secuencia de aminoácidos se encuentra el sitio conservado CC, de los aminoácidos 34 al 76 (InterPro, 2018).

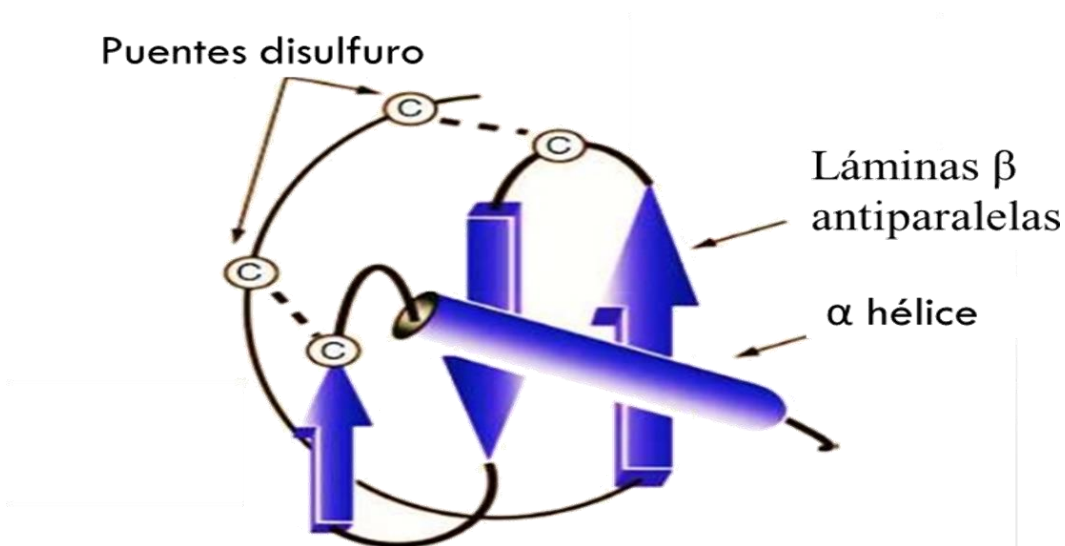


Figura 6. Estructura secundaria de MCP-1. Se observan tanto los dos puentes disulfuro como las láminas β antiparalelas, además de la α hélice. Modificado de Deshmane et al, 2009.

4.2. Gen *MCP-1*

El gen que codifica a MCP-1 se localiza en el cromosoma 17 en la región q11.2, y forma parte de un cluster de quimiocinas (Deshmane, Kremlev, Amini, & Sawaya, 2009). La expresión de este gen está regulada por dos regiones río arriba respecto al sitio de inicio de la transcripción.

En la región reguladora proximal, que se ubica desde el sitio -157 respecto al sitio de inicio de la transcripción, se encuentran secuencias de reconocimiento para diversos factores de transcripción, como son SP-1, NFκB, NF-1, dos sitios para AP-1 y una caja CAAT. Por otro lado, a 1.6 kb del sitio de inicio de la transcripción se localiza una región enhancer (Deng et al., 2013), en la cual hasta el momento se han caracterizado dos sitios de reconocimiento para NFκB (Figura 7) (Ueda, Ishigatsubo, Okubo, & Yoshimura, 1997).

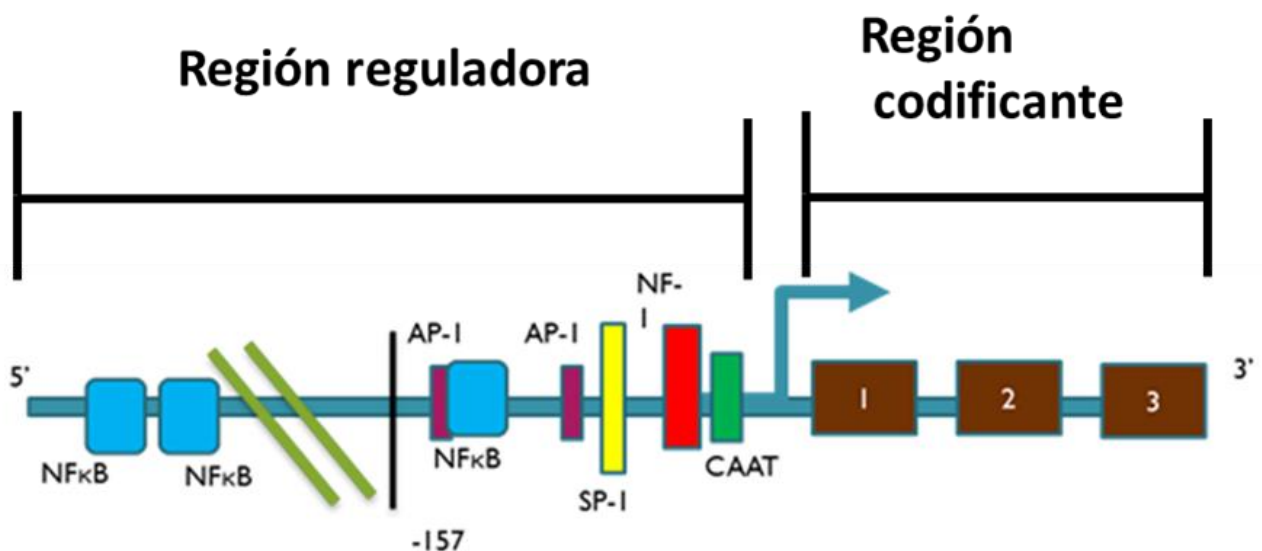


Figura 7. Estructura del gen de *MCP-1*. Se muestran los elementos reguladores descritos hasta el momento para la expresión de *MCP-1*. modificado de Ueda et al., Deng et al, 2013.

4.3. Expresión y regulación de *MCP-1*

MCP-1 es una proteína que se expresa en una gran diversidad de tejidos, entre los que destacan el tejido vascular, como son el corazón y el endotelio vascular, así como células

del sistema inmune como monocitos y macrófagos, aunque también se expresa en tejidos como son el tejido cerebral, pulmonar o renal (Genecards, 2018). MCP-1 es secretada por células endoteliales al interactuar con otras citocinas o al dañarse el endotelio (Phillips et al., 2005).

La expresión del gen de *MCP-1* se regula por diferentes sitios de unión a factores de transcripción como se mencionó anteriormente. Ueda et al en 1997 reportaron que al mutar el sitio de unión al factor de transcripción SP-1 disminuía de forma importante la expresión de *MCP-1*, además, al estimular células con $\text{TNF}\alpha$, el sitio de unión a NF κ B proximal y los dos sitios de unión a este factor de transcripción localizados en la región potenciadora se ocupaban por este factor de transcripción.

Adicional a la región reguladora de *MCP-1*, la región potenciadora impacta en la expresión de *MCP-1* por medio de los sitios de unión a NF κ B presentes en esta región, especialmente el sitio A2, que comienza en el sitio -2593, respecto al sitio de inicio de la transcripción (Ueda et al., 1997). También se han reportado en la región potenciadora de *MCP-1* un sitio de unión para P53 en el sitio -2462, y de nueva cuenta, un sitio de unión a AP-1 en el sitio -2270 (Hacke et al. 2010), lo cual resalta la importancia de la región distal del promotor de *MCP-1* en la regulación de la expresión de *MCP-1*.

4.4. Funciones de MCP-1

MCP-1 interactúa con el receptor de quimiocinas con motivo C-C (CCR2), el cual es un receptor acoplado a proteína G.

Al interactuar MCP-1 con CCR2, se desencadena una respuesta mediada por la proteína G acoplada a CCR2, lo que provoca a su vez que se estimule la migración de los leucocitos al sitio intimal (Phillips et al., 2005).

Entre los procesos en los cuales participa MCP-1 se encuentran el reclutamiento de linfocitos Th activados y células endoteliales, como parte de su actividad quimiotáctica. También se ha reportado que induce la proliferación de miocitos del tejido vascular, estimula a las células T y Natural Killer (NK), incrementando su citotoxicidad y estimulando a su vez la producción de citocinas por monocitos y macrófagos (Arefieva, Kukhtina, Antonova, & Krasnikova, 2005), así como la expresión de moléculas proinflamatorias y de adhesión celular, tales como Mac-1 (Macrophage -1 antigen) (Deshmane et al., 2009).

5. Antígeno de macrófago-1 (Mac-1)

Macrophage-1 antígeno (Mac-1) es una integrina β_2 heterodimérica relacionada con la adhesión y quimiotaxis de los leucocitos, con afinidad por una gran variedad de ligandos, principalmente moléculas que se forman a partir de la matriz extracelular (Arnaout, 2016).

5.1.1. Estructura de Mac-1

Mac-1 es una proteína heterodimérica, que consiste de la unión de las subunidades CD18 y CD11b, de ellas, CD11b es quien proporciona a esta integrina la identidad de Mac-1 (Figura 8).

La subunidad CD11b presenta un dominio von Willebrand factor type A (VWFA) (Arnaout, 2016), el cual facilita la unión de la integrina a sus ligandos de forma dependiente de iones metálicos (Adair, Xiong, Alonso, Hyman, & Arnaout, 2013).

Por otro lado, la subunidad CD18 es capaz de interactuar con CD11a, CD11b o CD11c para formar integrinas β_2 (Abbas et al., 2013).

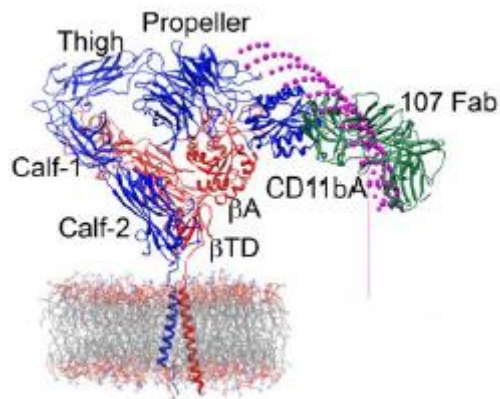


Figura 8 Estructura transmembranal de Mac-1. Se presenta el conjunto de CD11b y CD18 de acuerdo a como se localiza en la membrana plasmática. Tomado de Adair et al, 2013.

5.1.3 Funciones y expresión de Mac-1

Mac-1 tiene una importante participación en la migración y rodamiento de leucocitos, así como en la quimiotaxis de los mismos (Abbas et al., 2013).

Los ligandos de Mac-1 constituyen una gran variedad de proteínas de matriz extracelular, entre ellas se encuentran ICAM (Intercellular Adhesion Molecule) 1, 2 3 y 4, fibrina, fibrinógeno y fibronectina. También se reporta que la sobreexpresión de *Mac-1*, en presencia de factores como IL-2 aumenta la sobrevivencia de los leucocitos (Arnaout, 2016).

Además de esto, Mac-1 tiene una importante participación en el sistema del complemento, como receptor para iC3b, por lo cual la participación de Mac-1 en la respuesta inmune frente a microorganismos es de gran relevancia (Law, 1988).

Mac-1 se expresa en los leucocitos, particularmente en aquellos de linaje mieloide, como son los monocitos, macrófagos y neutrófilos, además de las células NK y linfocitos B y T CD8+, ante la estimulación de los mismos por quimiocinas (Pluskota et al., 2008).

Se ha reportado que la expresión de la subunidad CD11b de Mac-1 es estimulada por MCP-1 en células CD14+ (Weber et al, 2000).

Se ha reportado que en padecimientos como el desprendimiento de retina, la actividad inflamatoria de MCP-1 involucra un incremento en la expresión de *Mac-1*, haciendo posible así establecer una relación entre ambas (Nakazawa et al, 2007).

Antecedentes particulares

1. El polimorfismo A-2518G del gen *MCP-1*

MCP-1, como se ha mencionado, es una proteína que participa en la respuesta inmune. Como en el caso de muchos otros genes, *MCP-1* presenta variantes alélicas, originados por polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's). Entre estos destaca el cambio de una adenina por una guanina en el sitio -2518 respecto al sitio de inicio de la transcripción de este gen. Este polimorfismo es bialélico (A/G), y se ha demostrado que tiene un efecto funcional positivo en la expresión del mismo.

Este polimorfismo fue caracterizado por primera vez por el grupo de Rovin en el año 1999, junto con un cambio de adenina a timina en el sitio -2076 respecto al sitio de inicio de la transcripción. Esta caracterización se llevó a cabo en diversos grupos étnicos, entre ellos, mexicanos residentes en Estados Unidos de América. En general, la población mexicano-americana tuvo una frecuencia alélica muy semejante a la reportada para la población asiática para ambas variantes, mientras que la población afro-americana presenta una mayor prevalencia de individuos homocigotos A para el polimorfismo A-2518G de *MCP-1* respecto a las otras poblaciones estudiadas.

Esos autores realizaron la genotipificación del polimorfismo A-2518 G de *MCP-1* mediante PCR-RFLP, para lo cual amplificaron la región que comprende al mismo, obteniendo un amplicón de 928 pb. A continuación, se fragmentaron los amplicones con la enzima de restricción *PvuII*, ya que este polimorfismo se encuentra en un sitio de reconocimiento para la misma (CAGCT**G**) (Figura 9). Cuando el sitio de corte para *PvuII* se encuentra íntegro, se obtienen dos fragmentos, uno de 706 pb y otro de 222 pb, que se separan como dos bandas mediante electroforesis en gel de agarosa, mientras que al estar ausente sólo se observa la banda que corresponde al amplicón completo. En el caso del heterocigoto se separan por electroforesis tres bandas correspondientes a los dos fragmentos mencionados anteriormente y al amplicón completo.

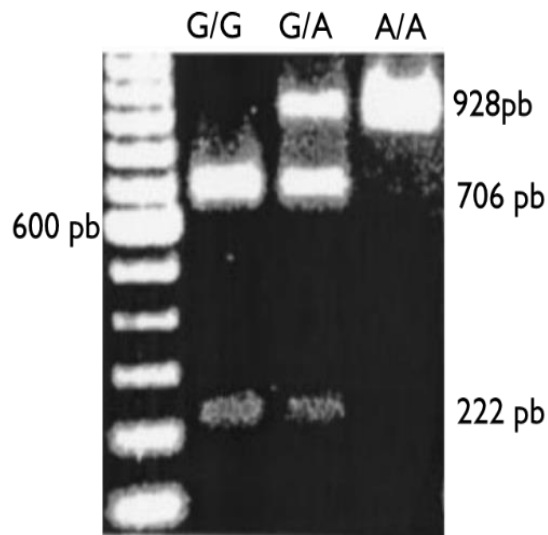


Figura 9. Patrón de restricción de la región que comprende al polimorfismo A-2518G de *MCP-1*. Modificado de Rovin et al, 1999.

Rovin y sus colaboradores en el mismo artículo realizaron ensayos funcionales, a partir de los cuales se determinó que, de las dos variantes polimórficas descritas por ellos, únicamente la variante del polimorfismo A-2518G tiene efecto sobre la expresión de *MCP-1*.

Para comprobar este efecto se insertó la región que comprende a los polimorfismos A-2518G y A-2076T de *MCP-1*, en las diferentes combinaciones posibles, empleando el vector pGL3-basic de Promega, el cual está diseñado para realizar el ensayo de luciferasa. Este vector fue transfectado en células A172 humanas de glioblastoma, que fueron estimuladas con IL-1 β . Al comparar los constructos en los cuales la única variante es la A-2518G, se observó que la actividad de luciferasa fue significativamente mayor con el plásmido que contenía al alelo G del polimorfismo A-2518G de *MCP-1* (Figura 10).

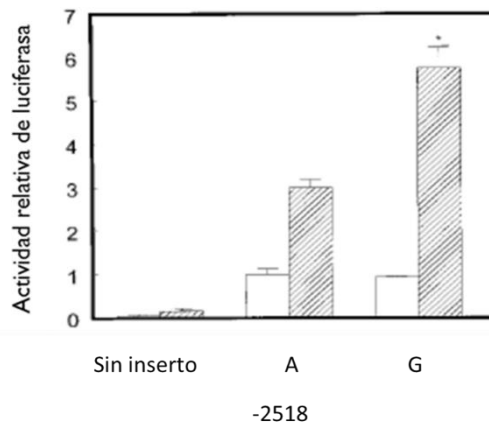


Figura 10. Ensayo de actividad de la luciferasa por estimulación de la región que contiene al polimorfismo A-2518G de *MCP-1*. En color blanco se presenta la actividad de luciferasa de las células control, el entramado representa la actividad de luciferasa de las células estimuladas con IL-1. Media $\pm$ D.E. de la actividad relativa de la luciferasa. Modificado de Rovin et al, 1999.

Adicionalmente, en este trabajo Rovin y sus colaboradores midieron la concentración de MCP-1 presente en sobrenadante de células aisladas de los participantes. En esta ocasión estratificaron los resultados únicamente por la presencia o ausencia del alelo G del polimorfismo A-2518G de *MCP-1* (Figura 11) y encontraron que se mantenía el patrón de expresión que ya habían descrito previamente.

Es importante resaltar que este polimorfismo se encuentra en una región que se reporta como reguladora (Ueda et al., 1997). Sin embargo, ninguno de estos polimorfismos se encuentran en alguno de los dos sitios de unión a NF κ B, o cercanos a ellos, por lo cual el mecanismo por el cual se podría alterar la expresión de *MCP-1* por la variante alélica que posean no se ha definido hasta este momento.

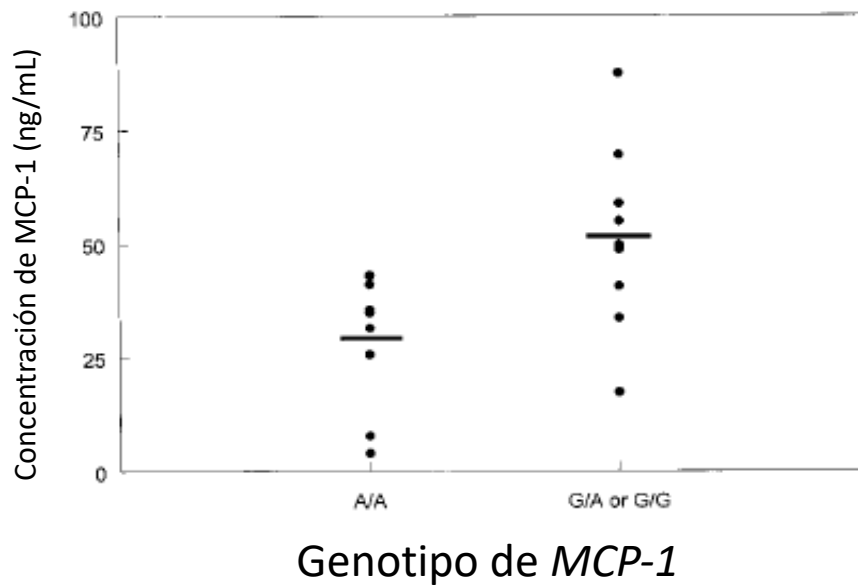


Figura 11. Concentración de MCP-1 en sobrenadante de cultivo. Se estimuló a los monocitos de los participantes con IL-1 β y se cuantificó a MCP-1 en el sobrenadante de cultivo, agrupándolos por la presencia o ausencia del alelo G. Modificado de Rovin et al., 1999.

