



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS "DR.
IGNACIO CHÁVEZ"**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

**“EFECTO DE LA METFORMINA EN LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS
PROINFLAMATORIAS EN CÉLULAS MONONUCLEARES CIRCULANTES DE
PACIENTES CON PREDIABETES”**

PRESENTA:

**BENJAMÍN BORJA ROSAS
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

DIRECCIÓN DE TESIS:

D.C. ANEL GÓMEZ GARCÍA

D.C. CARLOS CORTÉS PENAGOS

MORELIA, MICHOACÁN, FEBRERO 2024

Comité tutorial:

D.C. Carlos Cortés Penagos

UMSNH

Correo electrónico: neocccs@yahoo.com

D.C. Anel Gómez García

IMSS

Correo electrónico: anel.gomez@imss.gob.mx

D.C. Bertha Fenton Navarro

UMSNH

Correo electrónico: bertha.fenton@umich.mx

D.C. Sergio Gutiérrez Castellanos

UMSNH

Correo electrónico: sergio.gutierrez@umich.mx

D.C. Martha Eva Viveros Sandoval

UMSNH

Correo electrónico: marthaevaviveros@yahoo.mx

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, que ha estado en todo momento presente en mis metas, y que con su apoyo me ha permitido avanzar hasta este momento tan importante para mí. Madre y padre, esto no sería posible sin su apoyo. Mis hermanas, que me han dado diferentes perspectivas de todo, especialmente a mi hermana menor, con quien hemos tenido horas continuas de pláticas que me han dado luz en los momentos de oscuridad. A mis amigos que, a pesar de no tener la más mínima idea de lo que hago, siempre me han dado palabras cálidas y su apoyo incondicional. Y a mis profesores, quienes con su arduo trabajo han logrado transmitir su conocimiento, tanto a mis compañeros, como mí. Gracias por todo, ya que, sin ayuda de cada uno de los elementos mencionados anteriormente, no hubiese tenido el temple para completar esta gran travesía.

CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	3
CAPÍTULO I	5
INTRODUCCIÓN	5
1.1. PREDIABETES	5
1.2. CRITERIO DIAGNÓSTICO.....	5
1.3. CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN PREDIABETES	5
1.4. MANEJO CLÍNICO DE LA PREDIABETES.....	6
1.5. DIABETES MELLITUS TIPO 2	7
CAPITULO II	8
SISTEMA INMUNE DURANTE EL DESARROLLO DE RESISTENCIA A INSULINA	8
2.1. INMUNIDAD INNATA	8
2.2. CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN INMUNIDAD INNATA.....	12
2.3. INMUNIDAD ADAPTATIVA	19
CAPÍTULO III	25
METFORMINA E INFLAMACIÓN.....	25
3.1. MEDICAMENTOS ANTIDIABÉTICOS.....	25
3.2. EFECTO DE LA METFORMINA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS.....	26
JUSTIFICACIÓN.....	28
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	30
4.1. OBJETIVO GENERAL	30
4.1.1. HIPÓTESIS.....	30
4.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
5.1. TIPO DE ESTUDIO.....	31

5.2.	DISEÑO EXPERIMENTAL	31
5.3.	POBLACIÓN Y MUESTRA	31
5.3.1.	TAMAÑO DE MUESTRA	32
5.4.	CRITERIOS DE SELECCIÓN	32
5.4.1.	CRITERIOS DE INCLUSIÓN	32
5.4.2.	CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN	33
5.4.3.	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	33
5.5.	VARIABLES DE ESTUDIO	33
5.5.1.	VARIABLES INDEPENDIENTES	33
5.5.2.	VARIABLES DE DEPENDIENTES	33
5.6.	DESCRIPCIÓN OPERATIVA DEL ESTUDIO	36
5.7.	DETERMINACIÓN DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS POR PCR SEMICUANTITAVA	37
5.7.1.	OBTENCIÓN DE MUESTRA PARA RT-PCR	37
5.7.2.	EXTRACCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA	38
5.7.3.	VIABILIDAD Y CUENTA DE LEUCOCITOS	38
5.7.4.	EXTRACCIÓN DE RNA	38
5.7.5.	CUANTIFICACIÓN Y PUREZA DE RNA	39
5.7.6.	SÍNTESIS DE cDNA	40
5.7.7.	PCR EN TIEMPO REAL	40
5.8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	42
	RESULTADOS	43
6.1.	ESTANDARIZACIÓN DE PCR EN TIEMPO REAL	43
6.1.1.	ESTANDARIZACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS	43
6.1.2.	GEN CONTROL, qPCR y GENES DE INTERÉS	44
6.1.3.	MÉTODO DEL $\Delta\Delta CT$	46
6.2.	RESULTADOS DE LA PCR SEMICUANTITATIVA	46
6.2.1.	EXPRESIÓN RELATIVA DE GENES DE CITOCINAS	47
	DISCUSIÓN.....	50
	CONCLUSIONES.....	54
	ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES	55
7.1.	ASPECTOS DE BIOSEGURIDAD	56
	BIBLIOGRAFÍA	57
	ANEXOS.....	65
	En caso de colección de muestra sanguínea:	67

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Polarización de macrófagos</i>	10
<i>Figura 2. Metabolismo de macrófagos M1 y M2</i>	11
<i>Figura 3. Retroalimentación de citocinas proinflamatorias en el tejido adiposo</i>	11
<i>Figura 4. Señalización intracelular de TNF-α</i>	13
<i>Figura 5. Resistencia a la insulina mediada por TNF-α</i>	14
<i>Figura 6. Impacto de las caspasas en la maduración de IL-1β</i>	15
<i>Figura 7. Señalización de la IL-1β y sus efectos sobre la IR</i>	16
<i>Figura 8. Resistencia a la insulina mediada por IL-6 en adipocitos</i>	18
<i>Figura 9. Diferenciación de linfocitos CD4⁺</i>	21
<i>Figura 10. Transducción de señales mediada por IL-17</i>	23
<i>Figura 11. Efecto de la metformina en la inflamación.</i>	27
<i>Figura 12. Electroforesis de oligonucleótidos.</i>	44
<i>Figura 13. Diluciones seriadas B2M</i>	45
<i>Figura 14. Análisis de expresión de genes de citocinas proinflamatorias</i>	46
<i>Figura 15. Comparativa entre la expresión relativa de genes de interés entre los controles y los pacientes PD.</i>	48
<i>Figura 16. Expresión relativa pre y post tratamiento con metformina</i>	49

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Descripción operativa de variables</i>	33
<i>Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados</i>	40
<i>Tabla 3. Condiciones de la PCR en tiempo real</i>	41
<i>Tabla 4. Cuantificación de oligonucleótidos</i>	43
<i>Tabla 5. Características clínicas de individuos</i>	47

ABREVIACIONES

ABREVIACIONES	SIGNIFICADO
ADA	Asociación Americana de la Diabetes
ADAM	Proteína que contiene el dominio desintegrina y metaloproteasa
AMP	Adenosín monofosfato
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
AP-1	Proteína activadora 1
APC	Células presentadoras de antígenos
ATM	Macrófagos residentes del tejido adiposo
ATP	Adenosín trifosfato
BCR	Receptor de célula B
B2M	Beta 2-microglobulina
C/EBPB	Proteína de unión al potenciador CCAAT
CD	Cluster de diferenciación
DAMP	Patrones moleculares asociados a daño
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
GLUT4	Transportador de glucosa tipo 4
IDF	Federación Internacional de Diabetes
IL	Interleucina
IL1-R	Receptor de interleucina 1
IRS	Sustrato ligado al receptor de insulina
JAK	Cinasas Janus
JNK	Cinasa c-Jun N-terminal
LPS	Lipopolisacárido
M1	Macrófago activado clásicamente
M2	Macrófago activado de manera alternativa
MAPK	Proteína cinasas activada por mitógeno
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad

mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NFKB	Factor Nuclear Kappa B
NK	Células asesinas naturales
OCT	Transportadores de cationes orgánicos
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción
TCR	Receptor de célula T
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TLR	Receptores tipo Toll
TNF-a	Factor de Necrosis Tumoral alfa

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La prediabetes es una enfermedad metabólica que se caracteriza por la presencia de resistencia a la insulina y estados hiperglucémicos, además de un estado inflamatorio de bajo grado crónico, cuyo número de individuos afectados ha ido creciendo de manera exacerbada a lo largo del mundo en los últimos años, en especial en países como México. Dentro de los principales factores de riesgo para el desarrollo de la prediabetes se encuentran la edad, el sedentarismo, malos hábitos alimenticios y el sobrepeso u obesidad. La resistencia a la insulina tan particular de esta patología, está relacionada con la presencia de biomarcadores proinflamatorios, que causan cambios metabólicos celulares, como la polarización de los macrófagos y de linfocitos Th a sus formas secretoras de citocinas proinflamatorias, como TNF- α , IL-1b, IL-6 e IL-17, las cuales además de mermar la capacidad de captación de los receptores de insulina por cambios moleculares, inducen la apoptosis de las células β secretoras de insulina del páncreas. El uso de la metformina, un antidiabético, está poco extendido para la prediabetes, sin embargo, es la terapia farmacéutica avalado por la ADA para el tratamiento de esta patología. Se sabe que tiene efectos benéficos sobre el perfil inflamatorio en pacientes bajo tratamiento.

OBJETIVO: Determinar el efecto de la metformina sobre la expresión molecular de citocinas proinflamatorias en sangre periférica de pacientes con diagnóstico de prediabetes.

MATERIALES Y MÉTODOS: Estudio cuasi-experimental, en pacientes con prediabetes de ambos géneros, mayores de 18 años de la Unidad de Medicina Familiar N° 80 del IMSS en Morelia, Michoacán. No se admitirán sujetos con diagnóstico confirmado de diabetes o algún padecimiento asociado a condiciones inflamatorias. Se realizará extracción de 8 mL sangre periférica para análisis de molecular por RT-PCR de citocinas TNF- α , IL-1b, IL-6 e IL-17, así como de las concentraciones séricas de estas mismas citocinas por citometría de flujo. El médico tratante del paciente le prescribirá metformina, y se realizará una toma de sangre periférica antes del inicio del tratamiento por parte del paciente y después de 3 meses de tratamiento se tomará otra muestra. Se tomará como significancia estadística cuando se obtenga una $p < 0.05$.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES: Se encontró una mayor expresión génica de la IL-4 en individuos clínicamente sanos, con respecto al grupo con prediabetes, por otro lado, en el caso de las citocinas proinflamatoria, es decir, TNF- α , IL-1b, IL-6 e IL-17, así como en la citocina

antiinflamatoria IL-10, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, no obstante, se logra distinguir una tendencia al alza en el perfil proinflamatorio en pacientes con prediabetes. Por otro lado, los pacientes post tratamiento, si bien, no tuvieron diferencias significativas, nuevamente se logra vislumbrar una tendencia, en este caso de disminución del perfil proinflamatorio e incremento en la expresión relativa del perfil antiinflamatorio, lo que parece indicar que un tratamiento de mayor duración con metformina podría mejorar dicho perfil con una tendencia más marcada.

PALABRAS CLAVE: Prediabetes, inflamación, expresión molecular, citocinas.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Prediabetes is a metabolic disease that is characterized by the presence of insulin resistance and hyperglycemic states, in addition to a chronic low-grade inflammatory state, whose number of affected individuals has been growing exacerbated throughout the world in recent years, especially in countries like Mexico. Among the main risk factors for the development of prediabetes are age, a sedentary lifestyle, bad eating habits, and overweight or obesity. The insulin resistance so particular to this pathology is related to the presence of proinflammatory biomarkers, which cause cellular metabolic changes, such as the polarization of macrophages and Th lymphocytes to their forms that secrete proinflammatory cytokines, such as TNF- α , IL-1b, IL-6 and IL-17, which in addition to reducing the uptake capacity of insulin receptors through molecular changes, induce apoptosis of the insulin-secreting β cells of the pancreas. The use of metformin, an antidiabetic, is not widespread for prediabetes, however, it is the pharmaceutical therapy endorsed by the ADA for the treatment of this pathology. It is known to have beneficial effects on the inflammatory profile in patients under treatment.

OBJECTIVE: Determine the effect of metformin on the molecular expression of proinflammatory cytokines in peripheral blood of patients diagnosed with prediabetes.

MATERIALS AND METHODS: Quasi-experimental study, in patients with prediabetes of both genders, over 18 years of age from the Family Medicine Unit No. 80 of the IMSS in Morelia, Michoacán. Subjects with a confirmed diagnosis of diabetes or any condition associated with inflammatory conditions will not be admitted. 8 mL peripheral blood will be extracted for molecular analysis by RT-PCR of cytokines TNF- α , IL-1b, IL-6 and IL-17, as well as serum concentrations of these same cytokines by flow cytometry. The patient's treating physician will prescribe metformin, and a peripheral blood sample will be taken before the patient begins treatment and another sample will be taken after 3 months of treatment. Statistical significance will be taken when $p < 0.05$ is obtained.

RESULTS AND CONCLUSIONS: A greater gene expression of IL-4 was found in clinically healthy individuals, compared to the group with prediabetes, on the other hand, in the case of proinflammatory cytokines, that is, TNF- α , IL-1b, IL-6 and IL-17, as well as in the anti-inflammatory cytokine IL-10, no statistically significant differences were found, however, an increasing trend in the pro-inflammatory profile in patients with prediabetes can be distinguished.

On the other hand, although post-treatment patients did not have significant differences, once again a trend can be seen, in this case of a decrease in the pro-inflammatory profile and an increase in the relative expression of the anti-inflammatory profile, which seems to indicate that a treatment of Longer duration of metformin could improve this profile with a more marked trend.

KEYWORDS: Prediabetes, inflammation, molecular expression, cytokines.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. PREDIABETES

La prediabetes es una condición intermedia entre concentraciones normales de glucosa en sangre y el estado de hiperglucemia presente en la diabetes mellitus (DM), por lo que comparten la fisiopatología central, así como los mismos factores de riesgo, como el hecho de llevar una vida sedentaria, malos hábitos alimenticios y obesidad, en especial en aquellos individuos con un exceso de adiposidad en cintura [1].