2. El rol de MCP-1 en las enfermedades crónico-inflamatorias

Como se ha mencionado en este escrito, MCP-1 tiene una importante participación en el proceso proinflamatorio, lo cual en condiciones normales permite el reclutamiento y maduración de los leucocitos en caso de infección, sin embargo, cuando se produce en el contexto de inflamación crónica, su efecto resulta en daño al sitio afectado (Deshmane et al., 2009).

Una de estas enfermedades crónico-inflamatorias es el cáncer. Se ha reportado que MCP-1 está sobreexpresada en el cáncer de mama (Fang et al., 2012), ovario (Furukawa et al., 2013), y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Ji, Chen, Lin, Lee, & Lee, 2014), relacionándose con la supervivencia, la proliferación celular y la metástasis.

La relación de MCP-1 con el cáncer podría darse, por un lado, por el estado de constante inflamación que existe durante un proceso canceroso y por otro, por la sobreexpresión de

NFκB en este tipo de procesos, al estar vinculado este factor de transcripción con la regulación transcripcional de *MCP-1* (Yoshimura, 2018).

Se ha asociado también a *MCP-1* con diferentes tipos de daño renal, como daño renal subclínico (Hanemann et al., 2013) o lesión renal hipertensiva (Hilgers et al., 2000), ya que favorece la infiltración de monocitos.

En el contexto de las enfermedades crónico-metabólicas, se ha relacionado a *MCP-1* con padecimientos cardiovasculares, como la aterosclerosis, favoreciendo la infiltración de macrófagos en la capa subendotelial (Harrington, 2000), hipertrofia ventricular izquierda (Ritter et al., 2017) e hipertensión con ateromatosis (Tucci, Quatraro, Frassanito, & Silvestris, 2006). La hipertensión se ha asociado con el incremento de la concentración plasmática de *MCP-1* como con la presencia del alelo G del polimorfismo A-2518G del gen que codifica a *MCP-1*. Así mismo, los incrementos en las concentraciones plasmáticas de *MCP-1* se vinculan con obesidad (Panee, 2012; Sartipy & Loskutoff, 2003) y resistencia a la insulina (Patsouris et al., 2014; Sartipy & Loskutoff, 2003) y DMT2 (Panee, 2012). En obesidad, se reporta un incremento en la producción de *MCP-1* en tejido adiposo visceral y subcutáneo, teniendo un efecto angiogénico y afectando al metabolismo de los lípidos, además de aumentar el reclutamiento de macrófagos proinflamatorios (Panee, 2012). En cuanto a la resistencia a la insulina, la acumulación de macrófagos de manera local en el músculo esquelético y tejido adiposo podría favorecer la producción de *MCP-1*, involucrando a MEK/ERK y cinasas de tirosina, además de la proteína cinasa C (Rull, Camps, Alonso-Villaverde, & Joven, 2010). Finalmente, en lo que se refiere a la relación entre la DMT2 y *MCP-1*, es necesario recordar que se encuentra vinculada en la mayoría de los casos con obesidad y resistencia a la insulina, por lo tanto, una gran proporción de pacientes con DMT2 presentan concentraciones elevadas de *MCP-1* en sangre, por otro lado, se ha evaluado la relación del polimorfismo A-2518G de *MCP-1* con la DMT2 en población caucásica y asiática, sin que se hayan obtenido resultados concluyentes (Panee, 2012).

3. El polimorfismo A-2518G de *MCP-1* y la expresión de *MCP-1* en las complicaciones vasculares y microvasculares de la DMT2

El polimorfismo A-2518G de *MCP-1* ha sido estudiado en el contexto de las complicaciones vasculares principalmente en poblaciones asiáticas, en complicaciones macrovasculares, y mayormente, en complicaciones microvasculares como son retinopatía diabética y nefropatía diabética (H. Xu et al., 2003).

En general, se reporta que el alelo G está asociado a las complicaciones microvasculares (Dong et al., 2014; Jeon, Choi, Park, Lee, & Oh, 2013; Katakami et al., 2010; Ninomiya et al., 2015), independientemente de que los individuos sean homocigotos o heterocigotos para el mismo. Por otro lado, hay autores que reportan que el genotipo que se presenten del polimorfismo A-2518G de *MCP-1* no tiene un efecto significativo en las complicaciones microvasculares de la diabetes (Yoshioka, Yoshida, Kogure, Takakura, & Umekawa, 2009).

Se ha evaluado también la expresión transcripcional de *MCP-1* en el endotelio vascular aórtico. En estos estudios se reporta una relación positiva entre la expresión mayor de *MCP-1* y la probabilidad de padecer complicaciones macro y microvasculares de la diabetes (Feng et al., 2005).

En general la mayoría de los estudios reportan concentraciones plasmáticas elevadas de *MCP-1* que correlacionan con las complicaciones microvasculares de interés. Entre estas se encuentra la nefropatía diabética, en la cual se detectó que la concentración de *MCP-1* correlaciona con el reclutamiento y activación de macrófagos en los glomérulos renales (F. Chow, Ozols, Nikolic-Paterson, Atkins, & Tesch, 2004; Morii et al., 2003), además de que se ha reportado que en ratones diabéticos “knockout” para *MCP-1*, el daño renal disminuye (F. Y. Chow et al., 2007).

La concentración plasmática de *MCP-1* también se ha evaluado en individuos con retinopatía diabética. Al igual que en los individuos con nefropatía diabética, se ha encontrado relación entre la concentración de *MCP-1* y la retinopatía diabética proliferativa y no proliferativa. La concentración de esta proteína se reportó como significativamente más alta en los pacientes diabéticos con retinopatía diabética proliferativa y no proliferativa (Reddy et al., 2017).

Algunos autores han reportado una correlación positiva entre la concentración plasmática de MCP-1 y el alelo G del polimorfismo A-2518G del gen que la codifica y las complicaciones microvasculares de la DMT2 (Jiang et al., 2016). Sin embargo, existen algunas controversias, de parte de quienes aseveran que no tiene relación alguna (Zietz et al., 2005).

4. El polimorfismo A-2518G de *MCP-1* en población mexicana

En México hasta el momento no se ha estudiado el polimorfismo A-2518G del gen *MCP-1* ni se ha relacionado con las concentraciones plasmáticas de la proteína en el contexto de las complicaciones macro o microvasculares de la DMT2, pero si se ha estudiado en individuos con enfermedades infecciosas, autoinmunes, cáncer, aterosclerosis y resistencia a la insulina (Tabla 2) (Angeles-Martínez et al., 2015; Flores-Villanueva et al., 2005; Lima et al., 2007; Matia-García et al., 2018; Vázquez-Lavista, Lima, Gabilondo, & Llorente, 2009).

Durante el estudio de Rovin et al en 1999, se estudiaron diferentes grupos étnicos residentes en Estados Unidos, entre ellos, a un grupo de 17 individuos mexico-americanos, de los cuales no se especificó que tuvieran algún padecimiento al cual asociar la frecuencia genotípica del polimorfismo A-2518G de *MCP-1* (Tabla 2), aunque si es importante resaltar que la frecuencia genotípica de la población mexico-americana fue semejante a la que presentaron los individuos de población asiática.

Posteriormente, se evaluó en el contexto de la tuberculosis (Tabla 2) (Flores-Villanueva et al., 2005), donde se identificó que los pacientes portadores del alelo G, y especialmente, los homocigotos para G, eran más susceptibles a desarrollar tuberculosis pulmonar activa.

Fue reportado también el estudio de la variante A-2518G de *MCP-1* en enfermedades autoinmunes, como es el Lupus eritematoso (Tabla 2) (Lima et al., 2007). En dicha publicación se menciona que el alelo A y el genotipo homocigoto para este alelo podrían estar asociados al padecimiento, aunque Lima y sus colaboradores hacen énfasis en la posibilidad de que no se hayan considerado todas las variables confusoras necesarias para aseverarlo.

En el contexto de las enfermedades crónicas, se ha evaluado al genotipo A-2518G de *MCP-1* en carcinoma de vejiga (Vázquez-Lavista et al., 2009) y en aterosclerosis (Tabla 2) (Angeles-Martínez et al., 2015). En cuanto al carcinoma de vejiga, se reporta que la proporción de individuos homocigotos para G, o portadores de éste alelo, fue significativamente menor en pacientes con carcinoma de vejiga que en aquellos que no lo padecían (Vázquez-Lavista et al., 2009).

Tabla 2. Relación entre el polimorfismo A-2518G de *MCP-1* y enfermedades infecciosas, autoinmunes y crónico-degenerativas evaluadas en la población mexicana.

Autor	Año	Estudio	Tamaño de muestra (n)	Frecuencia (Controles)			Frecuencia (Casos)		
				AA	AG	GG	AA	AG	GG
Rovin et al.	1999	Caracterización	17	0.24	0.59	0.18	N/A	N/A	N/A
Flores-Villanueva et al.	2005	Tuberculosis	176	0.24	0.50	0.26	0.25	0.48	0.27
Lima et al.	2007	Lupus eritematoso	220	0.14	0.55	0.31	0.23	0.52	0.26
Vázquez-Lavista et al.	2009	Carcinoma de vejiga	126	0.14	0.56	0.29	0.20	0.75	0.06
Angeles-Martínez et al.	2015	Enfermedad coronaria	968	0.32	0.48	0.20	0.31	0.45	0.25
Matia-García et al.	2018	Resistencia a la insulina	174	0.17	0.48	0.35	0.12	0.37	0.51

N/A: No aplica

Para la aterosclerosis, lo que reportaron Ángeles-Martínez y sus colaboradores en 2015 fue que no existe diferencia significativa entre el alelo que se presente para el polimorfismo A-2518G de *MCP-1* y la probabilidad de padecer aterosclerosis, si bien la estratificación de su muestra que realizaron en este estudio podría haber favorecido el efecto de variables confusoras.

Finalmente, se publicó un estudio realizado en infantes mexicanos con resistencia a la insulina (Matia-García et al., 2018), donde se señala que en el grupo de individuos con resistencia a la insulina existe una mayor proporción de individuos homocigotos G, sin que esto sea significativo, sin embargo, obtienen un valor de riesgo significativo (OR = 2.2, $p= 0.03$) con la presencia de resistencia a la insulina.

En cuanto a la expresión de MCP-1, se ha evaluado la concentración de ésta proteína en una población infantil de individuos méxico-americanos con obesidad (Breslin et al., 2012), donde se describe que en estos individuos la concentración plasmática de MCP-1 se encuentra elevada.

5. La participación de Mac-1 en las complicaciones microvasculares de la diabetes

Como se mencionó anteriormente, Mac-1 es una molécula de adhesión que se expresa en los leucocitos, facilita su proceso de migración a través de los vasos sanguíneos, y está involucrada en diferentes procesos patológicos, entre ellos la diabetes y sus complicaciones microvasculares (Hilgers et al., 2000, p. 1).

Se ha vinculado a la concentración plasmática de MCP-1 con la de Mac-1 en pacientes con DMT1 (Kiyici et al., 2006). Si bien en este estudio no se encontró relación entre éstas y el desarrollo de nefropatía diabética, no sería especulativo proponer que el incremento en la expresión de *MCP-1*, estimule la expresión de *Mac-1* y favorezca las complicaciones microvasculares de la DMT2, dada la importancia de ambas en el proceso inflamatorio en el endotelio vascular, y a que la expresión de *Mac-1* es estimulada por MCP-1.

En pacientes con DMT1, se detectó que la expresión de *Mac-1* es mayor en aquellos pacientes de diagnóstico reciente que en aquellos con tiempo de diagnóstico superior a dos meses (Cifarelli et al., 2007), probablemente porque después del diagnóstico y comienzo del tratamiento los individuos consiguen un mejor control glicémico, el cual es la causa primaria del aumento de la expresión de moléculas proinflamatorias.

En pacientes con DMT2, se ha identificado, mediante citometría de flujo, que la expresión de CD11b, una de las moléculas que componen a Mac-1, se incrementa significativamente en comparación con lo que sucede en los individuos sanos (de Vries et al., 2015; van Oostrom, van Wijk, Sijmonsma, Rabelink, & Castro Cabezas, 2004).

Además de lo anterior, se ha reportado que Mac-1 favorece la generación de un microambiente proinflamatorio al adherirse al endotelio vascular e incrementar la generación de ROS por parte de los macrófagos (Husemann, Obstfeld, Febbraio, Kodama, & Silverstein, 2001).

Hipótesis

El polimorfismo A-2518G de *MCP-1* y la regulación positiva de *MCP-1* y de *Mac-1* se relacionan con el desencadenamiento de las complicaciones microvasculares en pacientes mexicanos con DMT2

Justificación

La diabetes y sus complicaciones microvasculares son un problema de salud con gran impacto en la calidad de vida y en la economía de la población mexicana, por lo que identificar moléculas que a largo plazo puedan emplearse como marcadores de riesgo podría contribuir a la prevención de las complicaciones microvasculares de la DMT2.

No se ha evaluado en la población mexicana la relación entre las complicaciones microvasculares de la DMT2 y el polimorfismo A-2518G de *MCP-1*, ni la consecuente variación en la expresión de *MCP-1* y *Mac-1*, que de acuerdo a lo reportado tienen participación en las complicaciones microvasculares de la diabetes en otras poblaciones. Sin embargo, las diferencias étnicas podrían provocar un efecto diferente a lo reportado en estas poblaciones.

Objetivos

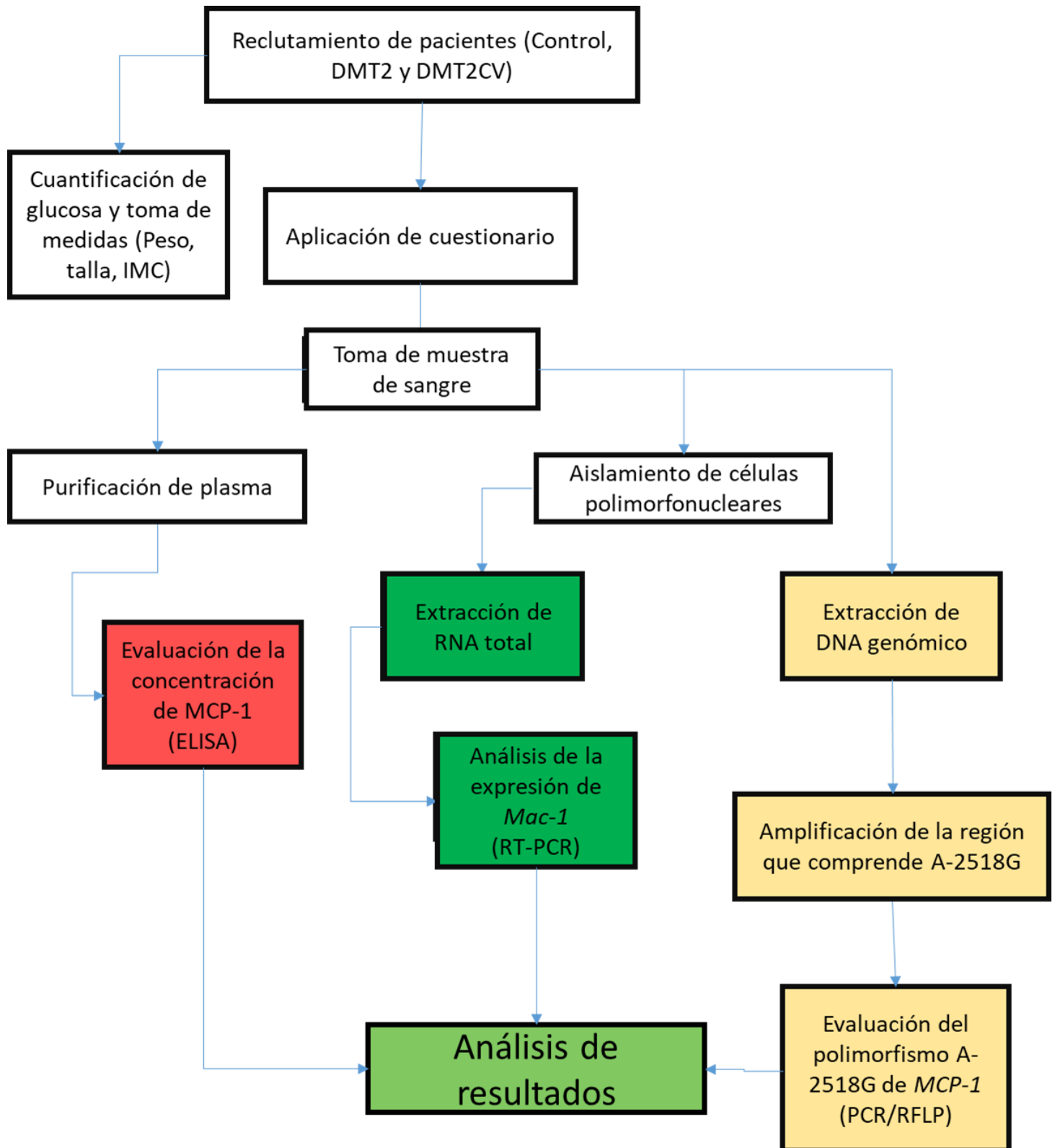
Objetivo general

Determinar la relación entre el polimorfismo A-2518G del gen *MCP-1* y la expresión de este gen y de *Mac-1* en población mexicana con complicaciones microvasculares de la DMT2.

Objetivos particulares

- 1.- Determinar la frecuencia alélica y de genotipos del polimorfismo A-2518G de *MCP-1* en población mexicana con complicaciones microvasculares de la DMT2.
- 2.- Determinar la concentración plasmática de *MCP-1* en población mexicana con complicaciones microvasculares de la DMT2.
- 3.- Evaluar la expresión de *Mac-1* en población mexicana con complicaciones microvasculares de la DMT2.
- 4.- Analizar la relación existente entre el polimorfismo A-2518G de *MCP-1* y la expresión de *MCP-1* y *Mac-1* con las complicaciones microvasculares de la DMT2.