1.2. CRITERIO DIAGNÓSTICO

Los criterios para el diagnóstico de esta condición según la ADA es la presencia de niveles de glucosa alterada en ayuno (IFG) con valores que oscilan entre 100-125 mg/dL (5.5-6.9 mmol/L), así como, intolerancia a la glucosa (IGT), que se caracteriza por concentraciones en sangre de glucosa de entre 140 a 199 mg/dL (7.8-11.0 mmol/L) después de la prueba de tolerancia a la glucosa (GTT), y con un valor de hemoglobina glucosilada (A1C) en el rango de entre 5.7 a 6.4% (39-47 mmol/mol) [2]. La IDF reportó en el 2011 una prevalencia mundial de 280 millones de personas que presentaron esta condición, y se proyecta que para el 2030 se alcance la cifra de 380 millones de individuos afectados [3].

1.3. CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN PREDIABETES

Cerca de un 70% de los casos diagnosticados con prediabetes culminan en el desarrollo de DM2. Cabe destacar que la prediabetes se presenta acompañada de un incremento en la masa corporal, así como en la resistencia a la insulina [4]. En el contexto de la inflamación, las condiciones de

hiperglucemia crónica que se presenta en la prediabetes, conduce a estrés oxidativo, lo que ocasiona la transactivación molecular de citocinas proinflamatorias, como TNF- α e IL-6, las cuales están relacionadas con la aparición de resistencia a la insulina, infiltración de leucocitos a tejido adiposo y polarización de estos a sus formas proinflamatorias [5]. Además, se ha encontrado que en individuos con prediabetes la IL-1 β se encuentra incrementada y está relacionada con un deterioro de la función de las células β del páncreas, así como en la aparición de resistencia a la insulina [6]. Por otro lado, cabe destacar el papel de la IL-17, secretada por diferentes células del sistema inmunitario, de entre las cuales los linfocitos Th17 tienen un papel preponderante en la resistencia a la insulina, así como en la inflamación crónica de bajo grado presente en la obesidad y las patologías asociadas a esta [7]. Lo anterior resulta importante porque Sangrós, F. et al. [8] concluyó que la obesidad abdominal es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la prediabetes.

1.4. MANEJO CLÍNICO DE LA PREDIABETES

El tratamiento establecido por la ADA para los individuos que padecen prediabetes es un esquema de ejercicio de intensidad moderada-alta de 150 minutos a la semana, cuyo objetivo es reducir la adiposidad abdominal y aumentar la sensibilidad a la insulina, además, de un plan de alimentación bajo en calorías, cuya meta es la pérdida de peso. Sin embargo, es importante remarcar que es difícil mantener la pérdida de peso únicamente por el cambio de hábitos, como el ejercicio y la dieta hipocalórica, a largo plazo, por lo cual los individuos que se encuentren en tratamiento deben tener acceso a otras opciones terapéuticas coadyuvantes, como la opción farmacológica [9].

En el aspecto farmacológico, en la actualidad la Guía de Práctica Clínica del Tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2 en adultos en el Primer Nivel de Atención, solo hay un medicamento recomendado para mejorar el pronóstico del paciente con prediabetes, la metformina, esto dado su bajo costo, su seguridad y su alta efectividad en la generación de sensibilidad a la insulina, lo que conlleva a la regulación de los estados hiperglucémicos [10]. Por otro lado, la ADA recomienda el uso de metformina en pacientes con prediabetes, en especial en aquellos menores a 60 años y con un IMC mayor de 35 kg/m² [9].

1.5. DIABETES MELLITUS TIPO 2

La diabetes mellitus y sus complicaciones son una amenaza global. La Federación Internacional de Diabetes (IDF) estimó que 1 de cada 11 adultos de edades de entre 20-79 años tenía diabetes en el 2015 (equivalente a 415 millones de personas) y se estima que para el 2040 se alcance la cifra de 642 millones de personas afectadas, en especial en aquellos países con economía en transición. La diabetes mellitus se clasifica etiológicamente en dos tipos principales, la diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2, siendo ésta última la de mayor incidencia, constituyendo aproximadamente el 90% del total diagnosticado [11]. La DM es un problema de salud que se encuentra en todo el mundo cuyo crecimiento está intrínsecamente relacionado con la creciente prevalencia global de obesidad y hábitos insalubres que incluyen dietas pobres e inactividad física [12].

En México los datos arrojados por la Encuesta Nacional de Salud 2000 (ENSA 2000), así como de las Encuestas Nacionales de Salud y Nutrición 2006 y 2012 (ENSANUT 2006 y 2012), muestran que la prevalencia de la diabetes mellitus se incrementó de 5.8% en la Ensa 2000, a 7.0% en la Ensanut 2006 y a 9.2% en la ENSANUT 2012 [13–15].

La DM2 se caracteriza por trastornos multifactoriales que se relacionan con el metabolismo de ácidos grasos, glúcidos y proteínas, aunado a un incremento en la resistencia a la insulina lo que conduce a hiperglicemia y que tiene como consecuencia daño en diferentes tejidos y órganos a corto y largo plazo [16]. Los tratamientos orales actuales para la DM2 son las sulfonilureas, biguanidas, inhibidores de la α -glucosidasa y las glinidas, los cuales se pueden utilizar juntos o combinados para conseguir resultados sinérgicos [17]. De los medicamentos antes mencionados, la metformina (una biguanida) se utiliza como primera opción en el tratamiento de la DM2 y se recomienda su uso desde que dicha patología se diagnostica, esto debido a su efectividad y seguridad, además de tener un bajo costo y el poder reducir el riesgo de eventos cardiovasculares que conducen a la muerte. A comparación de otros medicamentos, como las sulfonilureas, la metformina tiene efectos beneficiosos en la concentración hemoglobina glucosilada (A1C), el peso y la mortalidad vascular [18].

CAPITULO II

SISTEMA INMUNE DURANTE EL DESARROLLO DE RESISTENCIA A INSULINA

2.1. INMUNIDAD INNATA

La obesidad es el factor preponderante que conduce al desarrollo de resistencia a la insulina, ya que somete al organismo a estrés metabólico. La relación entre la prediabetes, con respecto a la obesidad está condicionada por la presencia de resistencia a la insulina típica de esta y la activación del sistema inmune innato [19].

El sistema inmune innato está mediado primordialmente por neutrófilos, basófilos, eosinófilos, NK, células dendríticas y macrófagos, teniendo estos últimos un papel preponderante en la inflamación de bajo grado presente en la relación obesidad/prediabetes. Las células de este sistema no pueden reconocer patrones específicos, si no que reconocen patrones generales asociados a patógenos. Además, las APC que pertenecen a este sistema, promueven la activación del sistema inmunitario adaptativo o específico. La respuesta inmunitaria innata puede ser mediada por los TLRs, así como por factores secretados, tales como citocinas/quimiocinas, péptidos antimicrobianos, entre otras moléculas menos categorizadas [20]. La activación del sistema inmune innato en el desarrollo de DM2 está intrínsecamente relacionado con el accionar de los TLRs, los cuales están implicados en la inflamación y complicaciones vasculares. Los TLRs interactúan con los PAMPs, que comprenden glúcidos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, que inducen una respuesta inmunitaria, así como con los DAMPs, que abarcan los productos finales de glicación y las proteínas del grupo de alta movilidad 1 (HMGB1), entre otros ligandos endógenos [21,22].

El tejido adiposo funge como el sitio de inflamación en el sobrepeso, es por ello que cuando existe un incremento de adiposidad se observa transactivación de genes que codifican moléculas proinflamatorias secretadas por los macrófagos del tejido adiposo, pre-adipocitos y adipocitos maduros, como TNF-a, que interviene en la resistencia a insulina [23].

2.1.1. Macrófagos

Los macrófagos son células mononucleadas fagocíticas, derivadas del saco vitelino, hígado fetal o de las células troncales hematopoyéticas en médula ósea, según el estadio de vida, que desempeñan un papel importante como la primera línea de defensa ante patógenos, así como, en el mantenimiento de la homeostasis de los diversos tejidos del organismo [24]. Mientras se encuentran circulando por el torrente sanguíneo, se les denomina monocitos, que posteriormente pasan a madurar a macrófagos tisulares, como en el caso de los ATMs, presentando un fenotipo especializado según el tejido en el que se encuentre. El tejido adiposo cumple diversas funciones en el mantenimiento homeostático corporal, fungiendo como un órgano endocrino que participa en la secreción de diversas hormonas, como la leptina, adiponectina, factores de crecimiento y mediadores pro y antiinflamatorios, como la IL-6, que en conjunto se denominan adipocinas, y que están implicadas en la regulación metabólica e inflamatoria, esto mediante la interacción cruzada entre adipocitos y macrófagos [25].

Cuando existe un exceso de nutrientes, como en el caso de la obesidad, se promueve un estado de inflamación crónica de bajo grado llamado metainflamación, la cual difiere de la inflamación aguda causada por agentes patológicos, que somete a las células a estrés metabólico y que se asocia a un estado adaptativo de inflamación denominado parainflamación, el cual está intrínsecamente relacionado con el reclutamiento de macrófagos al tejido adiposo y en su posterior polarización [26] fenotípica a su forma M1 o a su forma M2 . La nomenclatura M1 y M2 se adoptó en el año 2000 y se basa en las moléculas que inducen una vía de transducción de señales en los macrófagos, siendo el IFN- γ , lipopolisacárido (LPS), entre otros, en el caso de la vía clásica, mientras que la activación alternativa es dirigida por las citocinas IL-3 e IL-4 secretadas por los linfocitos Th2. En el tejido sano existe una homeostasis entre macrófagos M1 y M2 que se ve alterada en los procesos de inflamación, donde los macrófagos activados por la vía clásica liberan una cantidad elevada de citocinas proinflamatorias, como el TNF- α , la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), IL-1b e IL-6, por mencionar algunas [27] (**Figura 1**).

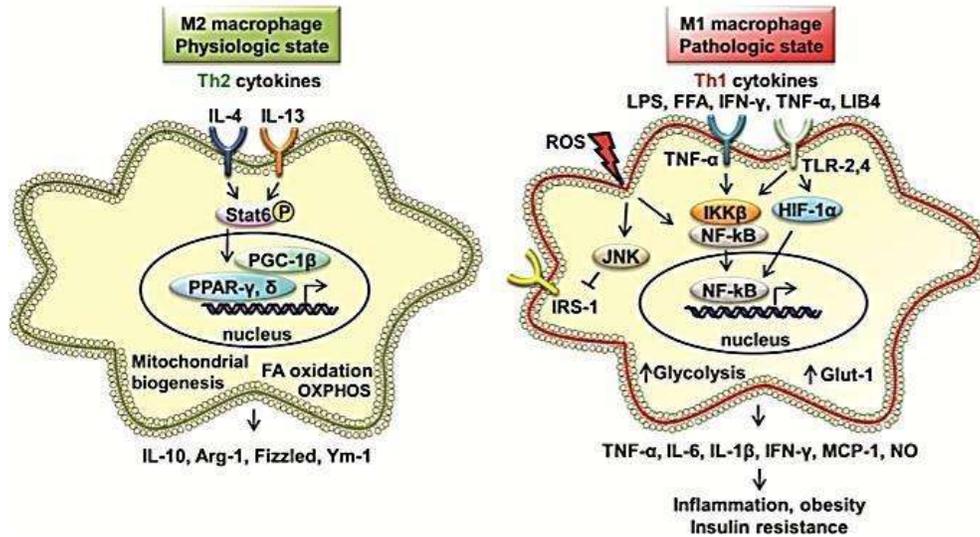


Figura 1. Polarización de macrófagos. Impacto de los ligandos en la señalización intracelular de los ATMs en la transactivación de genes de citoquinas antiinflamatorias en el caso del macrófago M2 y de citoquinas proinflamatorias en los M1 que condicionan el reclutamiento de más leucocitos al tejido adiposo y afectan el metabolismo del nicho celular local. (Tomado de Appari, M. et al. [28]).

Tanto los macrófagos M1, como los M2 utilizan la glucosa primordialmente para la obtención de energía, sin embargo, en el caso de los M2 se complementa la producción energética con la fosforilación oxidativa. Por otro lado, en los M1 se ve incrementada la demanda de glucosa y disminuida la fosforilación oxidativa, lo que conduce a una alta tasa de glicólisis acompañada de un decremento en el consumo de oxígeno, aún en presencia de suficiente de este último, por lo que se promueve la producción de lactato. Además, los macrófagos M1 muestran un ciclo del ácido tricarboxílico incompleto, con lo que existe una acumulación de itaconato, citrato, y succinato, el cual conduce a la producción de IL-1b por acción del factor de hipoxia inducible 1 alfa (HIF-1α). Para poder completar la demanda de ATP, los macrófagos utilizan la vía de las pentosas fosfato (PPP), con lo que se observa un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (**Figura 2**) [29].

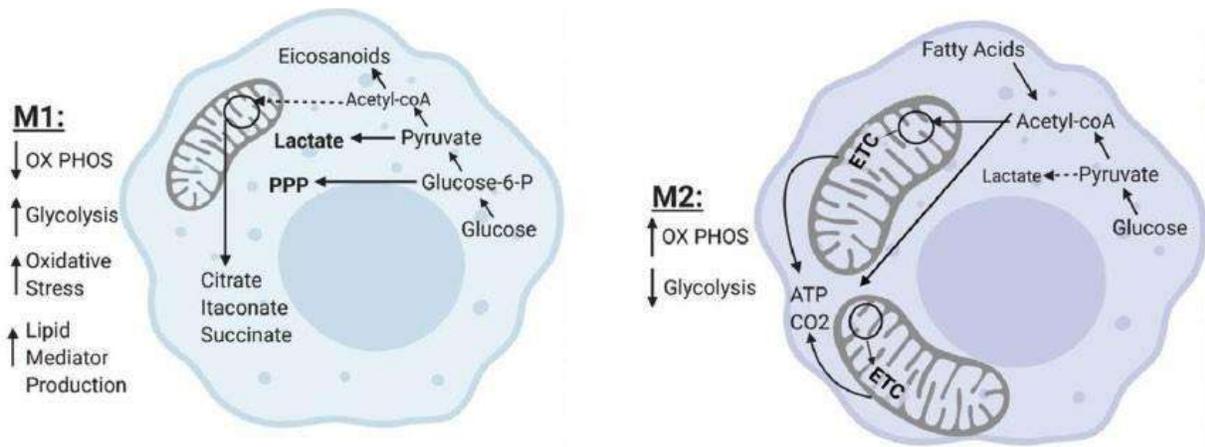


Figura 2. Metabolismo de macrófagos M1 y M2. Las diferencias metabólicas explican el hecho de que los macrófagos M1 estén implicados en la actividad inflamatoria. En el caso de las ROS, están asociadas a la resistencia a la insulina en el tejido adiposo, mientras que los eicosanoides son intermediarios lipídicos proinflamatorios. Por otro lado, los macrófagos M2 utilizan los lípidos como fuente energética. (Tomado y modificado de Caslin, H. et al [30]).

En última instancia se crea una retroalimentación en la producción de citocinas proinflamatorias que afectan no solo a los macrófagos, si no a otras células tanto del sistema inmunitario innato, como del adaptativo, que a su vez secretan citocinas de manera exacerbada, creando un bucle en el reclutamiento de leucocitos y posterior inflamación mediada por leucocitos (**Figura 3**) [31].

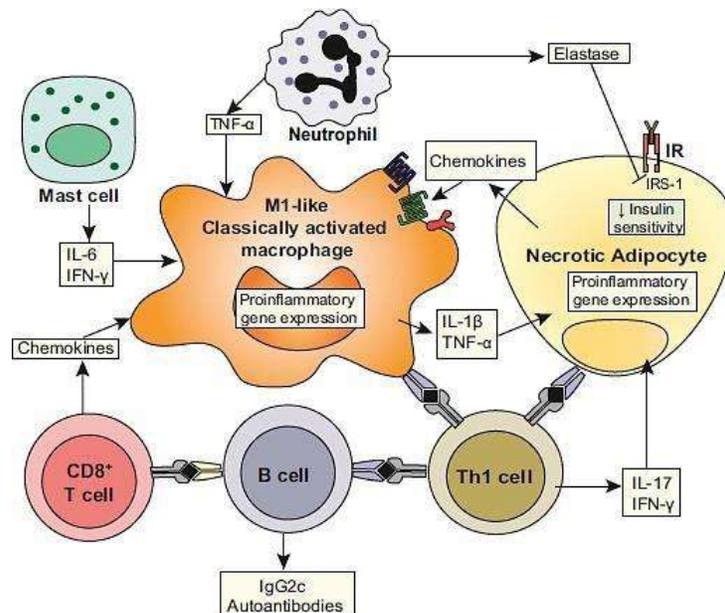


Figura 3. Retroalimentación de citocinas proinflamatorias en el tejido adiposo. Bucle proinflamatorio creado por citocinas mediado por los ATMs. (Tomado y adaptado de McNelis, J. & Olefsky, J.[31]).

2.2. CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN INMUNIDAD INNATA

Las citocinas son proteínas solubles mediadoras de la respuesta inmunitaria, que comprenden a las interleucinas, quimiocinas, interferones y los factores de necrosis tumoral, que son secretadas por diferentes leucocitos (neutrófilos, macrófagos, linfocitos B y T, entre otros) para llevar a cabo la comunicación intercelular, que, al momento de unirse a su receptor, inician una señalización intracelular. Tienen actividad pleiotrópica en diferentes tejidos y pueden ser secretadas por la vía autocrina, endocrina o paracrina. Estas moléculas, están implicadas en los mecanismos proinflamatorios y antiinflamatorios, por lo que la interacción entre ellas pueden tener un efecto sinérgico o antagónico, según sea el caso [32]. Dentro de las citocinas con actividad proinflamatoria involucradas en la patogénesis de la resistencia a la insulina y la inflamación crónica de bajo grado, se destacan el TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-17 [33].

2.2.1. *TNF- α*

TNF- α es una proteína presente en la membrana plasmática de los macrófagos activados de 26 kDa, la cual es escindida por acción de la metaloproteasa TACE (enzima de conversión del TNF- α), lo que la vuelve soluble en forma trimérica de 17 kDa y con propiedades endócrinas potentes. El TNF- α tanto soluble, como de membrana tienen dos isoformas de receptores denominados TNFR1, el cual contiene una sección intracelular denominada sitio de muerte (TRADD) al que se pueden unir 3 diferentes complejos, los cuales inducen diferentes respuestas, como la inflamatoria, necroptosis y apoptosis (debido al dominio de muerte) esto gracias al reclutamiento de la serina/treonina proteína-cinasa1 que interactúa con el receptor (RIPK1) y de los factores asociados al TNFR 2 (TRAF) que desencadenarán la vía clásica de NF κ B, esto gracias a que la cinasa 1 activada por el factor de crecimiento transformante beta (TAK1) fosforila a las cinasa I κ B 1 y 2 (IKK1/2) y este último interactúa con el inhibidor de κ B (I κ B), liberando y

permitiendo la translocación al núcleo de NFκB [34], mientras que TNFR2 está asociado a la inflamación mediante TRAF1/2 y la subsecuente activación y translocación del factor de transcripción NFκB por la vía clásica y la vía alternativa, la cual está mediada por TRAF3 y la cinasa inductora de NFκB (NIK), que se encarga de fosforilar a IKK1 [35], además de la vía de MAPK y Akt (proteína cinasa B), que está asociada a la supervivencia y proliferación celular [36].

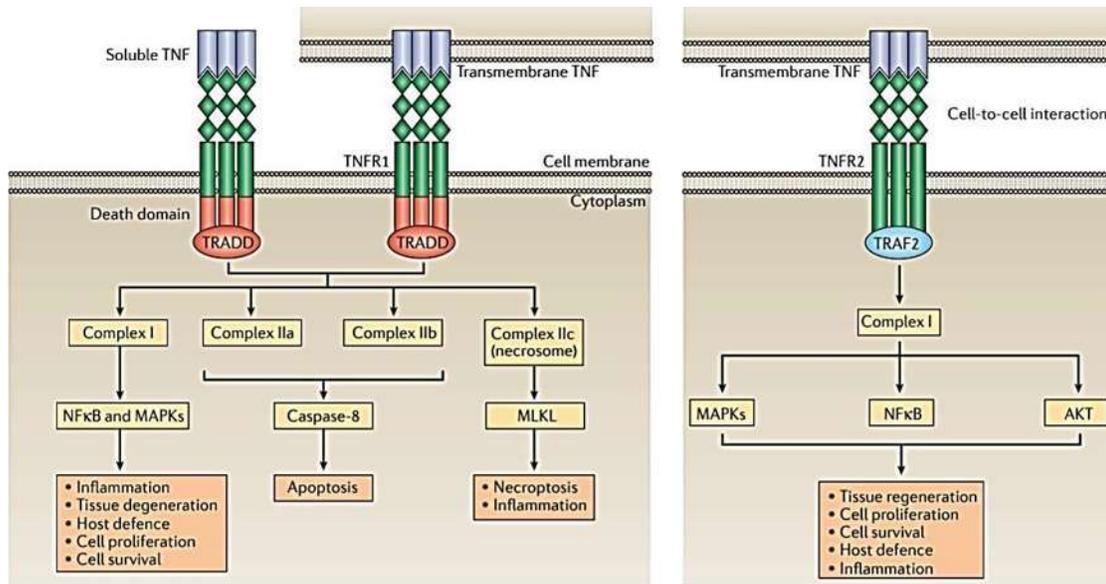


Figura 4. Señalización intracelular de TNF- α . El TNFR1 puede interactuar tanto con el TNF acoplado a la membrana, como con el soluble, siendo el complejo I el encargado de activar a la vía NFκB y MAPK, lo cual a última instancia se traduce a inflamación. En el caso del TNFR2 se da por la interacción célula-célula, mediada por el factor 2 asociado al receptor de TNF (TRAF2), que activa la vía de MAPK, NFκB y AKT, involucrados en la inflamación y supervivencia celular. (Tomado de Kalliolas, G. & Ivashkiv, L. [37]).

Además de su papel en la inflamación, TNF- α está asociado a la resistencia a la insulina debido a la estimulación de las vías de señalización de JNK, la proteína cinasa C (PKC) y el inhibidor de la κ B cinasa (IKK), que actúan deteriorando la función de autofosforilación del IRS, el cual interviene en la vía de transducción de señales de la insulina (**Figura 5**) [23].

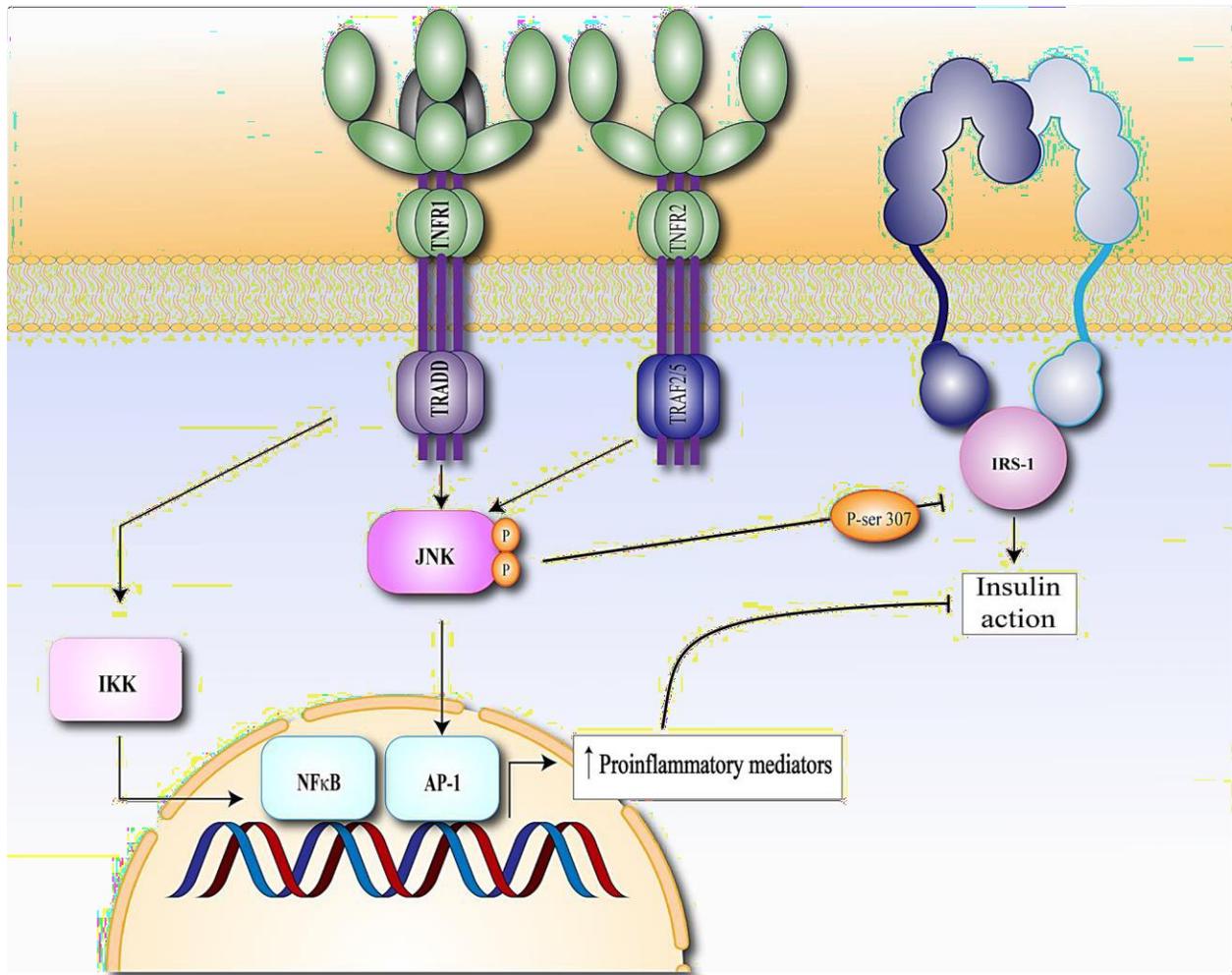


Figura 5. Resistencia a la insulina mediada por TNF- α . La activación de la señalización intracelular de TNF- α , afecta a la actividad de la insulina dado que activa la vía de NF κ B, ERK, S6K y JNK, que regulan de manera negativa la transducción de señales inducidas por dicha hormona peptídica. Además, JNK causa la irrupción de la cascada de fosforilaciones mediadas por IRS-1, lo anterior debido a que fosforila el residuo de serina 307, modificación postraduccional que en esta proteína está implicada en la inhibición de su actividad. (Tomada y Adaptada de Akash, M. et al. [38]; Tseng, W. et al. 2018 [39]).

2.2.2. *IL-1b*

La familia de las IL-1 es bastante extensa, dentro de la cual destaca la isoforma 1 β por su relevancia como potente mediador proinflamatorio. Es producida principalmente por células dendríticas, monocitos y macrófagos, [40] y en primera instancia se sintetiza como una proteína precursora de 31 kDa en forma de pro-IL1 β , que es escindida por proteólisis por la caspasa-1 en IL-1b con una masa de 17.5 kDa [41].