Estrategia experimental



Materiales y métodos

1. Tipo de estudio

Transversal de casos y controles.

2. Aprobación del comité de ética

Este proyecto fue evaluado y aprobado por el comité de ética de la Secretaría de Salud del Distrito Federal (Anexo 1).

3. Población de estudio

Se formaron tres grupos de estudio compuestos por 40 individuos cada uno, diabéticos con complicaciones microvasculares (DMT2CV), diabéticos sin complicaciones vasculares (DMT2) e individuos metabólicamente sanos (Control).

Criterios de inclusión para todos los grupos:

- Mayor a 18 años
- Sexo indistinto
- Participar de forma voluntaria, respaldado por la firma del consentimiento informado (Anexo 2).

Criterios de inclusión para el grupo control:

- Metabólicamente sano

Criterios de inclusión para el grupo DMT2:

- Diagnóstico de DMT2

Criterios de inclusión para el grupo DMTCV:

- Diagnóstico de DMT2
- Al menos una complicación microvascular diagnosticada
 - Nefropatía diabética

- Pie diabético (úlceras o amputaciones derivadas de este)
- Neuropatía diabética
- Retinopatía diabética

Criterios de exclusión para todos los grupos:

- Enfermedades infecciosas en un lapso menor a un mes, anterior a la toma de muestra
- Diagnóstico de enfermedad autoinmune
- Diagnóstico de cáncer en cualquier momento previo a la toma de muestra
- Diagnóstico de cualquier enfermedad neurodegenerativa
- Haber recibido transfusiones sanguíneas en los 4 meses anteriores a la toma de muestra
- No cumplir con alguno de los criterios de inclusión

Criterios de exclusión para el grupo control:

- Presentar cualquier enfermedad característica del síndrome metabólico
 - Diabetes mellitus (tipo 1 o Tipo 2)
 - Obesidad
 - Dislipidemias
- Hipertensión
- Antecedentes familiares de primer grado para diabetes

Criterios de exclusión para el grupo DMT2:

- Presentar diagnóstico de DMT1
- Presentar cualquier complicación microvascular
 - Nefropatía diabética
 - Pie diabético (úlceras o amputaciones derivadas de este)

- Neuropatía diabética
- Retinopatía diabética
- Presentar cualquier complicación macrovascular
 - Infarto del miocardio
 - Isquemias
 - Evento Vascular Cerebral

Criterios de exclusión para el grupo DMT2CV:

- Presentar diagnóstico de DMT1

4. Colecta de muestra y toma de datos

Los individuos que participaron en esta investigación fueron reclutados entre los pacientes del Hospital General de Iztapalapa, principalmente entre los pacientes del servicio de Medicina Interna, en la consulta de Medicina General del Centro de Salud Metropolitano en Ciudad Nezahualcóyotl, Estado de México, y entre estudiantes y personal de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Plantel del Valle.

Para el cálculo del tamaño de la muestra se consideró como la N poblacional a la población presente en la Ciudad de México y el Estado de México, que suman en total 25 500 000 individuos. Se consideraron, para calcular los valores de p y q, la prevalencia de diabetes en la población mexicana, que es de 9.4% y de DMT2, que es del 95% del total de los pacientes diabéticos, además de la incidencia de complicaciones vasculares entre los pacientes diabéticos, que es del 60%, y la frecuencia del genotipo de menor prevalencia que es del 20%. Se fijó el nivel de confianza al 95% para determinar la Z y un error (e) del 5%, obteniendo un valor de n de 16 individuos por grupo de estudio.

Para el cálculo de la n se empleó la siguiente fórmula:

$$n = \frac{Z^2 pq N}{e^2(N - 1) + Z^2 pq}$$

En todos los casos se les explicó a los participantes, y en caso de que esto no fuera posible, a un familiar responsable, los objetivos de este proyecto, las condiciones de colecta de la muestra, así como los beneficios y riesgos de participar.

Se les pidió que leyeran y firmaran una carta de consentimiento informado (Anexo 2) y de acceder a participar se les pidió que contestaran un cuestionario sobre sus datos demográficos, antecedentes familiares y personales, así como sus hábitos de vida (Anexo 3).

Se tomaron muestras de sangre periférica empleando para su almacenamiento tubos de vacutainer con EDTA.

5. Separación de plasma y células sanguíneas

Se centrifugaron las muestras de sangre a 1600 g por 10 minutos a 4 °C, se almacenó el plasma a -80 °C y se separó la capa de leucocitos del resto de las células para su posterior procesamiento.

6. Obtención de leucocitos

Se procesó la capa de leucocitos añadiendo buffer ACK (Cloruro de amonio 155 mM, Bicarbonato de potasio 10 mM, EDTA 1 mM) en una proporción de 3:1 y se homogeneizó hasta resuspender completamente todas las células. Se centrifugó a 1600 g por 10 minutos a 4 °C y se repitió tantas veces como fue necesario para obtener un pellet de leucocitos. Los leucocitos fueron alicuotados y almacenados a -80 °C.

7. Extracción de DNA

Se empleó el kit de extracción de DNA de Quiagen Gentra Puregene blood core Kit B, donado por la Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga, para extraer DNA a partir de los leucocitos obtenidos de 300 µL de sangre. Después de lisar los leucocitos se precipitó el DNA empleando isopropanol y se removieron sales empleando etanol al 70%. Se resuspendió el DNA en solución de hidratación durante toda la noche y se almacenó a -20 °C. Para verificar la calidad del DNA extraído se evaluó por espectrofotometría UV y se calculó el rendimiento del DNA obtenido, así como su pureza por medio de la relación 260/280. A

continuación, se realizó la electroforesis del mismo en agarosa al 1% disuelta en TBE 0.5X (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM).

8. Genotipificación del polimorfismo A-2518G de MCP-1 por medio de PCR-RFLP

Se amplificó la región que comprende al polimorfismo A-2518G mediante PCR empleando los primers reportados por Rovin et al, en 1999 (F= 5'-CCG AGA TGT TCC CAG CAC AG-3'y R=5'-CTG CTT TGC TTG TGC CTC TT -3'), generando un amplicón de 928 pb localizado en la zona que comprende al sitio -2518 respecto al sitio de inicio de la transcripción.

El amplicón generado fue digerido *overnight* con la enzima *PvuII*, la cual reconoce la secuencia 5'CAGCTG 3'. La guanina del extremo 3' de la secuencia de reconocimiento para *PvuII* coincide con el polimorfismo A-2518G, por lo que dependiendo de la variante que portara cada individuo, aparecerá o no el sitio de corte.

Se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 2% disuelta en TBE 0.5X para visualizar las bandas generadas a partir de la digestión con la enzima *PvuII*.

9. Cuantificación de MCP-1 por ELISA tipo sándwich

Se llevó a cabo el ensayo de ELISA tipo sándwich empleando el kit Human MCP-1/CCL2 ELISA Max deluxe set 10 plates (438805) de BioLegend.

Para ello, se cubrieron las placas con 100 µL de solución de recubrimiento, la cual contiene al anticuerpo de captura. Este se incubó *overnight* a 4 °C, posteriormente se lavó 4 veces con 200 µL de solución de lavado en agitación, durante 5 minutos por cada lavado; después de esto se incubó por 2 horas con solución de muestra 1x (incluida en el kit) a temperatura ambiente y en movimiento. Se lavó de nuevo la placa y se agregaron 100 µL de la muestra problema o de MCP-1 recombinante (incluida en el kit) diluida en solución de muestra 1X. Para la elaboración de la curva patrón se realizaron diluciones seriadas (1:2) de la proteína recombinante en solución de muestra 1X hasta obtener 7 puntos experimentales en un rango de concentración entre 500 y 7.8 pg/mL. La muestra problema utilizada fue plasma sin diluir.

Tanto la MCP-1 recombinante como las muestras problema se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente y en movimiento. Posteriormente, se lavaron los pocillos de la placa como se ha descrito y se agregaron 100 μ L de solución de detección, la cual consistió en anticuerpo de detección biotinilado anti-MCP-1 diluido en solución de muestra 1X. Se incubó por 1 hora en movimiento a temperatura ambiente. Una vez concluido este lapso, se lavaron los pocillos con 200 μ L de PBS pH 7.4, 4 veces por 5 minutos cada vez, en agitación y a temperatura ambiente. Se añadieron 100 μ L de HRP-avidina en solución de muestra 1X y se incubó por 1 hora en movimiento a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron los pocillos 5 veces con 200 μ L de PBS pH 7.4 en agitación, con una duración de 1 minuto por lavado. Se añadieron 100 μ L de TMB recién preparado en cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente y en agitación por 1 hora en oscuridad. A continuación se agregaron 100 μ L de solución de paro y se leyó la absorbancia de cada pocillo a 450 nm. Para calcular la concentración de MCP-1 en el plasma de los pacientes se interpoló el valor de absorbancia obtenido en la ecuación de la recta de la curva patrón generada. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

10. Extracción de RNA

Se extrajo RNA total a partir de leucocitos mediante el método de TRIZOL® de 30 individuos, seleccionados al azar, a razón de 10 por cada grupo de estudio (Control, DMT2 y DMT2CV). Para ello se resuspendieron 10^6 leucocitos en TRIZOL® y se lisaron las células por acción mecánica de pipeteo. El lisado celular, se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se añadió 200 μ L de cloroformo. Se homogeneizó la mezcla empleando un vórtex, se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos y se centrifugó a 12000 g por 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante traslúcido y se colocó en un tubo nuevo y estéril, y se añadieron 500 μ L de isopropanol. Posteriormente, se lavó con 1000 μ L de etanol al 75% en agua libre de RNasas y se centrifugó a 7500 g por 5 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se repitió el lavado. Finalmente, se dejó abierto el tubo por 5 minutos y pasado este lapso se resuspendió en agua libre de RNasas y se almacenó a -80 °C. Para verificar la calidad del RNA extraído se evaluó por espectrofotometría UV y se calculó el rendimiento del RNA obtenido, así como su pureza por medio de la relación 260/280. Así mismo se realizó la electroforesis del mismo en agarosa al 0.8% disueta en TBE 0.5X.

Se eliminó el DNA residual de la muestra empleando DNasa RQ1 RNase-Free DNase de Promega. Brevemente, se colocaron 8 µL de RNA total, 1 µL de DNasa libre de RNasas RQ1 y 1 µL de Buffer de reacción RQ1 10X. Esta mezcla se incubó a 37 °C por 30 minutos, posteriormente se añadió 1 µL de solución RQ1 DNase y se incubó por 10 minutos a 65 °C. Posterior a esto se almacenó a -80°C.

11. Síntesis de cDNA

Se empleó el kit ThermoScript™ RT-PCR System de invitrogen para sintetizar cDNA. Se colocaron en un tubo para PCR, 8 µL de RNA tratado con DNAsas, 2 µL de mezcla de dNTP's, 1 µL de agua libre de RNasas y 1 µL de oligo (dT) 50 mM, esto último con la finalidad de amplificar únicamente el mRNA. Esta mezcla se incubó a 65 °C por 5 minutos. Inmediatamente después de este lapso se incubó la reacción en hielo.

Se preparó por cada reacción llevada a cabo una mezcla que consistió en 4 µL de buffer de síntesis de cDNA 5x, 1 µL de DTT 0.1 M, 1 µL de RNase OUT (40 U/µL), 1 µL de agua libre de RNasas y 1 µL de thermoscript RT (15 u/µL). De esta mezcla se agregaron 8 µL conteniendo el RNA tratado con RNasas a cada tubo de PCR y se mantuvo en hielo. Como control (RT-) se realizaron reacciones a las cuales se le añadieron todos los reactivos anteriores menos la enzima thermoscript RT.

Las mezclas se transfirieron al termociclador donde se incubaron a 50 °C por 1 hora. Se terminó la reacción incubando a 85 °C por 5 minutos, posterior a esto se añadió a cada reacción 1 µL de RNasa H y se incubó por 20 minutos a 37 °C. El cDNA sintetizado se almacenó a -20 °C.

12. RT-PCR semicuantitativo de *Mac-1*

Se realizó la PCR de punto final de *Mac-1* empleando los primers F=5'- AGG GAG TCAT TCG CTA CG-3' y R=5'- AGAGCCTCAAAGTTATTCACC- 3' reportados previamente por Li et al. en 2010; y de *GAPDH* como normalizador, usando los primers F=5'-ACA GTC AGC CGC ATC TTC-3' y R=5'- CCA ATA CGA CCA AAT CCG TTG- 3 reportados por Andrade et al. en el año 2013. Se empleó para ello el cDNA sintetizado previamente como molde o la reacción RT-. Como controles adicionales se realizaron reacciones, para cada muestra problema, a las cuales no se les añadió cDNA sino solo primers (*Mac-1* o *GAPDH*) y el resto de los reactivos.

Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% disuelto en TBE 0.5X de los amplicones obtenidos de *GAPDH* y *Mac-1*. El análisis densitométrico se realizó empleando el software ImageLab de BIORAD. En el caso de obtener señal en las reacciones que no contenían cDNA, la intensidad de la señal obtenida se sustrajo del valor de la señal de la correspondiente muestra problema.

Análisis estadístico

Las variables cualitativas se tabularon empleando para ello medidas de frecuencia, y se compararon mediante la prueba de χ^2 . Las variables cuantitativas se tabularon considerando media o mediana, desviación estándar, varianza y error estándar de la media (ESM), y se analizaron mediante t de Student o U de Mann Whitney, de compararse dos grupos, o ANOVA o Kruskal Wallis, para comparaciones que involucraran a tres o más grupos. Como prueba post-hoc se aplicó la prueba de Bonferroni. Se calculó la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene. Se calculó si la distribución genotípica de los alelos del polimorfismo A-2518G de *MCP-1* estaba en equilibrio de Hardy-Weinberg mediante la prueba de χ^2 , y para comparar las diversas variables de este estudio se aplicó un modelo lineal general, con la finalidad de considerar las variables confusoras. Se calculó la variabilidad intraensayo de la curva patrón del ensayo de ELISA calculando el coeficiente de variación, y la variabilidad interensayo se obtuvo calculando la media de los coeficientes de variación de los ensayos.

La curva patrón del ensayo de ELISA se obtuvo relacionando la concentración de MCP-1 recombinante con la absorbancia a 450 nm mediante un análisis de regresión lineal. Para estimar la concentración de MCP-1 de las muestras problemas se interpoló la absorbancia a 450 nm de cada una de ellas en la ecuación de la recta que describe la curva patrón.

Para el análisis semicuantitativo de la expresión de *Mac-1* se normalizó la expresión de este gen respecto a la expresión de *GAPDH* y a continuación se calculó las veces que se modificó la expresión de *Mac-1* de cada individuo de los grupos DMT2 y DMT2CV con respecto a la mediana del grupo control.

Resultados

1. Datos demográficos

Para la realización de este estudio se reclutaron 120 participantes en total, 40 individuos en cada grupo de estudio (Control, DMT2 y DMT2CV). El reclutamiento se llevó a cabo en la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, plantel del Valle, en el Hospital General de Iztapalapa y en el Centro de Salud Metropolitano en Ciudad Nezahualcóyotl. Los datos demográficos de estos pacientes se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Datos demográficos de los participantes.

Variables clínicas y demográficas		Controles n=40	DMT2 n=40	DMT2CV n=40
Sexo (%)	F	56.2	43.2	52.5
	M	43.7	56.8	47.5
Edad (años)** §		24.5 (18-61)	55 (23-83)	56 (40-85)
Glucosa (mg/dl)*		92.1± 1.4	218.55± 21.4	206.4± 18.6
IMC (%)	Normal	56	21.9	35.2
	Sobrepeso	44	25	26.4
	Obesidad §	0	53.1	38.2
Hipertensos (%)		0	47.5	72.5
Tiempo de evolución (años)* §		N/A	10.92± 1.7	16.8 ± 1.6
Antecedentes familiares de 1er grado (%)		0	57.1	60.0

Se estratifica por grupos de estudio. * Media ± ESM, **Mediana, § Estadísticamente significativo a un $\alpha = 0.05$.

La composición de los grupos de estudio fue homogénea en cuanto al género ($F=0.815$, $gl=2$, $p=0.445$). Sin embargo, en cuanto a la edad de los participantes, hay diferencias entre los individuos del grupo control y el resto ($\alpha = 0.05$) (Tabla 3). Este hecho, se puede relacionar con los criterios de exclusión que se establecieron en este estudio, que comprendían para el caso de los individuos controles, la ausencia de obesidad, hipertensión arterial, familiares de primer grado diabéticos y otros signos de enfermedad metabólica. Teniendo en cuenta la prevalencia de estos factores de riesgo en la población mexicana y que la DMT2 se desencadena, generalmente, a edades mayores a los 40 años, era de esperar que la edad promedio de los individuos sanos metabólicamente y sin factores de riesgo fuera significativamente inferior a la del grupo de pacientes diabéticos.

Es importante también mencionar la diferencia que existe en cuanto al índice de masa corporal (IMC) entre los grupos DMT2 y DMT2CV, donde se aprecia que los individuos del grupo DMT2 tienen una mayor proporción de individuos con obesidad (53.1%) respecto al grupo DMT2CV (38.2%) ($X^2= 7.005$, $p=0.008$) (Tabla 3). Esto se puede relacionar, por un lado, con los cuidados que requieren muchos de los pacientes con nefropatía diabética o aquellos que padecen alguna otra complicación y como parte de su atención retoman cuidados en cuanto a actividad física y nutrición, mientras que aquellos pacientes sin complicaciones microvasculares siguen la tendencia nacional de no tomar medidas de prevención de las complicaciones vasculares (ENSANUT, 2016).

La proporción de individuos con hipertensión es mayor entre los individuos del grupo DMT2CV, esto correlaciona con el hecho de que en ambos padecimientos existe daño al endotelio vascular, aunque cabe mencionar que esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($X^2= 0.004$, $p=0.948$).

Debe destacarse que los individuos del grupo DMT2CV presentan un mayor tiempo de evolución (16.8 años) que los del grupo DMT2 (10.92 años) (tabla 3) ($t= -2.934$, $gl= 71$, $p=0.005$). Este resultado es congruente con las evidencias reportadas en la literatura que mencionan que la aparición de complicaciones está relacionada con el tiempo de exposición a la enfermedad (Nathan, 1993).

En cuanto a los antecedentes familiares de DMT2, entre los dos grupos de diabéticos (DMT2 y DMT2CV) no hay diferencias ($X^2= 0.205$, $p=0.651$).