La regulación en la producción de IL-1b madura está íntimamente relacionado con la formación del inflamosoma, que está compuesto por un NOD (dominio de oligomerización de unión de nucleótidos), una proteína adaptadora y la caspasa-1. El inflamosoma NLRP3 es el mejor estudiado en macrófagos y su actividad es promovida por la unión de diferentes PAMPs a los TLRs, que promueve la movilización de NFκB al núcleo e induce la síntesis de pro-IL1β, o por los NLR, que censan los DAMPs, los cuales directamente conforman los inflamosomas, los cuales catalizan la proteólisis de pro-IL1β, debido a la caspasa-1 constituyente de este complejo macromolecular [42]. Además, el estrés en retículo endoplásmico contribuye al desarrollo de condiciones patológicas, como obesidad y diabetes, esto debido a que induce la respuesta mediada por la caspasa 8, la cual está relacionada con la maduración directa de IL-1b [43] (**Figura 6**).

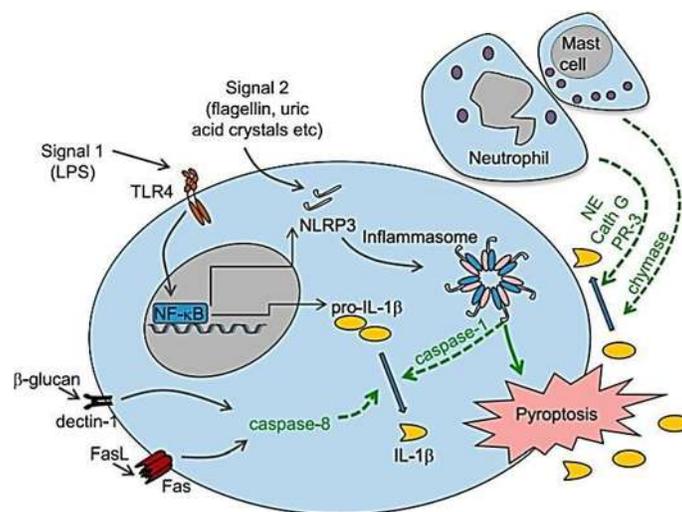


Figura 6. Impacto de las caspasas en la maduración de IL-1b. Para que la caspasa se active, es necesario la translocación de NFκB al núcleo y el censo de un DAMP por un NLR. Tras la formación del inflamosoma, la caspasa-1 puede catalizar la maduración de la IL-1b o activar la piroptosis que es una forma altamente inflamatoria de muerte celular programada que ocurre con mayor frecuencia tras la infección con patógenos intracelulares. Sin embargo, en algunos casos, la caspasa-8 puede interferir directamente en la maduración de la IL-1. Cabe destacar que dicha citocina puede liberarse en su forma madura o inmadura, en este último caso, las proteasas de los neutrófilos y mastocitos se encargan del procesamiento postraduccionnal (Tomado de Afonina, et al. [44]).

El IL1-R existe en dos isoformas principales, IL-1RI e IL-1RII, y contiene un dominio de homología de receptor Toll/IL-1 (TIR). Al unirse a su receptor, el cual requiere de la proteína accesoria del IL-R (IL-1RAcP), y de la proteína adaptadora de la respuesta primaria de

diferenciación mieloide 88 (MyD88), que consta de una proteína adaptadora TIR (TIRAP), que interacciona con el dominio TIR del receptor, y un dominio de muerte (DD), este último reclutando a las proteínas cinasas asociadas al IL1R 1/4 (IRAK1/4), que resulta en la activación río debajo de TRAF6 y posteriormente de TAK1, con lo que se produce la translocación al núcleo de NFκB y la fosforilación de la vía MAPK (p38, ERK y JNK) que concluye con la movilización del factor de transcripción AP-1, por lo que al compartir vías de señalización con TNF-α, ocurre un efecto sinérgico entre ambas citocinas en la producción de mediadores proinflamatorios [45,46]. Además, Jager, J. et al. [47] observó que la IL-1β, a pesar de tener una señalización similar al TNF-α, el mecanismo molecular por el cual interfiere con la señalización de la insulina (JNK en el caso del TNF) difiere a dicha citocina, teniendo mayor relevancia la activación sostenida de la vía p38, que conduce a una regulación a la baja de la expresión de GLUT4, y de ERK, que regula de manera negativa la transcripción del mRNA del IRS-1 (**Figura 7**).

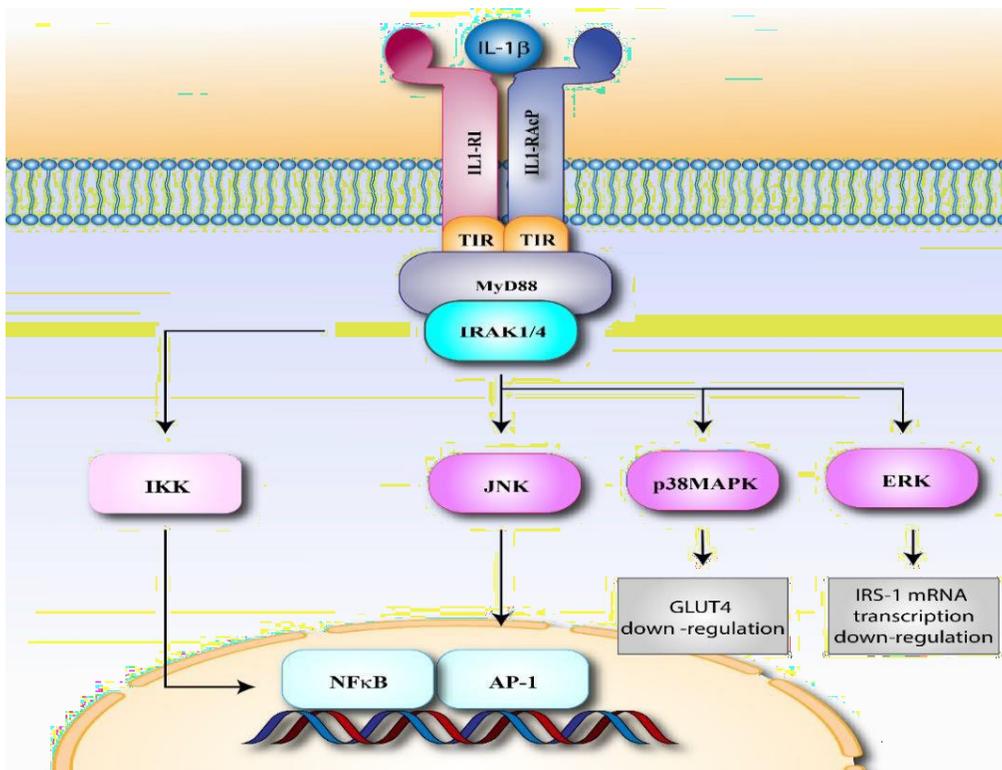


Figura 7. Señalización de la IL-1β y sus efectos sobre la IR.

En condiciones de hiperglicemia, como en el caso de la DM2 y prediabetes, los macrófagos comienzan a liberar IL-1b, que condiciona la expresión de esta citocina de igual manera en las células β en el páncreas, condición relacionada con la apoptosis de estas células secretoras de insulina, lo que se traduce a una baja expresión de esta hormona anabólica [40,48]. Además, O'Neill, C. et al. [6] encontró en un modelo murino que la combinación de IL-1b e IL-6, se presentaba antes que la hiperglucemia en el desarrollo de la prediabetes, indicando que concentraciones elevadas de ambas citocinas están asociadas al inicio de la resistencia a la insulina.

2.2.3. *IL-6*

La IL-6 es una citocina proinflamatoria de 186 aminoácidos, con una estructura de 4 hélices, secretada por monocitos, células T, fibroblastos y células endoteliales, la cual transduce su señalización al unirse al receptor IL-6R (también denominado CD126). IL-6R se expresa principalmente en las membranas (mIL-6R) de los hepatocitos, neutrófilos, monocitos y células T CD4+, sin embargo, existe una versión soluble (sIL-6R) por un proceso de ajuste alternativo o por proteólisis en la membrana mediada por las proteínas ADAM. IL-6R cuenta con tres dominios denominados D1, D2 y D3, constituyendo estos dos últimos un área de reconocimiento llamada dominio de unión de citocinas (CBD), que interacciona con la glicoproteína 130 (gp130), la cual se expresa en todas las células del organismo [49,50].

Las células que expresan el receptor mIL-6R (vía clásica) pueden transducir la señal de IL-6 sin necesidad de un paso previo, mediante la unión de ligando-receptor. En el caso de las células que carecen del receptor, son insensibles a la IL-6, sin embargo, por medio de la unión del sIL-6R con su sustrato, puede acoplarse a la membrana, en un proceso denominado señalización trans, lo que incrementa el espectro de acción de esta citocina [51].

Una vez formado el complejo IL-6, IL-6R y gp130, se induce la señalización de la vía de JAK/STAT, la cual desemboca en la activación de diferentes genes que tienen un motivo de unión de STAT. Además, se forma una retroalimentación negativa, ya que uno de los genes diana de STAT es el que codifica para la proteína SOCS3, que actúa como inhibidor del mismo STAT.

A su vez, JAK puede fosforilar a SHP-2, que está implícita en la activación de la vía MAPK y PI3K, involucradas en la supervivencia y proliferación celular [52,53].

Existe una relación entre la producción de IL-6 y diferentes procesos relacionados con la presencia de inflamación crónica de bajo grado, por ejemplo, se ha encontrado que esta citocina participa en la polarización de los macrófagos a su forma M1. Además, la vía trans de señalización en los adipocitos tiene un impacto negativo en el metabolismo de la insulina, provocando resistencia a esta, y propicia el reclutamiento de macrófagos al tejido adiposo. Por otro lado, la vía clásica en las células T es crítica en la protección ante la generación de resistencia a insulina en los estadios tempranos de la obesidad, sin embargo, en etapas más avanzadas, tiende a cambiar a la vía de señalización trans [54].

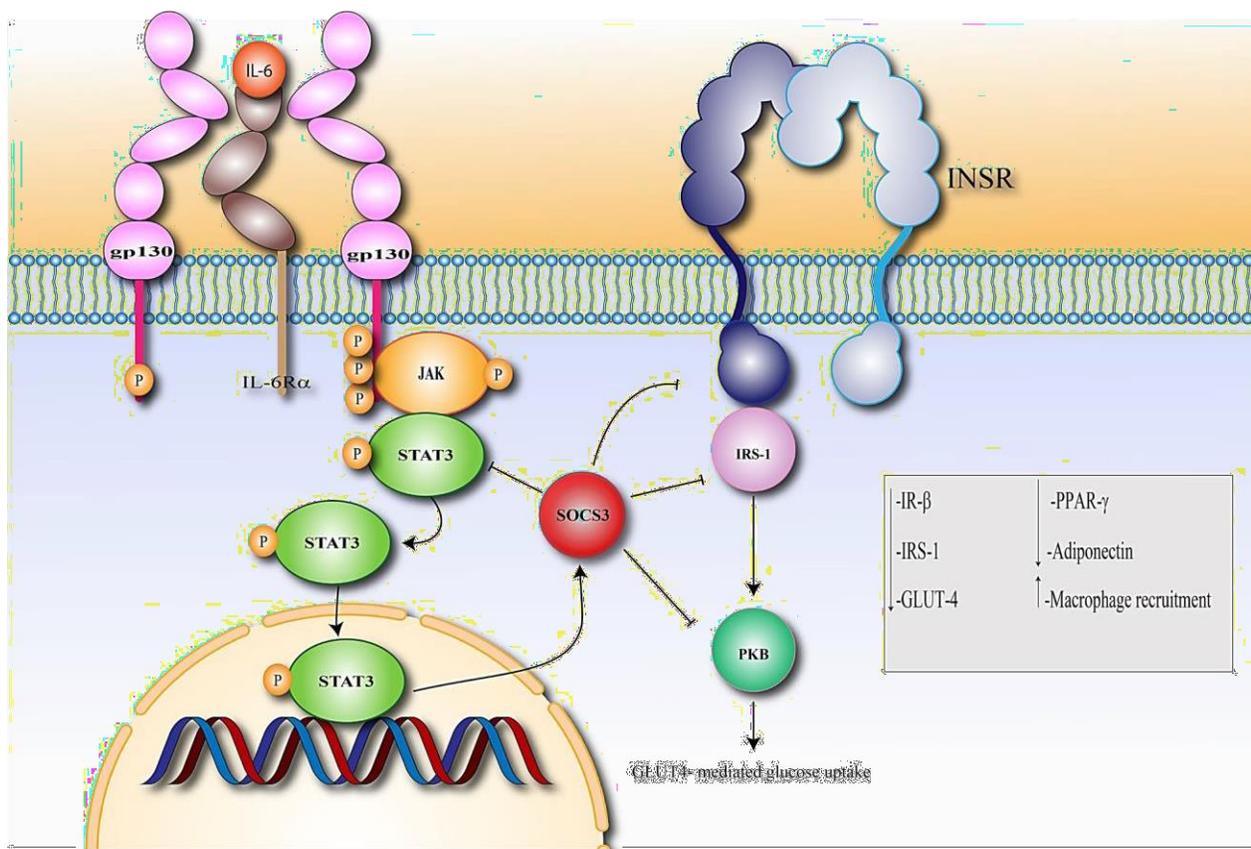


Figura 8. Resistencia a la insulina mediada por IL-6 en adipocitos. Los niveles elevados de IL-6 están asociados a una sobreexpresión de SOCS3 en los adipocitos por la vía de señalización trans. SOCS3 interfiere con la fosforilación de IRS-1, IRβ y PKB, lo que ocasiona un decremento en la expresión de los componentes de respuesta a la insulina (adiponectinas, IRS-1, IR-β, GLUT4 y PPAR-γ), lo que induce inflamación y reclutamiento de macrófagos en el tejido adiposo. (Tomado y modificado de Akbari, M. & Hassan-Zadeh, V.[55]).