2. Obtención de plasma, células y DNA

Se obtuvo el plasma de los 120 individuos y se almacenó hasta su uso posterior. Los leucocitos extraídos también se aislaron con la finalidad de obtener DNA y RNA para cumplir los objetivos planteados en este trabajo.

El índice de pureza medio de las muestras de DNA de cada grupo es igual o mayor a 1.8 e inferior a 2, lo cual nos indica que las muestras están libres de proteínas y RNA y son de adecuada calidad para el subsiguiente análisis. El rendimiento del DNA obtenido fue semejante y adecuado en los tres grupos, ya que de cada muestra se cuenta con al menos 100 µL lo cual nos permitirá contar con suficiente DNA para los análisis posteriores (Tabla 4).

Tabla 4. Concentración y rendimiento de DNA obtenido de muestras de sangre de los participantes.

Grupos de estudio	Rendimiento total (µg)*	Relación 260/280*
Controles n=40	4.5± 0.6	1.9± 0.06
DMT2 n=40	5.84± 1.22	1.8±0.02
DMT2CV n=40	5.63± 0.87	1.9±0.05

*Media ± desviación estándar

Adicional a la cuantificación mediante espectrofotometría UV, se evaluaron las muestras de DNA mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% donde se observaron bandas únicas sin barrido lo que indica la presencia de moléculas de alto peso.

3. Caracterización del polimorfismo A-2518G de *MCP-1*

Se amplificó mediante PCR de punto final la región que contiene al polimorfismo A-2518G de *MCP-1* de 102 participantes. En todos los casos se obtuvo el amplicón esperado de 928 pb.

Los productos obtenidos a partir de la amplificación de la región que comprende al polimorfismo A-2518G de *MCP-1* fueron digeridos con la enzima de restricción *PvuII* y con ello se obtuvo el patrón de restricción característico para cada genotipo, el cual coincide con lo esperado de acuerdo a lo reportado en la literatura. Es decir, se obtuvo una única banda a 928 pb en el caso de los homocigotos A, dos bandas, una a 706 pb y otra a 222 pb para el homocigoto G, y tres bandas para el heterocigoto (Figura 12).

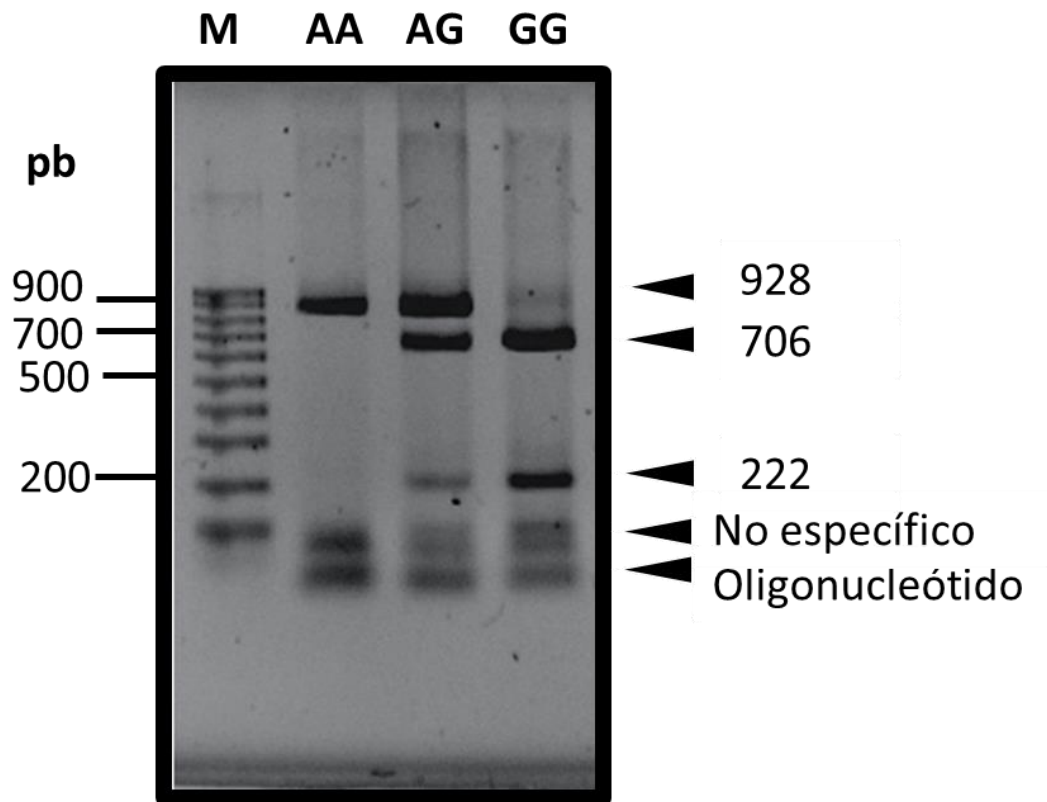


Figura 12. Genotipificación del polimorfismo A-2518G de *MCP-1*. Imagen representativa del patrón de restricción de la región que comprende al polimorfismo A-2518G de *MCP-1*. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se muestran los tres posibles patrones de restricción a obtener de acuerdo al genotipo que genera este polimorfismo. M: marcador de talla; AA: genotipo homocigoto A; AG: genotipo heterocigoto; GG: genotipo homocigoto G.

Con la finalidad de corroborar que efectivamente el patrón de restricción correspondía a los genotipos esperados, se secuenciaron los PCR de muestras representativas cuyo genotipo se había definido previamente mediante PCR-RFLP. Se identificó el sitio de corte de la enzima *PvuII* en la secuencia y se analizó el electroferograma obtenido (Figura 13 A-C). Las secuencias se cotejaron también contra la secuencia de referencia de *MCP-1*, con la finalidad de confirmar que correspondían a la región que se deseaba evaluar (Figura 13D).

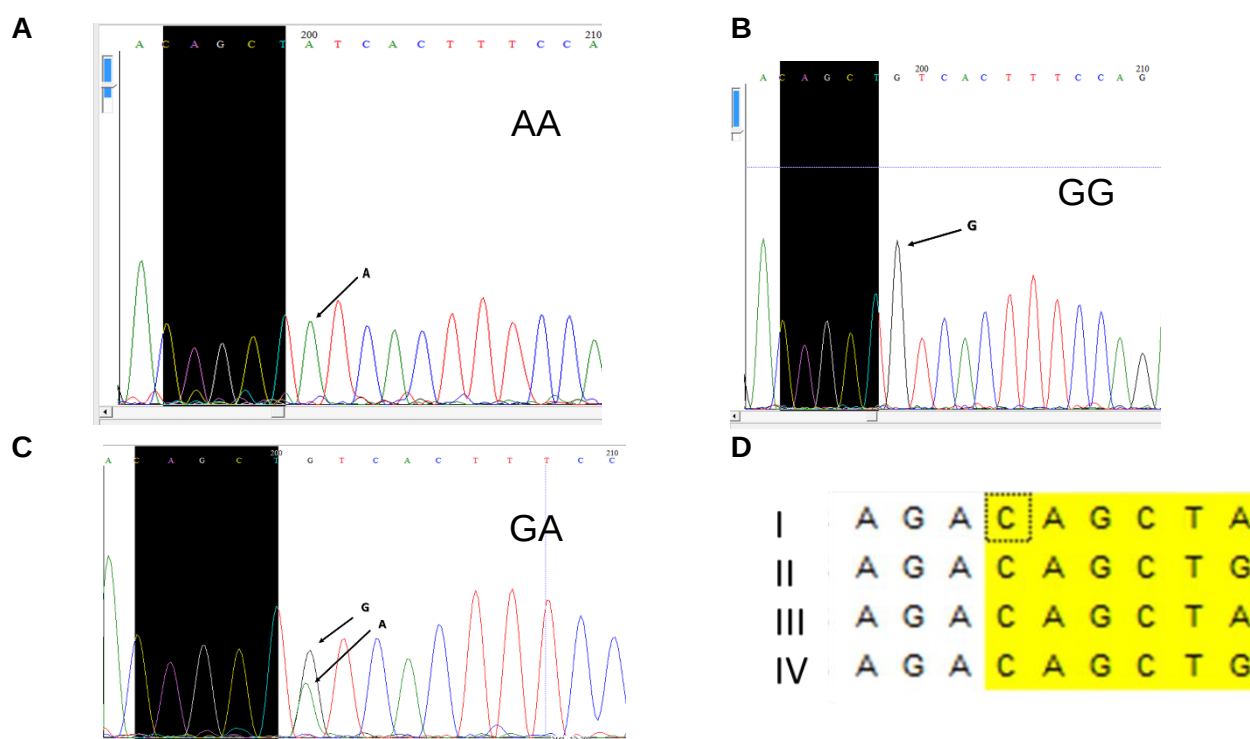


Figura 13. Secuenciación del polimorfismo A-2518G de *MCP-1*. Electroferograma de la secuenciación de la región A-2518G de *MCP-1* de muestras representativas. **A.** Genotipo de un individuo (CV25) homocigoto para el alelo A. **B.** Genotipo de un individuo (CV24) homocigoto para el alelo G. **C.** Genotipo de un individuo (CV23) heterocigoto AG. **D.** Alineamiento de las secuencias con la secuencia de referencia de la región que comprende al polimorfismo A-2518G de *MCP-1*. I: Secuencia de referencia; II: CV23; III: CV25; IV: CV24. Las flechas indican la ubicación de la variante A-2518G de *MCP-1*.

La frecuencia de genotipos y alelos para *MCP-1* fue evaluada de acuerdo a los grupos de estudio establecidos (Tabla 5).

Tabla 5. Frecuencia alélica y de genotipos del polimorfismo A-2518G de *MCP-1* de acuerdo con los diferentes grupos de estudio.

Grupo de estudio	Frecuencia alélica (%)		Frecuencia de genotipos (%)		
	G	A	GG	AG	AA
Controles n=36	51.3	48.6	22.2	58.3	19.44
DMT2 n=29	53.4	46.5	34.5	38	27.6
DMT2CV n=37	66.2	33.8	48.6	35.1	16.2

La distribución alélica del grupo control se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=1.33$, gl= 2, $p= 0.512$), por lo tanto, las fuerzas de la especiación no influyeron en la distribución de los alelos.

Se observó en primer lugar que la frecuencia alélica del polimorfismo A-2518G de *MCP-1* del grupo control y DMT2 son semejantes, mientras que la frecuencia del alelo G para el grupo DMT2CV es de más del 60% (Tabla 5).

Por otro lado, la distribución de genotipos del grupo control es la esperada para una variante que se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg, donde vemos que la mitad son heterocigotos y el resto se distribuye entre los homocigotos. En el caso de los individuos del grupo DMT2, la distribución de los tres posibles genotipos es homogénea, lo cual explica que tengan una distribución alélica semejante al grupo control. En el caso del grupo DMT2CV, la frecuencia genotípica del homocigoto G es superior a cualquier otra combinación (Tabla 5).

A pesar de las observaciones hechas sobre los datos de las frecuencias alélicas y de genotipos, al calcular el riesgo, mediante la razón de momios, que podría conferir la presencia del alelo G de padecer complicaciones vasculares en los pacientes con DMT2 este no fue significativo ($\alpha=0.05$).

Por otro lado, al contrastar el genotipo homocigoto G contra el resto, agrupando a los pacientes diabéticos contra el grupo control, se encontró que el homocigoto G para el polimorfismo A-2518G de *MCP-1* tenía un riesgo 2.5 veces mayor (O.R.= 2.57, I.C.=1.02-6.5, $p=0.04$) a padecer DMT2 que los homocigotos A o heterocigotos.

4. Concentración plasmática de MCP-1 en los participantes

Se determinó la concentración plasmática de MCP-1 en los 120 individuos, 80 pacientes y 40 controles. Se calculó la concentración plasmática mediante la interpolación de los datos en una curva patrón realizada de forma simultánea con los ensayos de cuantificación.

La variabilidad intraensayo fue del 16% y la reproducibilidad interensayo de 13.5%.

Se analizó la concentración plasmática de MCP-1 (Figura 14), y se determinó que no existían diferencias significativas entre estos grupos ($F=2.814$, $n=39$ (Control), 40 (DMT2), 40 (DMT2CV), $p=0.064$). Teniendo en cuenta que tanto en el grupo con DMT2 como el DMT2CV hay valores extremos de concentración plasmática de MCP-1 se reanalizaron

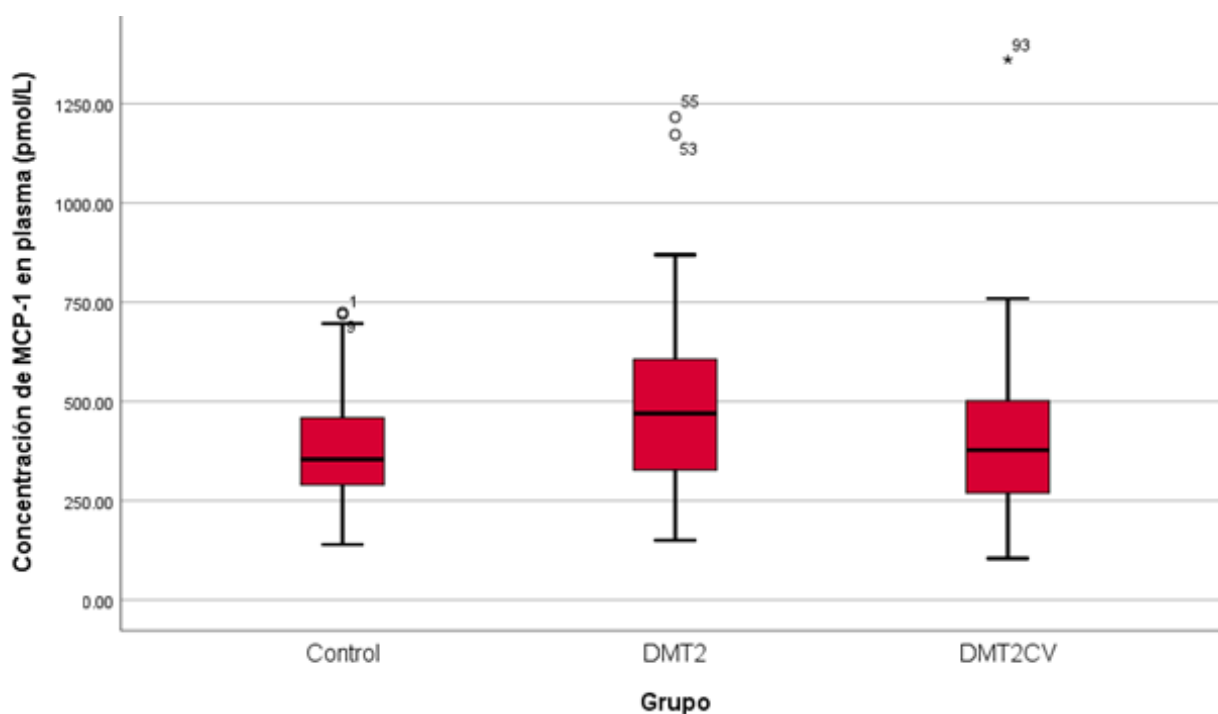


Figura 14. Evaluación de la concentración plasmática de MCP-1 en los diferentes grupos de estudio. Mediana $\pm$ primer y tercer cuartiles. Las barras representan el intervalo de confianza.

los datos mediante un ensayo no paramétrico, lo cual confirmó el resultado obtenido anteriormente.

Al agrupar a todos los individuos de acuerdo con el genotipo de *MCP-1* que portaban y comparar las concentraciones plasmáticas de MCP-1 (Figura 15), tampoco se encontraron diferencias significativas entre ellos ($F=0.791$, $n=20$ (AA), 45 (AG), 36 (GG), $p=0.456$). Sin embargo, debe señalarse que todos los valores extremos de concentraciones pertenecen a individuos con el genotipo homocigoto G.

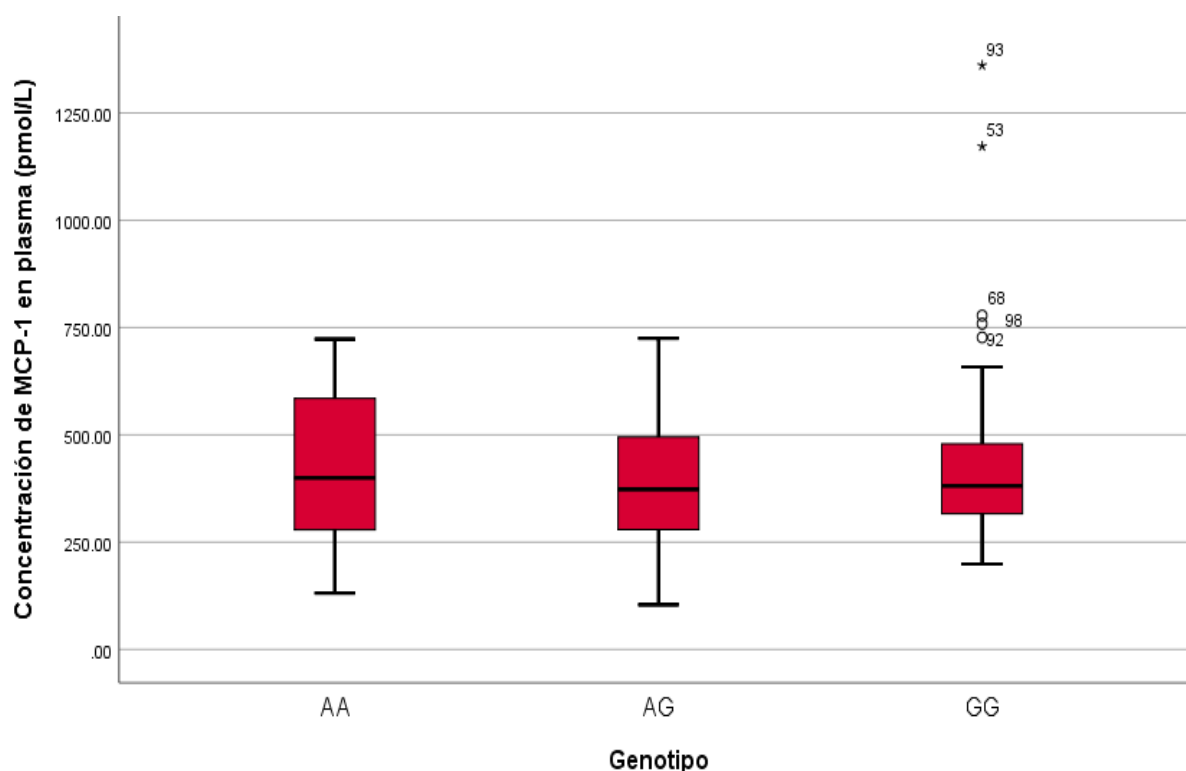


Figura 15. Evaluación de la concentración plasmática de MCP-1 de acuerdo con el genotipo. Mediana $\pm$ primer y tercer cuartiles. Las barras representan el intervalo de confianza.