2.3. INMUNIDAD ADAPTATIVA

La respuesta inmune adaptativa se diferencia de la innata por el hecho de tener especificidad y memoria inmunológica. La especificidad está concebida por el reconocimiento de antígenos específicos y no patrones generales moleculares, por lo que se considera que este tipo de respuesta es antígeno dependiente. Las células mediadoras en la respuesta inmune adaptativa, son los linfocitos B y T. Sin embargo, se requieren de las APC del sistema inmune innato para la presentación de péptidos exógenos por medio de las moléculas del MHCII a los TCR de los linfocitos T, que coordinan la respuesta inmunitaria por medio de la secreción de citocinas, por otro lado, la activación por moléculas del MHCI se da por la interacción de las células nucleadas del organismo con los TCR. En el caso de los linfocitos B, actúan sin necesidad de las APC, por medio de la expresión de BCR en su superficie y la forma soluble de estos, denominados anticuerpos. Bajo algunas circunstancias, los linfocitos B pueden actuar directamente como APC, presentando péptidos por medio de las moléculas del MHCII [56].

2.3.1. Desarrollo de linfocitos T

Los linfocitos T se originan en la médula ósea a partir de las células troncales hematopoyéticas. En primera instancia se producen células que carecen de los correceptores característicos CD4 y CD8, además de sus TCR, las cuales migran al timo para diferenciarse. En este órgano linfoide central se generan timocitos dobles positivos (DP) CD4⁺ y CD8⁺, para en última instancia dar lugar a timocitos simples positivos por selección positiva, que viajarán por la periferia como linfocitos vírgenes esperando a encontrarse con su antígeno. Característicamente estos linfocitos vírgenes presentan en su superficie los fenotipos CD45RA⁺CCR7⁺ [57].

La selección de los linfocitos simples positivos está determinada por estimulación con las moléculas del MHC. En el caso de los linfocitos que presentan CD4⁺, son expuestos en primera instancia a moléculas del MHCII, lo que propicia un apagado de genes codificantes para el correceptor CD8. Por otro lado, la expresión de CD8⁺ está relacionada con la estimulación por moléculas del MHCI, lo que induce la eliminación de CD4 de su superficie. El fenotipo de los correceptores en los linfocitos define su función efectora, en el caso de los CD4⁺ liberan

moléculas que cooperan para la eliminación de agentes patógenos, por lo que se denominan linfocitos T cooperadores, mientras que los CD8⁺ tienen una actividad citotóxica, de ahí que los linfocitos que presentan este fenotipo se les denomine citotóxicos [58].

a. Linfocitos CD4⁺

Los linfocitos CD4⁺ juegan un papel central en la coordinación de la respuesta inmune adaptativa, sin embargo, se sabe que están relacionados en la patogenia de diversas enfermedades que involucran estados inflamatorios [59]. Originalmente se clasificaron en dos grandes subgrupos por Mosmann y Coffman [60] quienes describieron dos tipos de linfocitos con patrones de secreción de citocinas diferentes, pero relacionados, ya que uno regulaba al otro y viceversa. Se denominaron linfocitos Th1 y Th2. Los Th1 tienen una actividad proinflamatoria por la secreción de IFN- γ , mientras que los Th2 secretan IL-4, cuya actividad está relacionado con funciones antiinflamatorias. Sin embargo, en la actualidad dicho paradigma Th1/Th2 ha caído en desuso, por la aparición de subconjuntos de linfocitos CD4⁺, cuya diferenciación está modulada por distintas moléculas del sistema inmune innato, como los Th9, Th22, Th25, Th foliculares (Tfh), T reguladores (Tregs) y Th17 [61] (**Figura 8**).

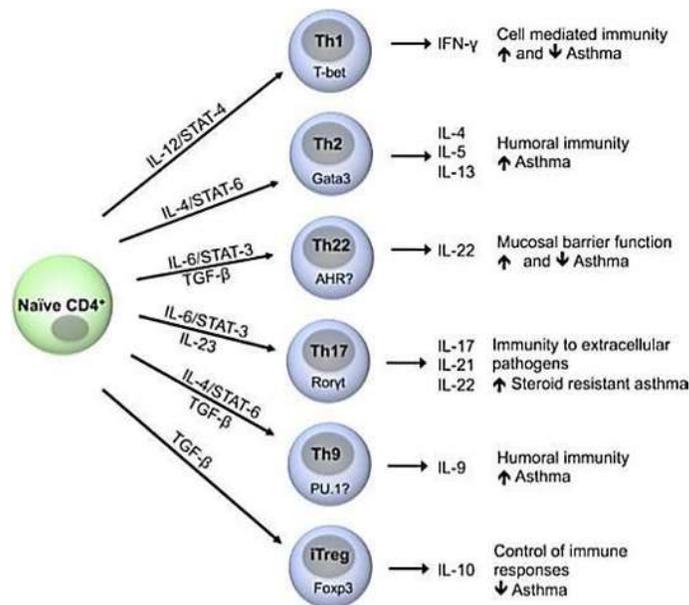


Figura 9. Diferenciación de linfocitos CD4⁺. Vías de transducción de señales activadas por citocinas que condicionan la diferenciación de los diferentes subgrupos de los linfocitos CD4 y el efecto de las moléculas secretadas por estos en la modulación de la respuesta inmunitaria. (Tomada de Tumes, D. et al.[62]).

2.3.1.1. Diferenciación de células Th17

Las células T productoras de IL-17 CD4⁺ (Th17) son una pieza fundamental en la defensa del organismo contra agentes patógenos, sin embargo, se ha encontrado que la diferenciación su función está relacionada con el desarrollo de enfermedades en las que se presentan estados inflamatorios. A diferencia del resto de células que componen al subconjunto CD4⁺ que son reguladas por las células Tregs, la relación entre estas y Th17 no se ha esclarecido, siendo importante remarcar que ambos fenotipos requieren del TGF-β para su desarrollo [63]. Una de las características principales de este tipo de células, además de la secreción de la IL-17 y sus isoformas, es la expresión de los factores de transcripción de la familia de receptores huérfanos relacionados (ROR) con el receptor de ácido retinoico (RAR), RORα y RORγt.

La diferenciación al fenotipo Th17 puede estar mediada por la IL-6 en conjunto con el TGF-β, que induce la vía de transducción de STAT3, cabe destacar que la IL-23 puede tomar el lugar de la IL-6 en algunos casos, lo que indica que la polarización a este tipo de linfocito está definida por el microambiente [64]. Cuando esto ocurre, el linfocito virgen sobre expresa los factores de

transcripción Foxp3 y ROR γ t, los cuales pueden interactuar entre ellos, no obstante, este es un estadio intermedio de diferenciación entre Treg (Foxp3⁺) y Th17 (ROR γ t⁺). La polarización completa hacia un fenotipo u otro, está conducido por la presencia en mayor proporción, ya sea de TGF- β (Tregs), o de citocinas proinflamatorias (Th17), como IL-6 o IL-1 β . Además, se ha encontrado una relación entre TNF- α y la ubiquitinación de Foxp3, lo que lo conduce a degradación en proteosoma, lo que causa la presencia predominante de ROR γ t [65]. Además del desarrollo mediado por la combinación de TGF- β e IL-6, se conoce que la conjugación de IL-1, IL-6 e IL-23 puede inducir la diferenciación de este fenotipo sin la necesidad del TGF- β presente en el ambiente.

Ambas combinaciones de citocinas parecen tener diferentes papeles en cuanto a la función destinada del Th17, teniendo como diana diferentes tipos de patógenos según la vía de inducción activada [66].

a. IL-17

La IL-17 es una familia de citocinas proinflamatorias con efecto pleiotrópico que comprende 6 isoformas, las cuales son la IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (también conocida como IL-25) e IL-17F, existiendo un 50% de homología entre IL-17A e IL-17F. La IL-17 tiene una función imperante en la defensa del individuo ante agentes patógenos, no obstante, está igualmente relacionada con enfermedades autoinmunes y estados inflamatorios crónicos. Todos los miembros de esta familia forman homodímeros, sin embargo, en el caso de IL-17A e IL-17F, pueden formar heterodímeros denominados IL-17A/F. Por otro lado, IL-17E es la citocina que tiene la menor homología, y es bien conocido su papel como regulador de la función del resto de isoformas, esto por competición a nivel de receptor [67]. Esta citocina a pesar de ser la característica de los linfocitos Th17, es producida a su vez por iNKT, el grupo 3 de células linfoide innatas y las células T $\gamma\delta$. Además, se ha encontrado que los mastocitos y neutrófilos pueden secretar esta citocina en condiciones de inflamación tisular [68].

Los receptores de IL-17 se caracterizan por un motivo intracelular denominado SEFIR (SEF/receptor de IL-17), el cual tiene cierta homología con el dominio TIR presente en los TLRs y en

los receptores de IL-1. Cuando el ligando se une al receptor IL-17R, que existe en forma de heterodímero constituido por IL-17RA e IL-17RC, se recluta la proteína Act1, la cual también contiene el dominio SEFIR, y esta tiene actividad de ubiquitina ligasa E3, lo que conduce a la movilización de TRAF6 y a la formación de un complejo macromolecular, lo que a última instancia desemboca en la translocación del NFκB, el cual regula genes de moléculas proinflamatorias. Además, TRAF6 también activa las vías de transducción de MAPK, AP-1 y la señalización mediada por C/EBPβ y los factores de transcripción δ (**Figura 9**)[69].

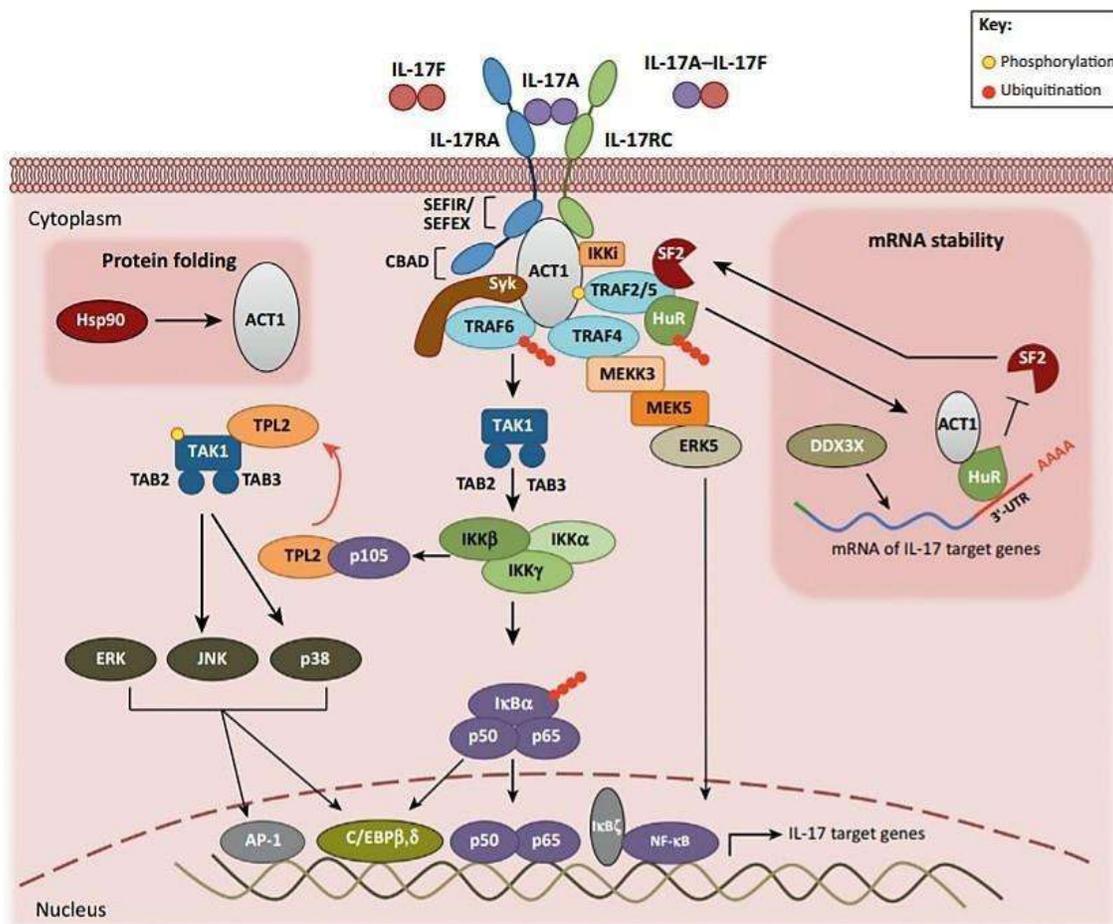


Figura 10. Transducción de señales mediada por IL-17. Al unirse el ligando, ya sea en forma de homodímeros o heterodímeros, al IL-17R se induce la formación de un complejo macromolecular que activa vías de señalización mediadas por las proteínas TRAF, cuyas dianas tienen distintas actividades. TRAF6 moviliza a TAK1 (cinasa activada por TGF-β), que interacciona con los moduladores de NFκB y permite la translocación de este al núcleo, además de tener impacto sobre la vía de MAPK, AP-1, C/EBPβ, δ. Por otro lado, TRAF4 activa la vía de MEKK3 la cual está relacionada con la síntesis de citocinas proinflamatorias. Mientras que el complejo TRAF2-5-Act1 interactúa con el mRNA de IL-17, proporcionándole estabilidad. (Tomada de Amatya, N. et al. [70]).

En el contexto de la obesidad y diabetes, se ha encontrado un incremento en la expresión tanto de la IL-17, como del fenotipo Th17 relacionados con el desarrollo de DM2, indicando que esta citocina participa en el mantenimiento de la inflamación crónica, esto debido a que su unión al receptor induce la síntesis de citocinas como TNF- α , IL-1 e IL-6, las cuales están asociadas a la resistencia a la insulina tan característica de la prediabetes y DM2. Además, las citocinas proinflamatorias tienen una estrecha relación con la síntesis de ácidos grasos hepáticos, promoviendo estados alterados metabólicos y contribuyendo al reclutamiento de células inflamatorias al tejido adiposo y al páncreas, en donde, estas moléculas causan apoptosis de las células β productoras de insulina [71].

CAPÍTULO III

METFORMINA E INFLAMACIÓN

3.1. MEDICAMENTOS ANTIDIABÉTICOS

Dentro de los medicamentos utilizados como antidiabéticos no insulínicos, según el método de administración, se pueden separar en dos grandes grupos, los medicamentos orales y los inyectables, donde en el primero de los casos, encontramos la siguiente clasificación: sulfonilureas, tiazolidinedionas, los inhibidores de la α -glucosidasa, las meglitinidas y las biguanidas, cada uno con un mecanismo de acción diferente.