Los individuos se reagruparon de acuerdo con su genotipo y el grupo de estudio al cual pertenecían y se compararon las concentraciones plasmáticas entre ellos (Figura 16). En este caso tampoco se encontraron diferencias significativas entre ellas ($F=1.181$, $n=7$ (Control/AA), 21 (Control/AG), 8 (Control/GG), 8 (DMT2/AA), 11 (DMT2/AG), 10 (DMT2/GG), 6 (DMT2CV/AA), 13 (DMT2CV/AG), 18 (DMT2CV/GG), $p=0.320$). De aquí se pudo concluir, que las concentraciones plasmáticas de MCP-1 no dependieron ni del grupo

de estudio ni del genotipo de la variante A-2518G de *MCP-1* que presentaron los individuos.

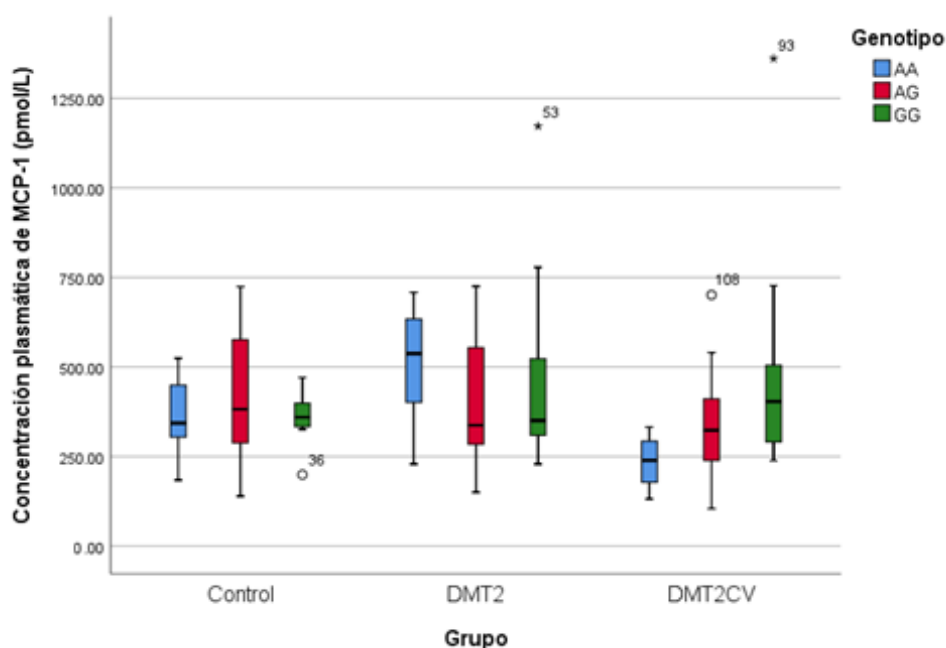


Figura 16. Evaluación de la concentración plasmática de MCP-1 estratificada por grupos y genotipos. Mediana $\pm$ primer y tercer cuartiles. Las barras representan el intervalo de confianza.

Por último, tampoco se encontraron diferencias entre las concentraciones plasmáticas de MCP-1 entre los controles y los pacientes con DMT2 (con y sin complicaciones vasculares) (Figura 17) ($F=3.288$, $n=39$ (Control), 80 (DMT2+DMT2CV), $p=0.072$).

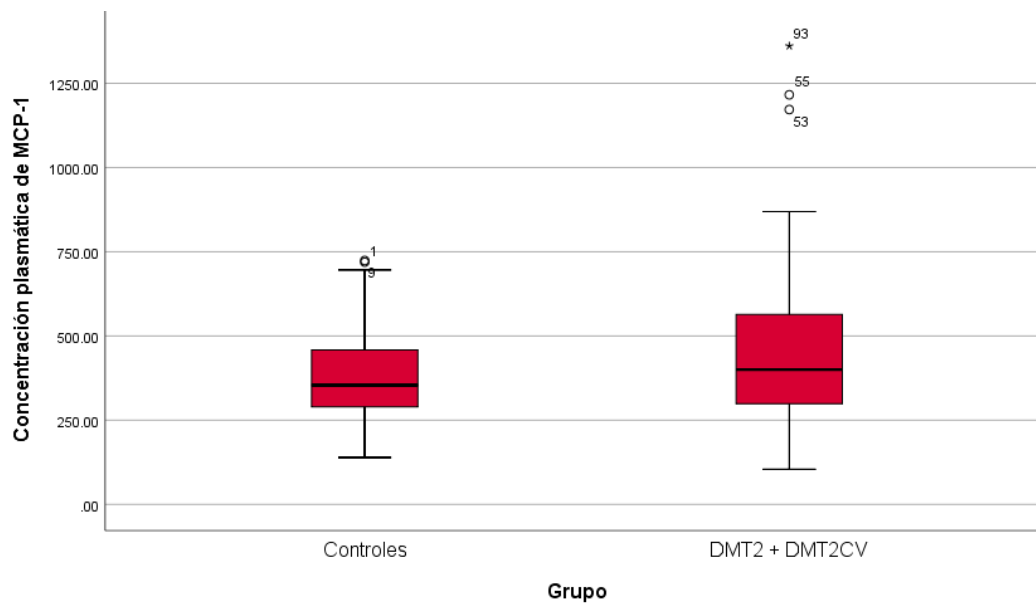


Figura 17. Evaluación de la concentración plasmática de MCP-1 de acuerdo a la condición de salud: controles vs personas con DMT2. Mediana $\pm$ primer y tercer cuartiles. Las barras representan el intervalo de confianza.

Sin embargo, al agrupar a todos los individuos de acuerdo con su masa corporal (individuos con sobrepeso y obesos contra individuos con IMC normal) se encontraron diferencias entre la concentración plasmática de MCP-1 de estos individuos ($t = -2.112$, $n = 34$ (IMC normal), 70 (IMC patológico), $p = 0.037$) (Figura 18).

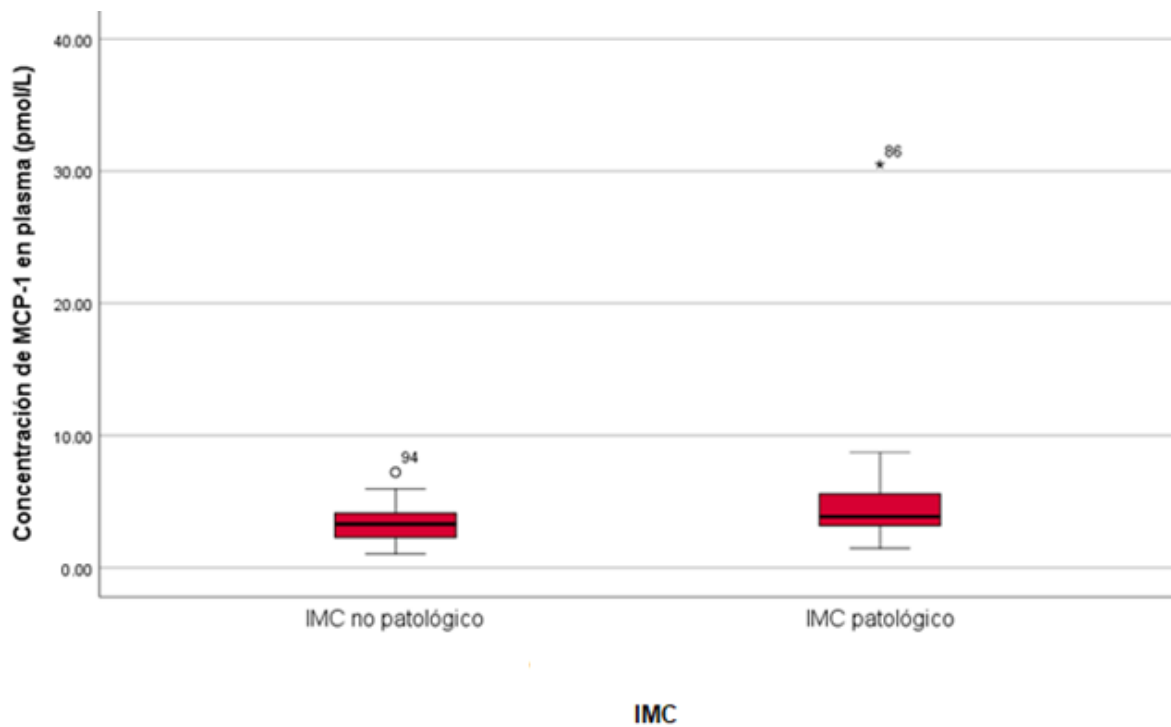


Figura 18. Evaluación de la concentración plasmática de MCP-1 de acuerdo con el Índice de Masa Corporal (IMC), IMC normal vs IMC patológico. Mediana $\pm$ primer y tercer cuartiles. Las barras representan el intervalo de confianza.

Estos resultados confirman el posible rol de los marcadores proinflamatorios en la obesidad.

5. Determinación de la expresión de *Mac-1*

Obtención de RNA

Se agruparon a los participantes por grupo y genotipo y se seleccionó al azar al menos diez individuos de cada grupo, incluyendo en cada uno de estos grupos al menos tres individuos de cada genotipo. A los mismos se les extrajo RNA. La evaluación de la calidad y el rendimiento del RNA obtenido se realizaron por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (Tabla 6).

Tabla 6. Rendimiento y calidad del RNA obtenido de muestras de sangre de los participantes.

Grupos de estudio	Rendimiento total (μg)*	Relación 260/280*
Controles n=13	10.8 ± 3.09	1.92 ± 0.02
DMT2 n=11	6.5 ± 2.24	1.92 ± 0.02
DMT2CV n=12	5.29 ± 1.55	2.00 ± 0.06

*Media $\pm$ desviación estándar

De acuerdo con el índice 260/280 de las muestras de RNA purificadas, las mismas poseen suficiente pureza para ser utilizadas en las reacciones de RT-PCR. Adicionalmente, en el análisis de las muestras de RNA mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% se observó la presencia de las dos bandas que corresponden al RNA ribosomal 28s y 18s, además del barrido de fondo y las bandas de menor tamaño que corresponden con mensajeros, lo cual nos confirma que las muestras poseen la integridad necesaria para sintetizar cDNA a partir de ellas.

Expresión de *Mac-1* en células polimorfonucleares.

Se llevó a cabo la electroforesis en gel de agarosa de los amplicones obtenidos a partir de cDNA de *Mac-1* y *GAPDH* como normalizador (Figura 19) y se evaluó la expresión relativa de *Mac-1* por medio de densitometría.

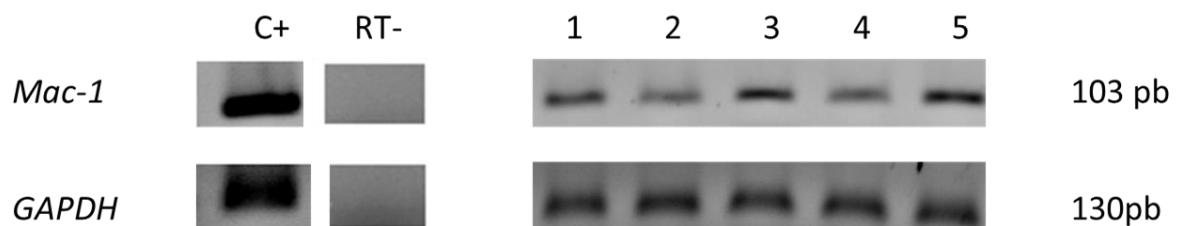


Figura 19. Evaluación de la expresión relativa de *Mac-1*. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de PCR de *Mac-1* y *GAPDH* correspondientes. C+: Control positivo de 10^{10} copias; RT-: Producto de RT-; 1-5: Muestras representativas. 1: 36Control; 2: 28DMT2; 3: 31DMT2; 4: 37DMT2; 5: 25DMT2CV.

Se evaluó la expresión relativa de *Mac-1* respecto a la expresión de *GAPDH* (Figura 20), considerando a los valores del grupo control como la expresión estándar.

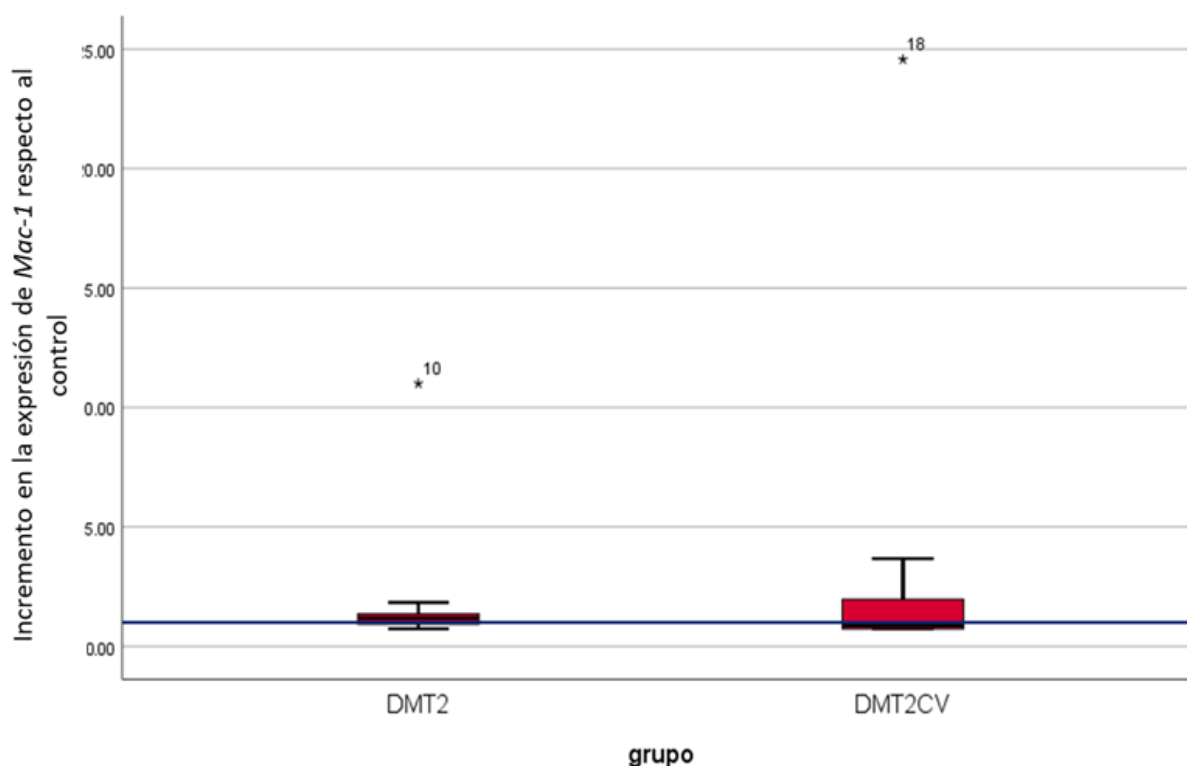


Figura 20. Evaluación de la expresión relativa de *Mac-1* respecto al control. Se representa con una línea horizontal al valor correspondiente al control como referencia. DMT2: Individuos diabéticos sin complicaciones vasculares. DMT2CV: Individuos diabéticos con complicaciones microvasculares. Mediana $\pm$ primer y tercer cuartil. Las barras representan el intervalo de confianza.

La expresión de *Mac-1* de cada grupo estudiado fue igual al control ($\alpha=0.05$).

Se evaluó también la expresión de *Mac-1* respecto al grupo de estudio y el genotipo que los participantes portaban (Figura 21).

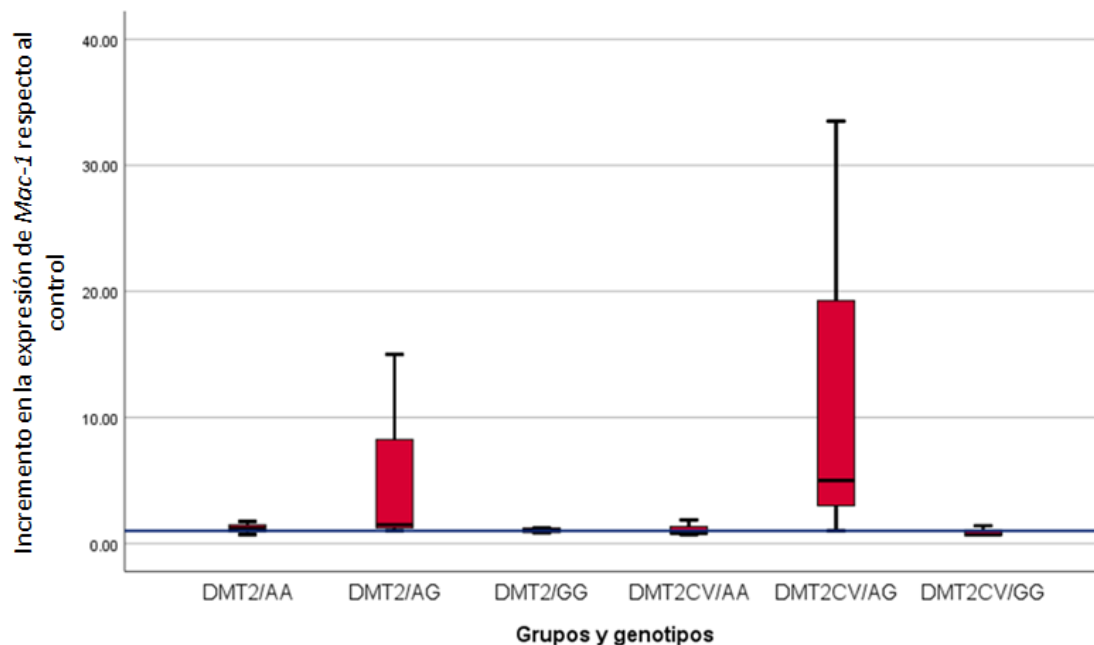


Figura 214 . Evaluación de la expresión relativa de *Mac-1* respecto al control (grupo/genotipo del polimorfismo A-2518G de *MCP-1*). Se representa con una línea horizontal al valor correspondiente al control como referencia. DMT2: Individuos diabéticos sin complicaciones vasculares. DMT2CV: Individuos diabéticos con complicaciones microvasculares. Mediana $\pm$ primer y tercer cuartil. Las barras representan el intervalo de confianza.