En el caso de las sulfonilureas actúan estimulando la síntesis de insulina, interactuando con los canales de potasio, lo que ocasiona la despolarización de membrana y por siguiente se secreta insulina. Las tiazolidinedionas interaccionan con PPAR- γ , lo que produce un efecto de sensibilización a la insulina en todos los tejidos. Por otra parte, los inhibidores de la α -glucosidasa ocasionan un decremento en la absorción de glucosa en el intestino por competición inhibitoria de la α -glucosidasa, la cual participa en la digestión de glúcidos [72]. Mientras que las meglitinidas, son secretagogos de insulina, actuando de manera similar a las sulfonilureas, mediante la interacción con los canales de potasio en la subunidad SUR1. Por último, la metformina, el único miembro de las biguanidas en la actualidad, mejora la sensibilidad a la insulina, logrando efectos antihiperglucemiantes [73].

3.1.1. *Metformina*

La metformina (clorhidrato de 1,1-dimetilbiguanida) es el medicamento de primera elección para el tratamiento para DM2 de recién diagnóstico y es el único fármaco indicado para los individuos con prediabetes [10]. A pH fisiológico actúa como un catión, lo que le permite permeabilizarse a la célula gracias a los OCT, expresados en los hepatocitos (OCT1), en la membrana basolateral

del riñón (OCT2) y desde el lumen intestinal a las células epiteliales mediante OCT3 y por los transportadores de monoaminas [73].

La metformina controla los estados hiperglucémicos gracias a la activación de la vía AMPK en el hígado mediando la fosforilación de la subunidad α del complejo enzimático en el residuo T172, lo que suprime la gluconeogénesis, esto debido a que AMPK actúa como un sensor del estado energético dependiente de la relación AMP/ADP con respecto a la concentración de ATP. Cuando AMPK se activa, el metabolismo celular cambia de un estado anabólico, a un estado catabólico para la obtención de energía, lo que incrementa la oxidación de ácidos grasos y la captación de glucosa por la célula. Además, la metformina tiene un efecto inhibitorio sobre el complejo mitocondrial I, el cual participa en la reducción de la ubiquinona a ubiquinol, el cual se transporta a su vez al complejo III mitocondrial y participa en la creación de un gradiente de concentración de protones, que a última instancia conduce a la actividad de la ATP sintasa. Por último, la activación de AMPK conducida por la metformina, reprime la translocación de NF κ B al núcleo y evita la síntesis de moléculas proinflamatorias que derivan en resistencia a la insulina, por lo tanto se incrementa la sensibilidad a esta [74].

3.2. EFECTO DE LA METFORMINA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS

La metformina promueve la activación de la vía de AMPK, que conduce a un decremento en la fosforilación de IKK que interviene en la translocación de NF κ B, lo que se asocia a una disminución en la expresión de IL-1b, además, también interacciona con la vía JAK/STAT, la cual está implicada en la producción de IL-6, por lo que la administración de este fármaco podría disminuir la síntesis de estas citocinas proinflamatorias [75]. Asimismo, al igual que la IL-1b, la síntesis de TNF-a está regulada por el NF κ B, por lo que se promueve una regulación a la baja de la tasa de expresión génica de esta citocina, lo que conlleva que en monocitos/macrófagos, la metformina promueva la polarización a M2 [76]. Por otro lado, es importante recalcar que se ha encontrado un decremento de IL-17 con la administración de metformina [77].

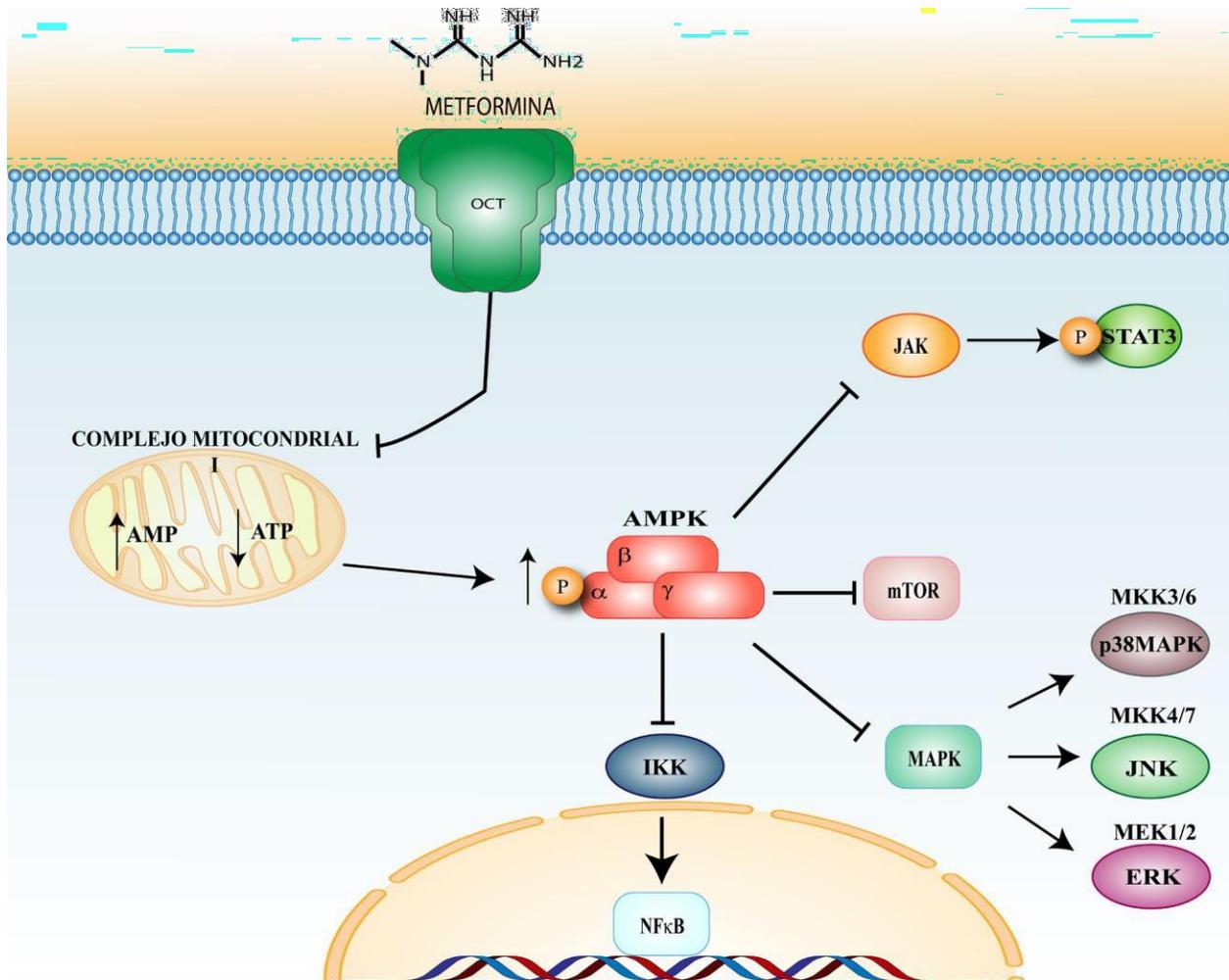


Figura 11. Efecto de la metformina en la inflamación. Al ingresar a la célula por gracias a la presencia de los OCTs, la metformina inhibe el complejo mitocondrial I, mermando la generación de ATP, lo que causa un incremento en la relación AMP/ATP, que conlleva a la activación de AMPK, resultando en la inhibición de las vías de señalización inducidas por TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-17. (Tomado y adaptado de Ye, J. et al. 2018 [75]; Bułdak, et al. 2016 [76]; Negrotto, L. et al. 2016 [77]; Cameron, A. et al. 2016 [78])

JUSTIFICACIÓN

En México existe una prevalencia de prediabetes del 44.2%, y representa el factor de riesgo de mayor importancia para el desarrollo de la DM2, incrementado la probabilidad de desarrollar esta hasta 20 veces [79]. La DM2 es la segunda causa de muerte y su costo de atención se estimó en el 2011 en 7.7 mil millones de dólares, por lo cual en 2016 fue declarada emergencia epidemiológica del país [80]. Aunado a lo anterior, la prediabetes supone un incremento en la mortalidad de los individuos afectados, ya que su presencia se asocia a complicaciones cardiovasculares, por lo que es importante tratar este estado patológico, esto debido a que la progresión de esta enfermedad representa una carga financiera a los sistemas de salud [81].

En el apartado farmacológico, aunque su uso no sea tan frecuente para el tratamiento de la prediabetes, la metformina ha demostrado reducir la probabilidad de desarrollar DM2 hasta en un 50% en personas jóvenes, además, es importante mencionar que la metformina es segura, de bajo costo y generalmente bien tolerada por diversas poblaciones [82], y es una terapia farmacológica recomendada por parte de la ADA [9], de esta manera, aunque se ha descrito el papel de la metformina sobre el metabolismo celular que desencadena una regulación a la baja de la expresión y secreción de citocinas proinflamatorias en la DM2, aún quedan muchas lagunas en la información sobre los beneficios directos de este fármaco con respecto a la prediabetes y el impacto sobre el perfil molecular y sistémicos de marcadores inflamatorios en poblaciones mexicanas.

El presente estudio proporcionará conocimiento respecto al papel de la metformina en el inmunometabolismo de la prediabetes, y como esto conlleva beneficios sobre el perfil inflamatorio crónico de bajo grado característico de dicha patología, lo cual deriva en un mejor pronóstico de las complicaciones y evolución que acarrea este mal metabólico de incidencia imperante en México.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Un 70% de personas que presentan prediabetes tendrán una evolución patológica a DM2, la cual supone una carga socioeconómica y sanitaria nacional imperante, es por ello que resulta importante evitar la evolución de prediabetes para aminorar el impacto de la DM2, asimismo, la prediabetes por si sola, representa un problema importante, tanto en materia de salud, como en el aspecto económico, ya que se relaciona con otras patologías, como enfermedades cardiovasculares. La prediabetes se trata de una condición metabólica infravalorada que conlleva a la larga daño a diferentes tejidos, con persistencia de estados hiperglicémicos que contribuyen a un cambio en la concentración sistémica de citocinas proinflamatorias. Además, un elevado porcentaje de pacientes con prediabetes, sufren otros trastornos metabólicos, como obesidad, en la cual se presenta un incremento de moléculas proinflamatorias en el tejido adiposo, lo que crea un bucle de reclutamiento de células del sistema inmunitario, y que modifican el metabolismo de las células adyacentes, siendo perjudicial para el individuo y derivando en condiciones tales, como la resistencia a la insulina y posteriormente a DM2.

Se ha reportado que uno de los medicamentos de mayor uso en el tratamiento de DM2, la metformina, es también es el fármaco de elección indicado por la ADA para el tratamiento de prediabetes. Este medicamento mejora el perfil proinflamatorio presente en esta patología inhibiendo diferentes vías de señalización asociadas a la síntesis de citocinas que contribuyen al mantenimiento de dicho perfil [76], y es que, en este sentido, además de los parámetros que se plantean comúnmente, como A1C e IFG [82], el perfil de citocinas es imperante, ya que el incremento en la concentración de estas está relacionado con el progreso de esta patología[83], por lo que surge la siguiente pregunta:

¿Cuál será el efecto de la metformina sobre la expresión molecular y concentraciones sistémicas de citocinas proinflamatorias en pacientes con prediabetes?

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la metformina sobre la expresión molecular de citocinas proinflamatorias en sangre periférica de pacientes con diagnóstico de prediabetes.

4.1.1. HIPÓTESIS

La administración de metformina en dosis preventivas en los pacientes recién diagnosticados con prediabetes disminuirá la expresión génica y secreción de las citocinas proinflamatorias TNF-a, IL-1b, IL-6 e IL-17.

4.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Medir la expresión molecular de las citocinas proinflamatorias TNF-a, IL-1b, IL-6 e IL-17 y de las citocinas antiinflamatorias IL-4 e IL-10 en células mononucleares de sangre periférica en pacientes con prediabetes.
- Realizar el análisis de citocinas pro y antiinflamatorias en los estados de pre y post tratamiento con metformina.

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. TIPO DE ESTUDIO

Estudio cuasi experimental.

5.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Estudio cuasi experimental para definir la asociación entre la administración de metformina con respecto a la expresión molecular y concentraciones sistémicas de citocinas proinflamatorias antes del tratamiento y posteriormente a los tres meses en pacientes con prediabetes. Dado que es un estudio cuasiexperimental, los sujetos participantes serán su propio control ya que se les colectará muestra antes del tratamiento con metformina y después de tres meses de tratamiento.

5.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

Población. Pacientes con prediabetes de la Unidad de Medicina Familiar (UMF) N° 80 del IMSS en Morelia, Michoacán.

5.3.1. TAMAÑO DE MUESTRA

Se calculó con la fórmula para tamaño de muestra en población finita [84]:

$$n = \frac{N * Z\alpha^2 * p * q}{d^2(N - 1) + Z\alpha^2 * p * q}$$
$$n = \frac{2120 * 1.64^2 * 0.5 * 0.5}{0.15^2(2120 - 1) + 1.64^2 * 0.5 * 0.5} = 29$$

Donde:

N= total de población de pacientes con prediabetes en el año 2019 en la UMF N°80= 2,120

Z α = Nivel de confianza del 95% =1.64.

p=Proporción estimada de pacientes que postratamiento con metformina reducirán la expresión molecular de citocinas inflamatorias=0.5.

q=1-p=0.5

d=15%.

5.4. CRITERIOS DE SELECCIÓN

5.4.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Mayor de 18 años.
- Hombre o mujer.
- Recién diagnóstico de prediabetes sin tratamiento iniciado.
- Que acepten participar en el estudio.

5.4.2. CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN

Prescripción médica de otro hipoglucemiante diferente a metformina.