Si bien la expresión de *Mac-1* del heterocigoto es mayor a la de los homocigotos de la variante A-2518G de *MCP-1* en ambos grupos de diabéticos con y sin complicaciones microvasculares (Figura 21), la diferencia en la expresión de *Mac-1* no es significativa al comparar los dos grupos de heterocigotos (DMT2 y DMT2CV) ($\alpha=0.05$).

Discusión

En este trabajo se planteó como objetivo el establecer la relación existente entre el polimorfismo A-2518G de *MCP-1* y su expresión, así como la expresión de *Mac-1*, con la finalidad de identificar, a largo plazo, moléculas que podrían servir como biomarcadores relacionados con las complicaciones microvasculares.

En nuestro estudio identificamos que la proporción de individuos homocigotos para el alelo G del polimorfismo A-2518G de *MCP-1* es mayor entre los individuos del grupo DMT2CV que en cualquiera de los otros dos grupos (Tabla 5), sin que esta condición confiera riesgo a padecer complicaciones microvasculares. Este resultado coincide con lo encontrado por Matía-García et al. en 2018, quien a pesar de reportar una diferencia evidente entre la proporción de individuos homocigotos para el alelo G en el grupo control y el grupo de individuos con resistencia a la insulina, con una mayor proporción de individuos homocigotos G en este último grupo, la misma no es estadísticamente significativa.

Si bien, la mayoría de los estudios donde se vincula al polimorfismo A-2518G de *MCP-1* con complicaciones microvasculares de la diabetes señalan que la variante G es la que se relaciona con las mismas (Dong et al., 2014; Jeon, Choi, Park, Lee, & Oh, 2013; Katakami et al., 2010; Ninomiya et al., 2015), especialmente con nefropatía y retinopatía diabética, también existen reportes en los que se menciona que la variante alélica que se presente no tiene un efecto significativo en la manifestación de las complicaciones microvasculares de la DMT2 (Yoshioka, Yoshida, Kogure, Takakura, & Umekawa, 2009).

Por otro lado, el hallazgo de que los portadores del alelo G de la variante A-2518G de *MCP-1* poseen el doble de riesgo de padecer DMT2 podría estar relacionado con la resistencia a la insulina que deben padecer estos individuos o con que en el grupo de pacientes hay mayor proporción de individuos obesos que en el grupo control (Tabla 3). Este último aspecto podría estar influyendo si se tiene en cuenta que en la obesidad hay un incremento de moléculas proinflamatorias. Sería conveniente evaluar los niveles de resistencia la insulina en la muestra estudiada y así poder establecer una relación entre estos factores de forma más robusta.

Nuestros resultados contrastan con los estudios que se han reportado hasta el momento al respecto de la relevancia del alelo G del polimorfismo A-2518G de *MCP-1* en la DMT2,

donde algunos autores refieren una relación negativa entre la presencia del alelo G y el diagnóstico de DMT2 y resistencia a la insulina (Jing et al., 2011; Karadeniz et al., 2010; Kouyama et al., 2008; Simeoni et al., 2004), mientras que en nuestra población se encontró que existe un mayor riesgo a padecer DMT2 al portar el alelo G del polimorfismo A-2518G de *MCP-1*. Por otro lado, el portar el alelo G se ha reportado como un factor de riesgo a padecer complicaciones microvasculares de la diabetes, tanto en nefropatía diabética como en retinopatía (Dong et al., 2014; Jeon, Choi, Park, Lee, & Oh, 2013; Katakami et al., 2010; Ninomiya et al., 2015), aunque para la población que se analizó en este estudio no existió un valor de riesgo asociado a la presencia del alelo G del polimorfismo A-2518G de *MCP-1* con dichas complicaciones.

Entonces, nuestros resultados contrastan con lo mencionado por aquellos autores que reportan que el alelo A es el que se encuentra asociado a la DMT2 (Panee, 2012), a la vez que difiere con aquellos otros que mencionan una relación directa con complicaciones microvasculares. Esto podría estar relacionado, por un lado, con el hecho de que ningún otro estudio de los mencionados anteriormente fue realizado en población mexicana o latinoamericana, sino que son poblaciones asiáticas o incluso caucásicas, lo cual podría provocar que la interacción del aporte del polimorfismo A-2518G de *MCP-1* con otros polimorfismos, que tengan una frecuencia diferente en ambas poblaciones enmascare o resalte el efecto de este polimorfismo en cualquiera de los casos; por otro lado, se ha relacionado también al alelo G del polimorfismo A-2518G de *MCP-1* con resistencia a la insulina siendo esta una característica de la DMT2, lo cual podría explicar que el genotipo GG confiera riesgo mayor a padecer DMT2 (Simeoni et al., 2004).

Es necesario considerar que la diabetes se relaciona con procesos de inflamación crónica, en los cuales se involucra *MCP-1*, por lo que los reportes que mencionan que la resistencia a la insulina y la obesidad se asocian con el alelo G contradicen de forma indirecta a los reportes que resaltan la relevancia del alelo A para el desarrollo de la DMT2, a su vez que contrasta con lo reportado anteriormente respecto a la funcionalidad del polimorfismo evaluado en este trabajo.

También se reporta con mayor frecuencia al genotipo G en el contexto de resistencia a la insulina por parte de Matia-García et al. en 2018, aunque su población con resistencia a

la insulina también tiene una proporción superior de individuos con obesidad respecto a la población control.

Por otro lado, la concentración de MCP-1 no tuvo diferencias significativas comparando por grupo, genotipo o incluso ambos (Figuras 14-16). Este resultado no coincide con ninguno de los reportados anteriormente para MCP-1 en DMT2 o cualquiera de sus complicaciones microvasculares (Jiang et al., 2016; Reddy et al., 2017). Tanto Jiang et al como Reddy et al mencionan en sus trabajos que quienes padecen complicaciones microvasculares de la DMT2 presentan una concentración plasmática de MCP-1 mayor que aquellos pacientes sin complicaciones microvasculares.

Se puede tomar en cuenta también que en este estudio sólo se consideró a aquellos pacientes con diagnóstico de al menos una complicación microvascular, sin considerar que los pacientes del grupo con complicaciones microvasculares podrían tener comorbilidad con complicaciones macrovasculares, lo cual podría diferenciar la concentración de MCP-1 en plasma, ya que existen reportes donde se vincula a la concentración elevada de MCP-1 en plasma con la aparición de las complicaciones microvasculares, pero independiente de las complicaciones microvasculares o incluso del padecimiento de la DMT2 (Xu, Liao, Zhou, Ming, & Wang, 2015).

Adicional a lo anterior, la falta de relación entre la concentración de MCP-1 y el polimorfismo A-2518G de *MCP-1* es algo que ya se había reportado previamente en el contexto de la nefropatía diabética (Zietz et al., 2005) aunque esto contrasta por la mayoría de los trabajos realizados en población asiática (Jiang et al., 2016). Estos resultados, de nuevo, pueden deberse a las diferencias en la distribución de otros alelos que pudieran interferir en la acción del mismo, o bien, a modificaciones epigenéticas a nivel de metilación que por el enfoque de este proyecto pudieron pasarse por alto (Liu et al., 2012).

También es necesario recordar que no sólo podría relacionarse a este polimorfismo con alguna posible metilación, sino que también podría ser blanco de RNA reguladores o modificaciones de histonas, sin embargo, se carece de la información experimental para aseverar o descartar que esta pudiera ser una causa de esta diferencia entre lo reportado y lo obtenido en este trabajo.

También se debe resaltar la participación de diversos factores de transcripción para los cuales existen sitios de unión, tanto en la región promotora como en la región

potenciadora, con lo cual es más complicado saber si alguno de estos se ve afectado realmente por el polimorfismo A-2518G de *MCP-1* para así, elucidar el efecto neto de este polimorfismo en los padecimientos con los cuales se asocia y finalmente descartar o reafirmar lo reportado por Rovin et al. en 1999.

Considerando que el valor de odds ratio para el genotipo GG del polimorfismo A-2518G de *MCP-1* comparando pacientes con DMT2 y controles resultó significativo, se evaluó la diferencia en la concentración plasmática estratificándolo de esta manera, sin embargo, tampoco fue significativo, indicando entonces que no existe relación en nuestra población entre la concentración plasmática de MCP-1 y la probabilidad de padecer DMT2.

Una forma de explicar que la relación existente entre la frecuencia alélica del polimorfismo A-2518G de *MCP-1* y la concentración plasmática de su producto con las complicaciones microvasculares de la DMT2 resultara poco clara es por la población en la que se estudió, esto ya que Vashi et al. reportaron en 2016 que las variantes génicas de diferentes moléculas proinflamatorias no se asocian con enfermedades del síndrome metabólico en niños mexicanos. Aunque en este estudio no se incluye al polimorfismo A-2518G de *MCP-1*, es posible considerar la posibilidad de que este siga la misma tendencia que los que se enlistan en el estudio de Vashi et al. de 2016.

Del mismo modo, ya que la expresión de MCP-1 está relacionada con la expresión de *Mac-1* (Nakazawa et al, 2007), al no ser significativa la diferencia de concentración plasmática de MCP-1 en los diferentes grupos, tampoco lo fue la expresión relativa de *Mac-1* en estos grupos, o incluso estratificándolos por genotipos.

Es necesario considerar que las mismas variables que podrían condicionar la poca diferencia en la concentración de MCP-1 podrían estar afectando la expresión de *Mac-1*, por lo que podría ser adecuado a futuro, para reducir el error en la interpretación de los datos, aumentar la cantidad de participantes con criterios de exclusión más estrictos, a fin de desaparecer las variables confusoras que en este estudio pudimos haber pasado por alto, y entonces poder resolver de forma concluyente el efecto que el polimorfismo A-2518G de *MCP-1* y su expresión podría tener sobre la aparición y desarrollo de las complicaciones microvasculares de la DMT2.

Se debe considerar que, al ser este el primer estudio reportado en el que se evalúa la participación del polimorfismo A-2518G de *MCP-1* en el contexto de las complicaciones

microvasculares de la DMT2 en población mexicana, no solo permite conocer las características de esta población para poder realizar investigación con la finalidad de profundizar nuestro conocimiento en las dinámicas que caracterizan a esta enfermedad, sino que también facilita el identificar las técnicas que podrían ser óptimas para poder estudiar de la mejor manera este problema de salud tan importante para la población nacional.

Finalmente, es necesario en futuras investigaciones afinar los criterios del estudio con la finalidad de tener conocimiento de las condiciones de salud y de vida de los participantes, para así estratificar aún más a los participantes y obtener así información valiosa sobre las moléculas que participan en el desarrollo de las complicaciones microvasculares de la DMT2.

Conclusiones

1. La frecuencia del alelo G para el polimorfismo A-2518G de *MCP-1* es mayor en individuos con complicaciones microvasculares respecto a diabéticos sin complicaciones y controles, aunque no se asocia a un mayor riesgo a padecer complicaciones vasculares ($\alpha= 0.05$).
2. El genotipo GG del polimorfismo A-2518G de *MCP-1* confiere un riesgo de más de dos veces a padecer DMT2 ($p= 0.04$).
3. La concentración plasmática de *MCP-1* es semejante entre los tres grupos estudiados, y es independiente del genotipo y la variante del polimorfismo A-2518G de *MCP-1* que se presente.
4. La concentración plasmática de *MCP-1* en la muestra estudiada se relaciona con la presencia de obesidad o sobrepeso.
5. La expresión de *Mac-1* es independiente de la variante del polimorfismo A-2518G de *MCP-1* y del grupo de individuos estudiado.

Perspectivas

1. Evaluar la expresión de *MCP-1* y *Mac-1* mediante técnicas distintas a las expuestas en este trabajo ayudaría a elucidar su papel en las complicaciones microvasculares de la DMT2.
2. La información obtenida mediante este trabajo permitirá contemplar otras variables confusoras en estudios posteriores y así evitar el efecto de las mismas.
3. Los resultados obtenidos en este trabajo podrían orientar investigaciones posteriores hacia otras enfermedades relacionadas con la DMT2 como son la resistencia a la insulina y la obesidad.

Referencias

4. Adair, B. D., Xiong, J.-P., Alonso, J. L., Hyman, B. T., & Arnaout, M. A. (2013). EM Structure of the Ectodomain of Integrin CD11b/CD18 and Localization of Its Ligand-Binding Site Relative to the Plasma Membrane. *PLoS ONE*, 8(2), e57951. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057951>
5. Alberti, K. G. M., Zimmet, P., & Shaw, J. (2005). The metabolic syndrome—a new worldwide definition. *The Lancet*, 366(9491), 1059-1062. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67402-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67402-8)
6. Andrade, P., Hoogland, G., Garcia, M. A., Steinbusch, H. W., Daemen, M. A., & Visser-Vandewalle, V. (2013). Elevated IL-1 β and IL-6 levels in lumbar herniated discs in patients with sciatic pain. *European Spine Journal*, 22(4), 714-720. <https://doi.org/10.1007/s00586-012-2502-x>
7. Angeles-Martínez, J., Posadas-Sánchez, R., Álvarez-León, E., Villarreal-Molina, T., Cardoso-Saldaña, G., Fragoso, J. M., ... Vargas-Alarcón, G. (2015). Monocyte chemoattractant protein-1 gene (MCP-1) polymorphisms are associated with risk of premature coronary artery disease in Mexican patients from the Genetics of Atherosclerotic Disease (GEA) study. *Immunology Letters*, 167(2), 125-130. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.08.003>
8. Arefieva, T. I., Kukhtina, N. B., Antonova, O. A., & Krasnikova, T. L. (2005). MCP-1-stimulated chemotaxis of monocytic and endothelial cells is dependent on activation of different signaling cascades. *Cytokine*, 31(6), 439-446. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2005.06.016>
9. Arnaout, M. A. (2016). Biology and structure of leukocyte β 2 integrins and their role in inflammation. *F1000Research*, 5, 2433. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9415.1>
10. Atkinson, M. A. (2012). The Pathogenesis and Natural History of Type 1 Diabetes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11), a007641-a007641. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007641>

11. Botros, N., Sluik, D., van Waateringe, R. P., de Vries, J. H. M., Geelen, A., & Feskens, E. J. M. (2017). Advanced glycation end-products (AGEs) and associations with cardio-metabolic, lifestyle, and dietary factors in a general population: the NQplus study. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 33(5), e2892. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2892>
12. Boucher, J., Kleinridders, A., & Kahn, C. R. (2014). Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(1), a009191-a009191. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009191>
13. Braley, A., Kwak, T., Jules, J., Harja, E., Landgraf, R., & Hudson, B. I. (2016). Regulation of Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Ectodomain Shedding and Its Role in Cell Function. *Journal of Biological Chemistry*, 291(23), 12057-12073. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.702399>
14. Breslin, W. L., Johnston, C. A., Strohacker, K., Carpenter, K. C., Davidson, T. R., Moreno, J. P., ... McFarlin, B. K. (2012). Obese Mexican American Children Have Elevated MCP-1, TNF- α , Monocyte Concentration, and Dyslipidemia. *PEDIATRICS*, 129(5), e1180-e1186. <https://doi.org/10.1542/peds.2011-2477>
15. Cefalu, W. T. (2009). Inflammation, Insulin Resistance, and Type 2 Diabetes: Back to the Future? *Diabetes*, 58(2), 307-308. <https://doi.org/10.2337/db08-1656>
16. Chawla, A., Chawla, R., & Jaggi, S. (2016). Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 20(4), 546. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.183480>
17. Chen, L., Chen, R., Wang, H., & Liang, F. (2015). Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. *International Journal of Endocrinology*, 2015, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2015/508409>
18. Chow, F., Ozols, E., Nikolic-Paterson, D. J., Atkins, R. C., & Tesch, G. H. (2004). Macrophages in mouse type 2 diabetic nephropathy: correlation with diabetic state and progressive renal injury. *Kidney International*, 65(1), 116-128. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00367.x>

19. Chow, F. Y., Nikolic-Paterson, D. J., Ma, F. Y., Ozols, E., Rollins, B. J., & Tesch, G. H. (2007). Monocyte chemoattractant protein-1-induced tissue inflammation is critical for the development of renal injury but not type 2 diabetes in obese db/db mice. *Diabetologia*, 50(2), 471-480. <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0497-8>
20. Cifarelli, V., Libman, I. M., DeLuca, A., Becker, D., Trucco, M., & Luppi, P. (2007). Increased Expression of Monocyte CD11b (Mac-1) in Overweight Recent-Onset Type 1 Diabetic Children. *The Review of Diabetic Studies*, 4(2), 112-120. <https://doi.org/10.1900/RDS.2007.4.112>
21. de Vries, M. A., Alipour, A., Klop, B., van de Geijn, G.-J. M., Janssen, H. W., Njo, T. L., ... Castro Cabezas, M. (2015). Glucose-dependent leukocyte activation in patients with type 2 diabetes mellitus, familial combined hyperlipidemia and healthy controls. *Metabolism*, 64(2), 213-217. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.10.011>
22. Deng, X., Xu, M., Yuan, C., Yin, L., Chen, X., Zhou, X., ... Pang, L. (2013). Transcriptional regulation of increased CCL2 expression in pulmonary fibrosis involves nuclear factor- κ B and activator protein-1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(7), 1366-1376. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.04.003>
23. Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S., & Sawaya, B. E. (2009). Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 29(6), 313-326. <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>
24. Dong, L., Lv, X. Y., Wang, B. J., Wang, Y. Q., Mu, H., Feng, Z. L., & Liu, P. (2014). Association of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)2518A/G polymorphism with proliferative diabetic retinopathy in northern Chinese type 2 diabetes. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 252(12), 1921-1926. <https://doi.org/10.1007/s00417-014-2651-1>
25. Fang, W. B., Jokar, I., Zou, A., Lambert, D., Dendukuri, P., & Cheng, N. (2012). CCL2/CCR2 Chemokine Signaling Coordinates Survival and Motility of Breast Cancer Cells through Smad3 Protein- and p42/44 Mitogen-activated Protein Kinase

- (MAPK)-dependent Mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 287(43), 36593-36608. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.365999>
26. Feng, L., Matsumoto, C., Schwartz, A., Schmidt, A. M., Stern, D. M., & Pile-Spellman, J. (2005). Chronic Vascular Inflammation in Patients With Type 2 Diabetes: Endothelial biopsy and RT-PCR analysis. *Diabetes Care*, 28(2), 379-384. <https://doi.org/10.2337/diacare.28.2.379>
 27. Flores-Villanueva, P. O., Ruiz-Morales, J. A., Song, C.-H., Flores, L. M., Jo, E.-K., Montaña, M., ... Granados, J. (2005). A functional promoter polymorphism in monocyte chemoattractant protein-1 is associated with increased susceptibility to pulmonary tuberculosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(12), 1649-1658. <https://doi.org/10.1084/jem.20050126>
 28. Fowler, M. J. (2008). Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Clinical Diabetes*, 26(2), 6.
 29. Frau, F., Crowther, D., Ruetten, H., & Allebrandt, K. V. (2017). Type-2 diabetes-associated variants with cross-trait relevance: Post-GWAS strategies for biological function interpretation. *Molecular Genetics and Metabolism*, 121(1), 43-50. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2017.03.004>
 30. Furukawa, S., Soeda, S., Kiko, Y., Suzuki, O., Hashimoto, Y., Watanabe, T., ... Fujimori, K. (2013). MCP-1 Promotes Invasion and Adhesion of Human Ovarian Cancer Cells. *ANTICANCER RESEARCH*, 6.
 31. Genecards, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CCL2#expression>, 2018
 32. Grossmann, V., Schmitt, V. H., Zeller, T., Panova-Noeva, M., Schulz, A., Laubert-Reh, D., ... Wild, P. S. (2015). Profile of the Immune and Inflammatory Response in Individuals With Prediabetes and Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 38(7), 1356-1364. <https://doi.org/10.2337/dc14-3008>
 33. Hacke, K., Rincon-Orozco, B., Buchwalter, G., Siehler, S.Y., Wasylyk, B., Wiesmuller, L. & Rosl, F. Regulation of MCP-1 chemokine transcription by p53. *Mol Cancer*. 2010; 9:82. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-82>.