Diagnóstico de prediabetes con tratamiento iniciado, determinado con medición de glucosa en sangre en ayuno con valores de 100-125 mg/dL, CTOG 75 gr 2 h de 140-199 mg/dL y/o A1C 5.7-6.4%.

Patologías existentes asociadas a condiciones inflamatorias como artritis reumatoide, hipertensión arterial, con diagnóstico confirmado de DM2 o con algún proceso infeccioso dentro de las cuatro semanas previas.

5.4.3. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Pacientes que por algún motivo no puedan continuar con el estudio.

5.5. VARIABLES DE ESTUDIO

5.5.1. VARIABLES INDEPENDIENTES

Administración de Metformina (dosis ordinaria 850 mg/ día) durante 1 mes según las recomendaciones de la ADA [85].

5.5.2. VARIABLES DE DEPENDIENTES.

- Expresión molecular de citocinas TNF-a, IL-1b, IL-6 e IL-17.
- Glucosa, Perfil de lípidos.

Tabla 1. Descripción operativa de variables.

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Unidad de medida
-----------------	------------------------------	-------------------------------	-------------------------	-------------------------

Peso	Es un indicador global de masa corporal. Se trata de la fuerza gravitacional que se ejerce sobre una masa.	Cifra obtenida con una báscula clínica.	Cuantitativa continua.	Kg.
Talla	Se trata de la longitud de un individuo, la cual es medida desde la planta del pie hasta el vértice de la cabeza.	Cifra obtenida con báscula clínica.	Cuantitativa continua.	Metros.
IMC	Método que permite una clasificación a partir de la cantidad de materia con respecto a la talla. Proporciona una clasificación sencilla del estado de obesidad del individuo.	Se obtiene al dividir el peso entre la talla al cuadrado.	Cuantitativa continua.	Kg/m ² .
Glucosa	Se trata de un glúcido obtenido de la alimentación del individuo y metabolizado para obtener energía. Participa tanto en vías catabólicas, como anabólicas para la construcción de macromoléculas.	Cifra obtenida por estudios de laboratorio clínico.	Cuantitativa continua.	mg/dL.
Colesterol total	Se trata de un precursor en la producción de esteroides, hormonas sexuales, ácidos biliares y membranas celulares, aunque también está muy íntimamente relacionado con el desarrollo de patologías.	Cifra obtenida por estudios de laboratorio clínico.	Cuantitativa continua.	mg/dL.

Colesterol HDL	Las lipoproteínas de alta densidad se encargan de transportar el colesterol desde los tejidos periféricos hasta el hígado.	Cifra obtenida por estudios de laboratorio clínico.	Cuantitativa continua.	mg/dL.
Colesterol LDL	Lipoproteínas provenientes del metabolismo de VLDL por acción de lipasas extracelulares.	Cifra obtenida por estudios de laboratorio clínico.	Cuantitativa continua.	mg/dL.
Triglicéridos	Tipo de lípido encontrado en sangre, se producen en el hígado mediante glicerol y otros ácidos grasos usados como unidades estructurales. Se trata de una fuente de energía almacenable que se depositan en el tejido adiposo.	Cifra obtenida por estudios de laboratorio clínico.	Cuantitativa continua.	mg/dL.
Factor de necrosis tumoral alfa (TNF-a)	Proteína mediadora de la respuesta inmune, promueve la inflamación y la activación endotelial. Es producida por macrófagos, células NK y células T.	Cifra obtenida por citometría de flujo y PCR en tiempo real.	Cuantitativa continua. Valores Ct para PCR.	Valores Ct para PCR.
Interleucina 1 beta (IL-1b)	Molécula participante en la fiebre, activación de células T y macrófagos. Producida principalmente por macrófagos y células endoteliales.	Cifra obtenida por citometría de flujo y por PCR en tiempo real.	Cuantitativa continua.	Valores Ct para PCR.

Interleucina 6 (IL-6)	Proteína monomérica que promueve el crecimiento y proliferación de células T y B, y en fiebre. Producida por linfocitos B, T y células endoteliales.	Cifra obtenida por citometría de flujo y por PCR en tiempo real.	Cuantitativa continua.	Valores Ct para PCR.
Interleucina 17A (IL-17A)	Interleucina que participa en la defensa del huésped contra patógenos. Induce la producción de citocinas y es producida principalmente por linfocitos Th17, sin embargo, también las células CD8, NK, neutrófilos e ILCs.	Cifra obtenida por citometría de flujo y por PCR en tiempo real.	Cuantitativa continua.	Valores Ct para PCR.

5.6. DESCRIPCIÓN OPERATIVA DEL ESTUDIO

Los doctores adscritos a la UMF. 75, seleccionarán a los pacientes con prediabetes de acuerdo con los criterios estimados por la ADA. Se les informará en que consiste la investigación y se solicitará su participación. A cada paciente que acepte y reúna los criterios de selección se dará a firmar un consentimiento informado por escrito (Anexo 1), una vez firmado se realizará una historia clínica (Anexo 2) con la finalidad de obtener datos de identificación, antecedentes patológicos personales, los criterios de actividad física y algún medicamento que esté ingiriendo sin prescripción médica (anti-inflamatorio, más común aspirina o paracetamol). En el consultorio se le realizará una evaluación antropométrica que consiste en:

- **Peso corporal (kg):** Se determinará con ropa ligera, sin zapatos ni calcetines, utilizando una báscula con estadímetro.
- **Talla (m):** Con estadímetro calibrado, en posición erecta, con talones juntos y los pies separados en ángulo de 60°, la cabeza en plano horizontal de Francfort (línea imaginaria que une el borde superior del conducto auditivo con la órbita), brazos libres a los costados, y las palmas

apuntando hacia las caderas.

- Circunferencia de Cintura (cm): En el punto medio entre el margen inferior de la última costilla palpable y el borde superior de la cresta iliaca, con cinta métrica que aporte 100g de tensión constante, al finalizar una espiración normal, con la pared abdominal relajada y previo ayuno.
- Índice de Masa Corporal (kg/m^2): Calculado con la ecuación de Quetelet.
- Tensión Arterial (mmHg): Se determinará en brazo izquierdo descubierto, apoyado a la altura del corazón, estando sentado con la espalda recta y pies apoyados contra el suelo luego de reposo mínimo de 5 min, con un baumanómetro de mercurio calibrado, sin haber consumido bebidas cafeinadas al menos 1 hr previa a la toma de la tensión arterial.

Posteriormente se le dará cita al laboratorio clínico de la UMF N° 75 para la colecta de sangre venosa. La muestra sanguínea será obtenida por punción en vena periférica en condiciones de ayuno en el Laboratorio Clínico de la UMF N° 75 bajo el siguiente protocolo: Asepsia de la región con torundas alcoholadas, aplicación de torniquete (cinta de látex) en el tercio distal del brazo seleccionado, punción con aguja 0.8 x 38 mm en la vena mediana preferentemente y obtención de 8 mL de sangre por presión negativa en tubos Vacutainer respetando la jerarquía de llenado; uno de tapón rojo sin anticoagulante (5 mL cada uno) y uno de tapón lila con EDTA como anticoagulante (3 mL). El tubo anticoagulado con EDTA (Tapón lila) servirá para la realización de biometría hemática completa y el restante para la determinación de la expresión de molecular de citocinas. El tubo rojo se centrifugará a 3500 rpm durante 15 minutos en el laboratorio clínico de la UMF N°75, una parte se realizará la glucosa y el perfil de lípidos.

5.7. DETERMINACIÓN DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS POR PCR SEMICUANTITAVA

5.7.1. OBTENCIÓN DE MUESTRA PARA RT-PCR

Las muestras se obtendrán por venopunción y se colocarán en tubo con EDTA, posterior se procederá a colocarlas a 4°C lo antes posible.

5.7.2. EXTRACCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA

Se diluirán 5 mL sangre con PBS 1X en una proporción de 1:1 en un tubo, mientras que en otro tubo se agregará 4 mL de lymphoprep™. De manera cuidadosa se adicionará la sangre con PBS al tubo con lymphoprep y se procederá a centrifugar a 2000 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Al mismo tiempo, se adicionarán 5 mL de PBS 1X en 1 tubo. Posterior a la centrifugación, se rescatará el botón celular de cada tubo con cuidado, procediendo a agregar el botón a un tubo con PBS, seguido de esto se realizará otra centrifugación a 2000 rpm durante 10 minutos. Por último, se decantará el sobrenadante y se resuspenderá el botón en 1 mL de PBS, proceso que se repetirá de 3 a 4 veces.

5.7.3. VIABILIDAD Y CUENTA DE LEUCOCITOS

La cuenta de leucocitos se llevará a cabo realizando una dilución 1:20 de la muestra obtenida a partir de la lisis de eritrocitos, adicionando 10 µL de muestra y 190 µL de azul de tripano, de la cual se tomarán de 1 a 2 gotas que se colocarán en cámara de Neubauer. La viabilidad se determinará realizando un conteo de las células teñidas de azul, con respecto al total de células, esto debido a que el colorante es permeable únicamente a células muertas. Se utilizó la siguiente fórmula para este propósito: $\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{células vivas}}{\text{células totales}} \times 100$. Se utilizarán las muestras con una viabilidad superior al 90%.

5.7.4. EXTRACCIÓN DE RNA

Se calculará el volumen necesario de muestra para una concentración de 10 millones de células, esto cuantificando el promedio de células por campos y multiplicando este por el factor de

dilución y el factor de la cámara de Neubauer, cuyas unidades resultantes son leucocitos/mL, el cual se colocará en tubo estéril de 1.5 mL y se centrifugará a 2000rpm/5minutos, posterior se procederá a agregar 1 mL de Tripure Isolation Reagent (ROCHE, Basel, CH) por cada 10 millones de células. A continuación, se resuspenderá con micropipeta de manera vigorosa en repetidas ocasiones hasta formar espuma y se dejará incubar la muestra durante 5 minutos a temperatura ambiente. Al terminar el tiempo de reposo se añadirán 200 μ L de cloroformo, agitando de manera enérgica por 1 minuto y nuevamente se dejará incubar 5 minutos para proseguir a centrifugar a 12000rpm/15minutos a 4°C, para después recuperar la fase acuosa superior (fase de RNA) la cual se verterá en tubo Eppendorf de 1.5 mL, a este se le agregará 500 μ L de isopropanol para agitarse y se dejará reposar a -20°C durante 1 hora. Al pasar el tiempo mencionado, se centrifugará nuevamente a 12000rpm/15minutos a 4°C, al concluir este procedimiento se decantará el isopropanol y a la muestra contenida en el tubo se le adicionará 1 mL de etanol al 75%, para proceder a someterse a vortex durante 30 segundos para lavar el pellet de RNA y se someterá a un nuevo ciclo de centrifugación a 7500rpm/5minutos a misma temperatura anterior. Se procederá a decantar el etanol y se dejará volatilizarse completamente, para finalmente adicionar 20 μ L de agua libre de RNAsas, resuspendiendo en repetidas ocasiones, de aquí se tomará RNA para cuantificar y para verificar integridad en gel de agarosa al 2%, y el restante se almacenará hasta su uso a -70°C.

5.7.5. CUANTIFICACIÓN Y PUREZA DE RNA

Se realizará una dilución 1:100 del RNA en agua grado biología molecular y se llevará a cabo una lectura en espectrofotómetro de UV, empleando el equipo NanoDrop One®. Una unidad de absorbancia es equivalente a 40 μ g/mL de RNA. Se realizará una determinación de pureza del RNA utilizando una relación de absorbancia entre 260 nm (longitud máxima del RNA) entre 280 nm (longitud de onda de las proteínas), obteniendo una estimación de pureza. Se considerarán puras aquellas soluciones que presenten valores mayores a 1.7.

5.7.6. SÍNTESIS DE cDNA

Se realizará la síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA) de acuerdo al kit GeneAmp® RNA PCR. En un tubo Eppendorf se colocarán por reacción 2 µg de RNA y 0.5 µg de hexámeros aleatorios (Random Hexamers), aforando con agua a 10 µL. Se procederá a calentar a 65°C por 10 minutos y se colocarán los tubos en hielo. Al mismo tiempo, se realizará una mezcla master mix con una solución amortiguadora 1X, 1 mM de desonucleótidos trifosfatados (dNTPs), 20 U de inhibidor de RNAsas, 4 U de enzima retrotranscriptasa inversa y se aforará a un volumen de 10 µL con agua. Posterior, la master mix se agregará al primer tubo, se incubará a 37°C durante 60 minutos y después a 93°C durante 5 minutos empleando un termociclador. El cDNA se almacenará en congelador a -20°C hasta su uso.

5.7.7. PCR EN TIEMPO REAL

La PCR en tiempo real se realizó con el kit iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix de BIO-RAD, utilizándose 5 µL de supermix, 300 nM de oligonucleótidos F y R, 40 ng de cDNA, y agua grado biología molecular para un volumen final de 10 µL por reacción en el termociclador para tiempo qPCR Bio Rad CFX96™. La lista de oligonucleótidos y su secuencia se describen en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados

<i>Primer</i>	<i>Secuencia 5'-3'</i>	<i>Tm (°C)</i>	<i>% G/C</i>
---------------	------------------------	----------------	--------------

IL-1b F	GTCCTGCGTGTTGAAAGATGA	59.3	47
IL-1b R	GACGGGCATGTTTTCTGCTT	58.4	50
TNF-a F	GGCCTACAGCTTTGATCCCTG	63.2	57
TNF-a R	AAAGGCTCCCTGGTCTCCAG	62.5	60
IL-4 F	ACTTTGAACAGCCTCACAGAG	58.1	48
IL-4 R	TTGGAGGCAGCAAAGATGTC	58.4	50
IL-6 F	GAGACTTGCCTGGTGAAAATC	59.3	47
IL-6 R	TGGGTCAGGGGTGGTTATT	57.3	52
IL-10 F	GGGAGAACCTGAAGACCCTCA	60.8	57
IL-10 R	TGCTCTTGTTTTACAGGGAAG	59.0	45
IL-17A F	CGGACTGTGATGGTCAACCTGA	62.2	54
IL-17A R	GCACTTTGCCTCCCAGATCACA	63.1	54
B2M F	GAGTATGCCTGCCGTGTG	60.0	52
B2M R	AATCCAAATGCGGCATCT	60.0	51

La reacción se realizó de acuerdo a los parámetros de la **Tabla 3**.