34. Hanemann, A. L. P., Libório, A. B., Daher, E. F., Martins, A. M. C., Pinheiro, M. C. C., Sousa, M. S., & Bezerra, F. S. M. (2013). Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1) in Patients with Chronic Schistosomiasis Mansoni: Evidences of Subclinical Renal Inflammation. *PLoS ONE*, 8(11), e80421. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080421>
35. Harrington, J. R. (2000). The Role of MCP-1 in Atherosclerosis. *Stem Cells*, 18(1), 65-66. <https://doi.org/10.1634/stemcells.18-1-65>
36. Herath, H., Herath, R., & Wickremasinghe, R. (2017). Gestational diabetes mellitus and risk of type 2 diabetes 10 years after the index pregnancy in Sri Lankan women—A community based retrospective cohort study. *PLOS ONE*, 12(6), e0179647. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179647>
37. Hilgers, K. F., Hartner, A., Porst, M., Mai, M., Wittmann, M., Hugo, C., ... Mann, J. F. E. (2000). Monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage infiltration in hypertensive kidney injury. *Kidney International*, 58(6), 2408-2419. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00424.x>
38. Husemann, J., Ostfeld, A., Febbraio, M., Kodama, T., & Silverstein, S. C. (2001). CD11b/CD18 Mediates Production of Reactive Oxygen Species by Mouse and Human Macrophages Adherent to Matrixes Containing Oxidized LDL. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21(8), 1301-1305. <https://doi.org/10.1161/hq0801.095150>
39. IMMS (2015) “Diagnóstico y tratamiento de retinopatía diabética, Guía de Referencia Rápida. GP C. IMSS-171-09
40. InterPro, <https://www.ebi.ac.uk/interpro/protein/P13500>, 2018
41. Jeon, H. J., Choi, H. J., Park, B. H., Lee, Y. H., & Oh, T. (2013). Association of Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) 2518A/G Polymorphism with Proliferative Diabetic Retinopathy in Korean Type 2 Diabetes. *Yonsei Medical Journal*, 54(3), 621. <https://doi.org/10.3349/ymj.2013.54.3.621>
42. Ji, W.-T., Chen, H.-R., Lin, C.-H., Lee, J.-W., & Lee, C.-C. (2014). Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP-1) Modulates Pro-Survival Signaling to Promote

- Progression of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *PLoS ONE*, 9(2), e88952. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088952>
43. Jiang, Z., Hennein, L., Xu, Y., Bao, N., Coh, P., & Tao, L. (2016). Elevated serum monocyte chemoattractant protein-1 levels and its genetic polymorphism is associated with diabetic retinopathy in Chinese patients with Type 2 diabetes. *Diabetic Medicine*, 33(1), 84-90. <https://doi.org/10.1111/dme.12804>
 44. Jing, Y., Zhu, D., Bi, Y., Yang, D., Hu, Y., & Shen, S. (2011). Monocyte chemoattractant protein 1-2518 A/G polymorphism and susceptibility to type 2 diabetes in a Chinese population. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 412(5-6), 466-469. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.11.030>
 45. Karadeniz, M., Erdogan, M., Cetinkalp, S., Berdeli, A., Eroglu, Z., & Ozgen, A. G. (2010). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 2518G/A gene polymorphism in Turkish type 2 diabetes patients with nephropathy. *Endocrine*, 37(3), 513-517. <https://doi.org/10.1007/s12020-010-9342-4>
 46. Katakami, N., Matsuhisa, M., Kaneto, H., Matsuoka, T., Imamura, K., Ishibashi, F., ... Yamasaki, Y. (2010). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene polymorphism as a potential risk factor for diabetic retinopathy in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 89(1), e9-e12. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2010.04.006>
 47. KEGG PATHWAY: AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications - Homo sapiens (human). (s. f.). Recuperado 30 de noviembre de 2018, de https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04933
 48. Kiyici, S., Erturk, E., Budak, F., Ersoy, C., Tuncel, E., Duran, C., ... Imamoglu, S. (2006). Serum Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Monocyte Adhesion Molecules in Type 1 Diabetic Patients with Nephropathy. *Archives of Medical Research*, 37(8), 998-1003. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2006.06.002>
 49. Koch, M., Chitayat, S., Dattilo, B. M., Schiefner, A., Diez, J., Chazin, W. J., & Fritz, G. (2010). Structural Basis for Ligand Recognition and Activation of RAGE. *Structure*, 18(10), 1342-1352. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.05.017>

50. Kouyama, K., Miyake, K., Zenibayashi, M., Hirota, Y., Teranishi, T., Tamori, Y., ... Kasuga, M. (2008). Association of serum MCP-1 concentration and MCP-1 polymorphism with insulin resistance in Japanese individuals with obese type 2 diabetes. *The Kobe Journal of Medical Sciences*, 53(6), 345-354.
51. Law, S.K. (1988). C3 receptors on macrophages. *J Cell Sci Suppl.* 9:67-97.
52. Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.-L., & Fernández-Mej, C. (2013). Oxidative Stress in Diabetes Mellitus and the Role Of Vitamins with Antioxidant Actions. En J. A. Morales-Gonzalez (Ed.), *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants*. InTech. <https://doi.org/10.5772/51788>
53. Li, J. P., Wu, H., Xing, W., Yang, S. G., Lu, S. H., Du, W. T., ... Han, Z. C. (2010). Interleukin-27 as a Negative Regulator of Human Neutrophil Function: Interleukin-27 as a Negative Regulator of Human Neutrophil Function. *Scandinavian Journal of Immunology*, 72(4), 284-292. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2010.02422.x>
54. Lillioja, S., Mott, D. M., Spraul, M., Ferraro, R., Foley, J. E., Ravussin, E., ... Bogardus, C. (1993). Insulin Resistance and Insulin Secretory Dysfunction as Precursors of Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus: Prospective Studies of Pima Indians. *New England Journal of Medicine*, 329(27), 1988-1992. <https://doi.org/10.1056/NEJM199312303292703>
55. Lim, A. (2014). Diabetic nephropathy & complications and treatment. *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease*, 361. <https://doi.org/10.2147/IJNRD.S40172>
56. Lima, G., Soto-Vega, E., Atisha-Fregoso, Y., Sánchez-Guerrero, J., Vallejo, M., Vargas-Alarcón, G., & Llorente, L. (2007). MCP-1, RANTES, and SDF-1 polymorphisms in Mexican patients with systemic lupus erythematosus. *Human Immunology*, 68(12), 980-985. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2007.10.007>
57. Liu, Z. H., Chen, L. L., Deng, X. L., Song, H. J., Liao, Y. F., Zeng, T. S., ... Li, H. Q. (2012). Methylation status of CpG sites in the MCP-1 promoter is correlated to serum MCP-1 in Type 2 diabetes, 5.
58. Matia-García, I., Salgado-Goytia, L., Ramos-Arellano, L. E., Muñoz-Valle, J. F., Armenta-Solís, A., Garibay-Cerdenares, O. L., ... Parra-Rojas, I. (2018). A possible

- association between the -2518 A>G MCP-1 polymorphism and insulin resistance in school children. *Archives of Endocrinology and Metabolism*, 62(1), 79-86. <https://doi.org/10.20945/2359-3997000000012>
59. Montesanto, A., Bonfigli, A. R., Crocco, P., Garagnani, P., De Luca, M., Boemi, M., ... Rose, G. (2018). Genes associated with Type 2 Diabetes and vascular complications. *Aging*, 10(2), 178-196. <https://doi.org/10.18632/aging.101375>
 60. Morales, P. A. K., González, M. G. V., & Kalb, M. M. Y. (s. f.). JOSÉ MELJEM MOCTEZUMA, 151.
 61. Morii, T., Fujita, H., Narita, T., Shimotomai, T., Fujishima, H., Yoshioka, N., ... Ito, S. (2003). Association of monocyte chemoattractant protein-1 with renal tubular damage in diabetic nephropathy. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 17(1), 11-15.
 62. Nakazawa, T., Hisatomi, T., Nakazawa, C., Noda, K., Maruyama, K., & She, H., Matsubara, A., Miyahara, S., Nakao, S., Yin, Y., Benowitz, L., Hafezi-Moghadam, A. & Miller, J. (2007). Monocyte chemoattractant protein 1 mediates retinal detachment-induced photoreceptor apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104. 2425-30. [10.1073/pnas.0608167104](https://doi.org/10.1073/pnas.0608167104).
 63. Nathan, D.M. (1993). Long-Term Complications of Diabetes Mellitus. *N Engl J Med* 328:1676-1685. doi: 10.1056/NEJM199306103282306
 64. Nazar, C. M. J. (2014). Diabetic nephropathy; principles of diagnosis and treatment of diabetic kidney disease. *Diabetic Nephropathy*, 3(1), 6.
 65. Ninomiya, H., Katakami, N., Osonoi, T., Saitou, M., Yamamoto, Y., Takahara, M., ... Shimomura, I. (2015). Association between new onset diabetic retinopathy and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) polymorphism in Japanese type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 108(3), e35-e37. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2015.04.006>
 66. Oliveira, M. I. A., Souza, E. M. de, Pedrosa, F. de O., Réa, R. R., Alves, A. da S. C., Picheth, G., & Rego, F. G. de M. (2013). RAGE receptor and its soluble isoforms

- in diabetes mellitus complications. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 49(2), 97-108. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442013000200004>
67. Ozougwu, O. (2013). The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Journal of Physiology and Pathophysiology*, 4(4), 46-57. <https://doi.org/10.5897/JPAP2013.0001>
 68. Pandyarajan, V., Phillips, N. B., Rege, N., Lawrence, M. C., Whittaker, J., & Weiss, M. A. (2016). Contribution of Tyr^{B26} to the Function and Stability of Insulin: STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS AT A CONSERVED HORMONE-RECEPTOR INTERFACE. *Journal of Biological Chemistry*, 291(25), 12978-12990. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.708347>
 69. Panee, J. (2012). Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) in obesity and diabetes. *Cytokine*, 60(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.06.018>
 70. Patsouris, D., Cao, J.-J., Vial, G., Bravard, A., Lefai, E., Durand, A., ... Rieusset, J. (2014). Insulin Resistance is Associated with MCP1-Mediated Macrophage Accumulation in Skeletal Muscle in Mice and Humans. *PLoS ONE*, 9(10), e110653. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110653>
 71. Pedicino, D., Francesca, A., Alessandro, V., Trotta, F., & Liuzzo, G. (2012). Type 2 Diabetes, Immunity and Cardiovascular Risk: A Complex Relationship. En O. Oguntibeju (Ed.), *Pathophysiology and Complications of Diabetes Mellitus*. InTech. <https://doi.org/10.5772/50611>
 72. Pendsey, S. (2010). Understanding diabetic foot. *International Journal of Diabetes in Developing Countries*, 30(2), 75. <https://doi.org/10.4103/0973-3930.62596>
 73. Phillips, R. J., Lutz, M., & Premack, B. (2005). Differential signaling mechanisms regulate expression of CC chemokine receptor-2 during monocyte maturation. *Journal of Inflammation*, 14.
 74. Pinzón, C.D., Serrano, M.L. & Sanabria, M.C. (2009). Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) en humanos.
 75. Pluskota, E., Woody, N. M., Szpak, D., Ballantyne, C. M., Soloviev, D. A., Simon, D. I., & Plow, E. F. (2008). Expression, activation, and function of integrin M 2 (Mac-

- 1) on neutrophil-derived microparticles. *Blood*, 112(6), 2327-2335. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-12-127183>
76. Rasmussen, H., Zawalich, K. C., Ganesan, S., Calle, R., & Zawalich, W. S. (1990). Physiology and Pathophysiology of Insulin Secretion. *Diabetes Care*, 13(6), 655-666. <https://doi.org/10.2337/diacare.13.6.655>
77. Raucchi, A., Cugusi, S., Antonelli, A., Barabino, S. M., Monti, L., Bierhaus, A., ... Bianchi, M. E. (2008). A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *The FASEB Journal*, 22(10), 3716-3727. <https://doi.org/10.1096/fj.08-109033>
78. Reddy, S., Amutha, A., Rajalakshmi, R., Bhaskaran, R., Monickaraj, F., Rangasamy, S., ... Balasubramanyam, M. (2017). Association of increased levels of MCP-1 and cathepsin-D in young onset type 2 diabetes patients (T2DM-Y) with severity of diabetic retinopathy. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 31(5), 804-809. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2017.02.017>
79. Ritter, A. M. V., Faria, A. P. C. de, Sabbatini, A., Corrêa, N. B., Brunelli, V., Modolo, R., & Moreno, H. (2017). MCP-1 Levels are Associated with Cardiac Remodeling but not with Resistant Hypertension. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. <https://doi.org/10.5935/abc.20170033>
80. Rull, A., Camps, J., Alonso-Villaverde, C., & Joven, J. (2010). Insulin Resistance, Inflammation, and Obesity: Role of Monocyte Chemoattractant Protein-1 (orCCL2) in the Regulation of Metabolism. *Mediators of Inflammation*, 2010, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2010/326580>
81. Sartipy, P., & Loskutoff, D. J. (2003). Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(12), 7265-7270. <https://doi.org/10.1073/pnas.1133870100>
82. Secretaría de Salud (2016) Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino (ENSANUT). México.
83. Simeoni, E., Hoffmann, M. M., Winkelmann, B. R., Ruiz, J., Fleury, S., Boehm, B. O., ... Vassalli, G. (2004). Association between the A?2518G polymorphism in the

- monocyte chemoattractant protein-1 gene and insulin resistance and Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*, 47(9), 1574-1580. <https://doi.org/10.1007/s00125-004-1494-4>
84. Stirban, A., Gawlowski, T., & Roden, M. (2014). Vascular effects of advanced glycation endproducts: Clinical effects and molecular mechanisms. *Molecular Metabolism*, 3(2), 94-108. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2013.11.006>
 85. Takeuchi, M. (2016). Serum Levels of Toxic AGEs (TAGE) May Be a Promising Novel Biomarker for the Onset/Progression of Lifestyle-Related Diseases. *Diagnostics*, 6(2), 23. <https://doi.org/10.3390/diagnostics6020023>
 86. Tucci, M., Quatraro, C., Frassanito, M. A., & Silvestris, F. (2006). Deregulated expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in arterial hypertension: role in endothelial inflammation and atheromasia: *Journal of Hypertension*, 24(7), 1307-1318. <https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000234111.31239.c3>
 87. Ueda, A., Ishigatsubo, Y., Okubo, T., & Yoshimura, T. (1997). Transcriptional Regulation of The Human Monocyte Chemoattractant Protein-1 Gene: COOPERATION OF TWO NF- κ B SITES AND NF- κ B/Rel SUBUNIT SPECIFICITY. *Journal of Biological Chemistry*, 272(49), 31092-31099. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.49.31092>
 88. United States, Department of Health and Human Services, & Pan American Health Organization. (2010). *Prevalence study of type 2 Diabetes and its risk factors: technical report = Estudio de prevalencia de la diabetes tipo 2 y sus factores de riesgo : reporte técnico*.
 89. Uribarri, J., Woodruff, S., Goodman, S., Cai, W., Chen, X., Pyzik, R., ... Vlassara, H. (2010). Advanced Glycation End Products in Foods and a Practical Guide to Their Reduction in the Diet. *Journal of the American Dietetic Association*, 110(6), 911-916.e12. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2010.03.018>
 90. Vashi, N., Stryjecki, C., Peralta-Romero, J., Suarez, F., Gomez-Zamudio, J., Burguete-Garcia, A.I., Cruz, M. & Meyre, D. (2016). Genetic markers of inflammation may not contribute to metabolic traits in Mexican children. *PeerJ* 4:e2090. doi:10.7717/peerj.2090

91. van Oostrom, A. J., van Wijk, J. P., Sijmonsma, T. P., Rabelink, T. J., & Castro Cabezas, M. (2004). Increased expression of activation markers on monocytes and neutrophils in type 2 diabetes. *The Netherlands Journal of Medicine*, 62(9), 320-325.
92. Vázquez-Lavista, L. G., Lima, G., Gabilondo, F., & Llorente, L. (2009). Genetic Association of Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1)-2518 Polymorphism in Mexican Patients With Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. *Urology*, 74(2), 414-418. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2009.04.016>
93. Vithian, K. & Hurel, S. 2010. Microvascular complications: pathophysiology and management. *Clin Med*. 10:505-509. doi:10.7861/clinmedicine.10-5-505
94. Wang, S., Mitu, G. M., & Hirschberg, R. (2008). Osmotic polyuria: an overlooked mechanism in diabetic nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 23(7), 2167-2172. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfn115>
95. Weber, C., Belge, K., von Hundelshausen, P., Draude, G., Steppich, B., Mack, M., Frankenberger, M. Weber, K.S.C. & Ziegler-Heitbrock H.W.L. (2000). Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *Journal of Leukocyte Biology*. 67: 699-704
96. Wellen, K. E. (2005). Inflammation, stress, and diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 115(5), 1111-1119. <https://doi.org/10.1172/JCI200525102>
97. Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., ... Chen, H. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1821-1830. <https://doi.org/10.1172/JCI200319451>
98. Xu, J., Liao, Y.-F., Zhou, W.-P., Ming, H.-L., & Wang, Q.-H. (2015). The MCP-1 Gene A-2518G Polymorphism Confers an Increased Risk of Vascular Complications in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 19(8), 411-417. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2014.0325>
99. Yang, S., Wang, S., Yang, B., Zheng, J., Cai, Y., & Yang, Z. (2016). Weight loss before a diagnosis of type 2 diabetes mellitus is a risk factor for diabetes

complications: *Medicine*, 95(49), e5618.
<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000005618>

100. Yoshimura, T. (2018). The chemokine MCP-1 (CCL2) in the host interaction with cancer: a foe or ally? *Cellular & Molecular Immunology*, 15(4), 335-345. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.135>
101. Yoshioka, K., Yoshida, T., Kogure, A., Takakura, Y., & Umekawa, T. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 -2518 polymorphism is not associated with diabetic retinopathy in Japanese type 2 diabetes. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 3(3), 166-168. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2009.07.008>
102. Zhang, Y., Ernst, C. A., & Rollins, B. J. (1996). MCP-1: Structure/Activity Analysis. *Methods*, 10(1), 93-103. <https://doi.org/10.1006/meth.1996.0083>
103. 91. Zietz, B., Büchler, C., Herfarth, H., Müller-Ladner, U., Spiegel, D., Schölmerich, J., & Schäffler, A. (2005). Caucasian patients with type 2 diabetes mellitus have elevated levels of monocyte chemoattractant protein-1 that are not influenced by the -2518 A-->G promoter polymorphism. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 7(5), 570-578. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2004.00436.x>

Anexo 1. Carta de aprobación del Hospital General de Iztapalapa

Asunto: investigación

JEI/633/17

18 de Octubre de 2017

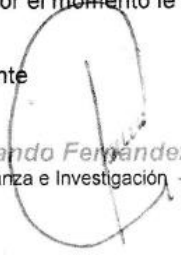
Dra. Lilia López Cánovas
Lic. en Biología Amairany Torres Álvarez
Investigadoras
Presente

En **relación** a su proyecto de investigación y **la Aplicación de su instrumento**, en esta Unidad Hospitalaria, la cual se le **proporcione** su **registro y autorización**; por el Comité de Ética en Investigación de la Secretaría de Salud de la Ciudad de México; le comunicamos que **no existe inconveniente**; para la realización de esta actividad.

Se le **sugiere se coordine** con él: Dr. Jesús Guerrero González, para que tenga acceso al servicio solicitado; traigan consigo el material que consideren necesario para la realización del mismo; se les **exhorta a no dar mal uso de la información obtenida (recuerde que es confidencial)**; así mismo se le **requiere un ejemplar** de la misma ya concluida.

Sin más por el momento le envió un cordial saludo.

Atentamente


Dr. Fernando Fernández Pérez
Jefe Enseñanza e Investigación

Ccp.- Dirección.- para su superior conocimiento.- presente
Subdirección Médica.- mismo fin.- presente
Jefe de Servicio de Medicina Interna.- mismo objetivo.- presente



SECRETARÍA DE SALUD

Hospital General Iztapalapa
"Dr. Juan Ramón de la Fuente"
Jefatura de Enseñanza e Investigación

Av. Ermita Iztapalapa N° 3218, Col. Citlaltli, C.P. 09600
Del. Iztapalapa, Tel. 56047000
df.gob.mx
salud.dif.gob.mx

Anexo 2. Carta de consentimiento informado

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Ciudad de México, a

Día	Mes	Año	

A quien corresponda.

Yo _____ declaro libre y voluntariamente que acepto participar en el estudio. ***“Estudio de la asociación entre los epipolimorfismos del gen del receptor de los productos de glicación avanzada y la presencia de complicaciones vasculares en la Diabetes Mellitus tipo 2”***, que se realiza en la ***Universidad Autónoma de la Ciudad de México en colaboración con esta institución*** y cuyos objetivos consisten en ***identificar las combinaciones de variaciones de origen genético y ambiental en el gen del receptor de los productos de glicación avanzada que predisponen a la aparición de complicaciones vasculares en la Diabetes Mellitus tipo 2***

Estoy consciente de que los procedimientos, pruebas y tratamientos para lograr los objetivos mencionados consistirán en ***realizarme un interrogatorio y un examen físico médico, acudir en ayunas de 8h mínimo al hospital para realizarme una punción en una vena superficial y tomarme una muestra de 5 ml de sangre. Estoy consciente que los riesgos para mi persona son mínimos durante la punción venosa. Sin embargo, podría ser necesario que me realicen punciones múltiples para localizar mis venas, pudiera acumularse sangre debajo de mi piel, la cual cambiará de coloración del morado al amarillo hasta desaparecer en unos 7 días, podría infectarse el sitio de la punción, o sangrar a través de él o sufrir mareo o desmayo al momento de la punción. En el caso de la muestra de orina que entregaré no estaré sometido(a) a riesgo alguno durante su recolección.***

Entiendo que del presente estudio se derivarán los siguientes beneficios:

- Conoceré si estoy en riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular.***
- Se conocerá si las proteínas de mi sangre están unidas a azúcares y si este fenómeno está relacionado con el estadio de mi enfermedad, la presencia de complicaciones vasculares, el nivel de control de mi azúcar, y/o mis hábitos y estilos de vida.***
- Se conocerá si los resultados del estudio sirven para pronosticar o diagnosticar tempranamente las complicaciones que sufren los pacientes diabéticos.***
- Se conocerá si uno de mis genes me predispone a sufrir complicaciones de la diabetes tempranamente o de forma más severa.***

Es de mi conocimiento que seré libre de retirarme de la presente investigación en el momento que yo así lo desee. También que puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación en este estudio.

Así mismo, cualquier trastorno temporalmente relacionado con esta investigación podre consultarlo con ***[Responsable], que es [Cargo] del [Institución], [Dirección], Telef.: ext.....*** y con el investigador responsable (***Dra. Lilia Lopez Canovas, Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, San Lorenzo 290, Col. Del Valle, Del. Benito Juarez, CP 03100, Ciudad de México, Telef.: 1107 0280 ext. 15314.*** El Jefe de Enseñanza e Investigación comunicará el evento a la ***Dirección de Educación e Investigación de la SSDF***, en donde se decidirá la necesidad de convocar al investigador principal y al Cuerpo colegiado competente, para su resolución.

En caso de que decidiera retirarme, la atención que como paciente recibo en esta institución no se verá afectada.

Nombre.		Firma.
(En caso necesario, datos del padre, tutor o representante legal)		
Domicilio.	Teléfono	
Nombre y firma del testigo.		Firma.
Domicilio.	Teléfono	
Nombre y firma del testigo.		Firma.
Domicilio.	Teléfono	
Nombre y firma del Investigador responsable.		Firma.
Domicilio.	Teléfono	

c. c. p. Paciente o familiar

c. c. p. Investigador (conservar en el expediente de la investigación).

*En Amarillo se resaltan los campos que fueron modificados de acuerdo con el sitio o evento en el que se realizó el muestreo.

Anexo 3. Cuestionario

Fecha: _____

N° de control _____

1. Datos personales:

1.1 Nombre: _____

1.2 Edad: _____

1.3 Sexo: _____

1.4 Ocupación:

___ ama de casa ___ estudiante ___ profesionalista ___ obrero ___ ventas
___ comerciante ___ empleado ___ burócrata ___ ninguna

1.5 Nivel de estudios:

___ Primaria ___ Secundaria ___ Media superior ___ Superior ___ Posgrado

1.6 Lugar de residencia en el último año:

___ Zona urbana ___ Zona periurbana ___ Zona rural

1.7 Lugar de nacimiento:

___ Zona urbana ___ Zona periurbana ___ Zona rural

1.8 Origen étnico:

___ indígena ___ mestizo ___ euro-descendiente
___ afro-descendiente ___ asiático ___ otro

2. Antecedentes Familiares:

2.1 Sus padres, abuelos o familiares de segundo y tercer grado tienen o han tenido algunas de las siguientes enfermedades?

Enfermedad	Padres			Hijos			Hermanos			Abuelos			Tíos y primos			Tíos y primos lejanos		
	Si	No	No se	Si	No	No se	Si	No	No sé	Si	No	No sé	Si	No	No sé	Si	No	No se
1 Diabetes tipo 1																		
2 Diabetes tipo 2																		
3 Diabetes gestacional																		
4 Sobrepeso u obesidad																		
5 Hipertensión arterial																		
6 Hipercolesterolemia (altos niveles de colesterol en sangre)																		
7 Hipertiglicidemia (altos niveles de triglicéidos en sangre)																		
8 Ovarios poliquísticos (madre/abuela/tías/primas)																		
9 Bebés de más de 4 kg																		
10 Enfermedad cardiovascular (cardiopatía isquémica, insuficiencia vascular cerebral, o insuficiencia arterial de miembros inferiores)																		
11 Enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Demencias o Deterioro Cognitivo)																		

2.2 De las enfermedades antes mencionadas presentas alguna de ellas?.

Si_____

No_____

No sé_____

2.3 ¿Cuál? _____

2.2 Tiempo que transcurrió desde que fue diagnosticado

_____años _____ meses

2.4 Tratamiento de su enfermedad_____

2.5 De las siguientes complicaciones, ¿Padece alguna de ellas? _____

Complicaciones vasculares	¿Ha padecido?	¿Hace cuánto fue diagnosticado?
Nefropatía (Daño renal)		
Pérdida de vista		
Pie diabético (ulceraciones/ mutilaciones)		
Neuropatía (Pérdida de sensibilidad)		
Isquemias (Infartos)		
EVC (Embolias)		

3. Estilo de vida:

3.1 Consumo de alimentos

3.1.1 ¿Cuántas veces come al día?_____

3.1.2 ¿Cuáles?

Desayuno_____

Almuerzo_____

Comida_____

Cena_____

Entre comidas_____

3.1.3 Que alimentos consume, con cual frecuencia y cuanta cantidad?

Alimento	Veces por semana	Veces por mes	Tamaño de a porción	
Cereales y tubérculos				
Carne roja				
Carne blanca				
Pescado				
Embutidos				
Quesos				
Lácteos				
Leguminosas				
Verduras				
Frutas				
Grasas				
Azúcares				
Comida rápida				

3.1.4 ¿Qué tipo de grasa usa o usan en su casa comúnmente para cocinar los alimentos?

Aceite vegetal_____

Margarina_____

Manteca vegetal_____

Manteca de cerdo_____

Mantequilla_____

Ninguna_____

No sabe/ No está seguro/a_____

3.1.5 Las verduras las come fritas, envueltas en huevo o con crema o con mantequilla?

Siempre o casi siempre_____

Algunas veces_____

Nunca o casi nunca_____

3.1.6 Cuando come frijoles, ¿los come refritos?

Siempre o casi siempre_____

Algunas veces_____

Nunca o casi nunca_____

3.1.7 Las carnes las come fritas?

Siempre o casi siempre_____

Algunas veces_____

Nunca o casi nunca_____

3.1.8 Se come el pellejo o la grasa de las carnes?

Siempre o casi siempre_____

Algunas veces_____

Nunca o casi nunca_____

3.1.9 Toma leche entera de vaca?

Siempre o casi siempre_____

Algunas veces_____

Nunca o casi nunca_____

3.1.10 Cómo suele comer su comida?

Con poca sal_____

Normal_____

Con bastante sal_____

3.1.11 ¿Está siguiendo en este momento una dieta especial por alguna razón de salud?

Sí, por más de 6 meses_____

Sí, por menos de 6 meses_____

No_____

3.1.12 En qué consiste la dieta? _____

3.1.13 ¿Qué cantidad de agua consumes al día? (agua natural, independiente de la que tomas con los alimentos).

Menos de medio litro_____

de medio litro a 1 litro_____

de 1 a 2 litros_____

de 2 a 3 litros_____

más de 3 litros_____

3.2 Actividad física

3.2.1 Cuantos días a la semana dedica a actividades o esfuerzos físicos?

Días en la semana_____

No_____

No sabe/No está seguro_____

3.2.2 En cada uno de esos días, cuanto tiempo en total dedica a actividades o esfuerzos físicos?

_____horas_____minutos diarios

_____horas_____minutos en la semana

3.2.3 Cuantos días camina al menos 10 min seguidos o más como parte de su trabajo, sin incluir el traslado a su trabajo?

Días en la semana_____

No_____

No sabe/No está seguro_____

3.2.4 Cuantos días a la semana viaja en un vehículo de motor?

Días en la semana _____

No _____

No sabe/No está seguro _____

3.2.5 En cada uno de esos días, ¿aproximadamente cuánto tiempo en total viajó en un vehículo de motor?

_____ horas _____ minutos diarios

_____ horas _____ minutos en la semana

3.2.6 Cuantos días a la semana viaja en bicicleta?

Días en la semana _____

No _____

No sabe/No está seguro _____

3.2.7 En cada uno de esos días, ¿aproximadamente cuánto tiempo en total viajó en bicicleta?

_____ horas _____ minutos diarios

_____ horas _____ minutos en la semana

3.2.12 ¿Aproximadamente cuánto tiempo pasa sentado por día laborable?

_____ horas _____ minutos diarios

_____ horas _____ minutos en la semana

3.2.13 ¿Aproximadamente cuánto tiempo pasa sentado en un día de fin de semana?

_____ horas _____ minutos diarios

_____ horas _____ minutos en la semana

3.2.15 Realiza algún deporte o ejercicio físico en su tiempo libre?

Si _____

Cuál? _____

No _____

Algunas veces _____

3.2.16 ¿Cuántas veces por semana hace deporte o ejercicio físico en su tiempo libre?

1 a 3 veces por semana_____

3 a 5 veces por semana_____

5 a 7 veces por semana_____

3.2.17 ¿Por cuánto tiempo lo hace cada día?

10 a 30 minutos_____

30 a 50 minutos_____

50 a 70 minutos_____

más de 90 minutos_____

3.2.18 ¿Cuándo comenzó a hacerlo?

Desde hace menos de 4 semanas_____

Entre 1 a 6 meses_____

Desde hace más de 6 meses_____

No sabe/No está seguro/a_____

3.3 Consumo de Alcohol

3.3.1 ¿Consume o consumió alguna vez bebidas alcohólicas? (una bebida equivale a una lata o botella de cerveza, a un vaso de vino, a un coctel o a un trago de licor).

Si_____

No_____

Ocasionalmente_____

3.3.2Cuál es la frecuencia semanal con que toma o tomaba al menos una bebida alcohólica?

1-3 días_____

3-5 días_____

5-7 días_____

3.3.3 Cuando usted toma o tomaba, ¿cuántas bebidas toma o tomaba en promedio? _____

1-3_____

4-6_____

7-9_____

más de 9_____

3.3.4 ¿Qué tipo de bebida suele o solía tomar?

Suave (cerveza, vino, etc)_____

Fuerte (tequila, ron, whisky, etc.)_____

Preparadas_____

Combina suaves y fuertes_____

3.3.5 Cuanto tiempo hace que dejó de consumir bebidas alcohólicas?

_____días

_____meses

_____años

3.4 Consumo de Tabaco

3.4.1 ¿Ud. fuma o ha fumado cigarrillos o tabaco alguna vez?

Si_____

No_____

Ocasionalmente_____

3.4.2 ¿Con qué frecuencia fuma en la actualidad?

Diariamente_____

Algunos días_____

No fuma_____

3.4.3 Cuando dejo de fumar por última vez?

_____días

_____meses

_____años

3.4.4 ¿Cuándo fuma, cuántos cigarrillos o tabaco consume?

1-5_____

6-10_____

11-15_____

16-20_____

más de 20_____

3.4.5 En su vida, ¿ha fumado por lo menos 100 cigarrillos o tabaco?

Sí_____

No_____

No sabe/No está seguro/a_____

3.4.6 ¿Qué edad tenía cuando comenzó a fumar por primera vez en su vida?

_____años

3.4.7 ¿Cuánto tiempo después de haberse despertado fuma el primer cigarrillo o tabaco?

Después de 60 minutos_____

De 31 a 60 minutos_____

De 6 a 30 minutos_____

En los primeros 5 minutos_____

3.4.8 ¿Alguna vez ha fumado a diario?

Sí_____

No_____

No sabe/No está seguro/a_____

3.4.9 Aproximadamente, ¿hace cuánto tiempo empezó a fumar a diario?

_____días

_____meses

_____años

3.4.10 ¿Hace cuánto tiempo dejó de fumar a diario? (años/meses)

_____días

_____meses

_____años

3.4.11 Conviene con alguna persona que consuma cigarros o tabaco a diario?

Si_____

No_____

Examen Físico y Complementarios.

Fecha_____

-Medidas Antropométricas y Báscula de Impedancia (3 réplicas):

Peso (kg): _____

Talla (m): _____

IMC (índice de masa corporal): _____

Circunferencia de la cintura (cm): _____

Circunferencia de la cadera (cm): _____

ICC (índice cintura/cadera): _____

-Tensión Arterial (3 repeticiones)

Fecha_____

Sistólica: _____

Diastólica: _____

-Química Sanguínea:

Fecha_____

Glucosa: _____

Colesterol total: _____

Triglicéridos: _____

HDL-C: _____

LDL-C: _____

HbA1C: _____

Proteína C reactiva ultrasensible _____

Insulina _____

Estimación de la resistencia a la insulina _____

-Orina

Fecha_____

Albuminuria _____

Microalbuminuria: _____

Anexo 4. Productos derivados de este trabajo

- Campaña de detección precoz de diabetes, hipertensión y obesidad (UACM Del Valle, 2018).
- Artículo de divulgación «Proyectos en desarrollo de los investigadores del PCG, Caracterización genética de moléculas involucradas en las complicaciones vasculares de la *Diabetes mellitus*» (Genómicas hoy, 2018).
- XXXII Congreso Nacional de Bioquímica (SMB, Noviembre 2018, Ixtapa-Zihuatanejo).