Tabla 3. Condiciones de la PCR en tiempo real.

<i>Paso</i>	Activación	Desnaturalización	Alineación/extensión	Curva de fusión
<i>Tiempo (min)</i>	3:00	0:10	0:30	27:00
<i>Temperatura (°C)</i>	95.0	95.0	60.0	60-95 (0.5°C cada 0:05)
<i>No. De ciclos</i>	1	39x		----

Posterior a la reacción se llevó a cabo el análisis de las curvas de fusión de cada muestra y se determinó la expresión génica relativa con respecto a un gen control (en este caso STAT5B y B2M), utilizando el método del $2^{-\Delta Cq}$.

5.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó con el paquete SPSS versión 26. Se realizó una prueba de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y el cálculo de las medidas de tendencia central (media \pm desviación estándar) para las variables numéricas continuas, las variables categóricas se expresarán en porcentaje (%). Para analizar la asociación entre las variables numéricas se utilizará la prueba de correlación de Pearson. Por último, se realizó un análisis del efecto de la metformina en la expresión molecular y secreción de citocinas proinflamatorias utilizando una prueba de diferencia de medias (t-Student). Se entenderá que existe significancia estadística cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS

6.1. ESTANDARIZACIÓN DE PCR EN TIEMPO REAL

6.1.1. ESTANDARIZACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos se hidrataron utilizando la siguiente fórmula: $\frac{OD}{CE(2 \times 10^{-4} M)}$, donde OD es la densidad óptica, y CEM el coeficiente de extinción molar, lo anterior con la finalidad de obtener soluciones madre a 200 μ M. Aunado a esto, se procedió a cuantificarse en NanoDrop One® (**Tabla 3**), para posteriormente, realizarse electroforesis para observarlos en el gel de agarosa al 1.5%.

Tabla 4. Cuantificación de oligonucleótidos.

<i>Primer</i>	<i>ng/μL</i>	<i>A260/280</i>	<i>A260/230</i>
IL-1b F	1342.7	1.83	2.40
IL-1b R	1260.7	1.62	2.15
TNF-a F	1238.4	1.60	1.91
TNF-a R	1198.8	1.65	1.88
IL-4 F	604.4	1.87	1.70
IL-4 R	793.9	1.70	1.70
IL-6 F	1320.5	1.82	2.27
IL-6 R	1137.8	1.68	2.42
IL-10 F	642.0	1.86	1.72
IL-10 R	663.6	1.69	1.68
IL-17A F	680.7	1.80	1.58
IL-17A R	634.9	1.68	1.75
B2M F			
B2M R			

La electroforesis se realizó a partir de la solución madre de oligonucleótidos, en gel de agarosa, cargándose a los pocillos de dicho gel 1 μ L de cada oligo con concentración de 200 μ M, 3 μ L de agua y 1 μ L de buffer de carga, para a partir de los resultados de la tinción con bromuro de etidio, poder determinar la preparación de la solución de trabajo a 3 μ M. Los resultados de la electroforesis se muestran en la **Figura 12**.

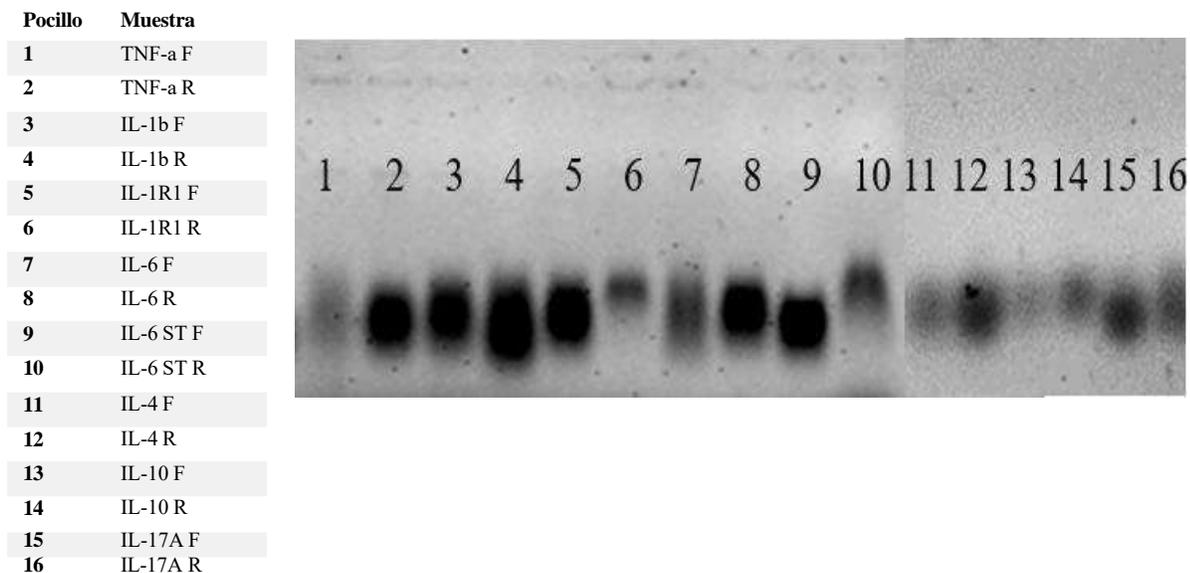


Figura 12. Electroforesis de oligonucleótidos. A partir de los resultados de la electroforesis, se decidió cambiar las concentraciones para la preparación de las soluciones de trabajo, utilizando la imagen superior como referencia y realizándose una segunda electroforesis para encontrar las condiciones para mantener la equimolaridad de los oligonucleótidos.

Posterior a esto, se eligió la concentración de los oligonucleótidos para la reacción de PCR a volumen final de 10 μ L, seleccionándose la condición de 300 nM por reacción. Lo anterior debido a que esta concentración mostró un buen rendimiento con respecto a la de 150 nM, y 75 nM. Además, se procedió a elegir entre dos genes control, ABL y B2M, para la reacción.

6.1.2. GEN CONTROL, qPCR y GENES DE INTERÉS

La elección del gen control se realizó midiendo la expresión de este en con diferentes concentraciones de cDNA, lo anterior para optimizar la cantidad de muestra a utilizar. Se descartó el uso del gen ABL, esto debido a que la secuencia nucleotídica del cebador directo, era demasiado larga (31 nucleótidos), y existieron problemas con formación de estructuras secundarias o dímeros, que se pudieron detectar en el análisis de curvas de fusión de la PCR en tiempo real. Por otro lado, el gen B2M, mostró muy poca variabilidad en diversas condiciones, como en el caso de diluciones seriadas, desde los 30 ng, hasta los 0.003 ng, por lo que se optó por seguirse utilizando (**Figura 13**).

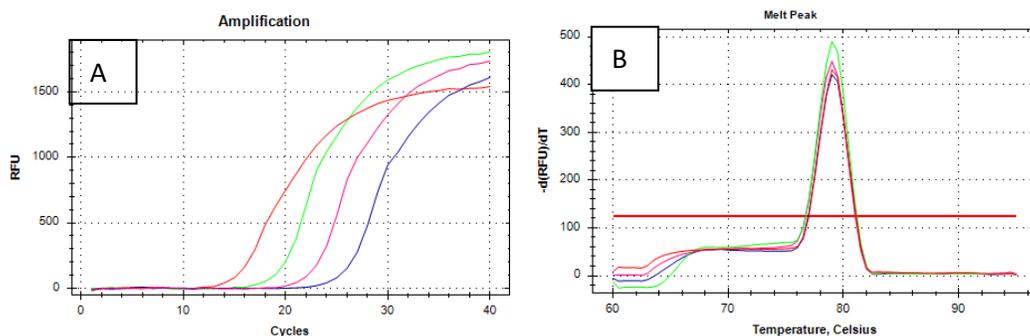


Figura 13. Diluciones seriadas B2M. (A) diluciones seriadas del cDNA con los oligonucleótidos de B2M. Se puede observar poca variación entre los ciclos umbral (ct) de las condiciones de 30 ng, 3 ng, 0.3 ng y 0.003 ng, siendo estos valores 14.17, 18.20, 21.37 y 24.54 respectivamente. (B) análisis de curvas de fusión entre las condiciones de concentración. Es importante notar el hecho de que no existe variabilidad y el pico se encuentra en el rango de temperatura indicativo de un amplicón específico (alrededor de 80°C).

Posterior a la elección del gen control adecuado, se probaron los oligonucleótidos con las condiciones seleccionadas para los genes de interés, en muestras de individuos clínicamente sanos, así como en la línea celular K562 de eritroleucemia. Cabe destacar que, en el caso de la línea celular, se realizó un estímulo con LPS, sin embargo, lo anterior resultó infructuoso, debido a que, como describió Okamoto et al. [86], dichas células expresan en poca proporción TLR4, el cual es un receptor necesario para inducir la señalización de LPS e inducir la expresión génica de citocinas proinflamatorias. En la **Figura 14**, se puede observar el comportamiento de las curvas de amplificación, así como de las de fusión de dichas citocinas en la muestra de un individuo clínicamente sano.

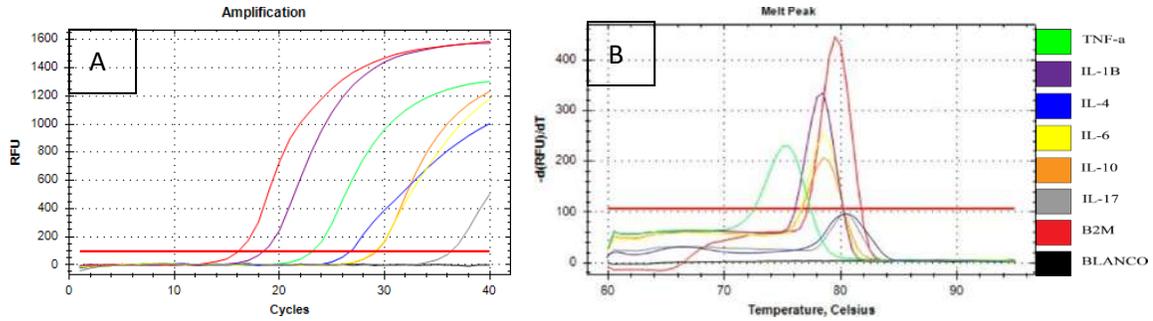


Figura 14. Análisis de expresión de genes de citocinas proinflamatorias. (A) Curvas de amplificación de los genes de interés, en muestra de individuo clínicamente sano. (B) Análisis de curvas de fusión en donde se observa que, en el caso de los genes de TNF-a, el pico de fusión se encuentra entre los 70 y 80 °C, esto puede ser explicado por el pequeño tamaño del amplicón (52 pb), por otro lado, se logra ver un pequeño pico correspondiente al gen de IL-17A, el cual es muy pequeño, lo anterior es debido al hecho de que dicho gen en un individuo sano no se expresa en demasía.

6.1.3. MÉTODO DEL $\Delta\Delta Ct$

El cálculo de la cuantificación relativa se realizó utilizando el método del $\Delta\Delta Ct$, en el cual, en primera instancia, se calcula el ΔCt , esto es, la diferencia del Ct del gen control, con respecto al gen de interés de una muestra dada, esto para normalizar el gen de interés con respecto a aquel que no será modificado por diferentes condiciones experimentales. Posterior a ello, se realiza la expresión relativa con la siguiente fórmula: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ control} - \Delta Ct \text{ experimental}$, y por último, se debe cambiar la base a logarítmica por medio de la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, con lo cual se obtiene el cambio de proporción o de pliegues del gen. Sin embargo, para esto se necesitan datos de cuantificación de los genes de un grupo control, con respecto a nuestro grupo problema, no obstante, debido a la situación sanitaria del país no se han podido coleccionar las muestras del grupo problema de manera adecuada.

6.2. RESULTADOS DE LA PCR SEMICUANTITATIVA

Se obtuvieron muestras de sangre de 22 pacientes recientemente diagnosticados con prediabetes (PD) de edades de entre 23 y 56 años (promedio de edad 43 años) y 10 individuos clínicamente

sanos como grupo control de edades de entre 28 y 57 años (promedio de edad 40 años), además, se reunieron 10 muestras posteriores a un mes de tratamiento a metformina. En la **tabla 5** se presenta un resumen de las características clínicas de los individuos que participaron en el estudio.

Variable	Control (n=10)	Prediabetes (n=22)	Valor de referencia	Valor P
Edad (años)	40.30 ± 12.41	43.3 ± 7.3	n/a	0.0717
IMC (kg/m²)	24.27 ± 3.5	29.92 ± 4.1	n/a	<0.001
Glucosa (mg/dL)	77.7 ± 10.8	107 ± 4.49	60-100 mg/dL	<0.0001
Colesterol total (mg/dL)	100.8 ± 15.04	185.5 ± 25.37	50-199 mg/dL	<0.0002
Triglicéridos (mg/dL)	88.0 ± 13.37	178.5 ± 88.46	50-150 mg/dL	0.0089

Tabla 5. Características clínicas de individuos.

6.2.1. EXPRESIÓN RELATIVA DE GENES DE CITOCINAS

De cada uno de los genes de interés se obtuvieron los $\Delta\Delta C_t$, esto es, la expresión relativa del gen de interés con respecto a un gen reportero que no varía entre diferentes condiciones, y se procedió a realizar el análisis estadístico. Se utilizó la prueba de Kolmogórov-Smirnov para determinar si un comportamiento Gaussiano en los datos y se procedió a realizar la prueba U de Mann-Whitney, esto al determinarse la inexistencia de normalidad en el comportamiento, para identificar las diferencias entre ambos grupos (**Figura 15**):

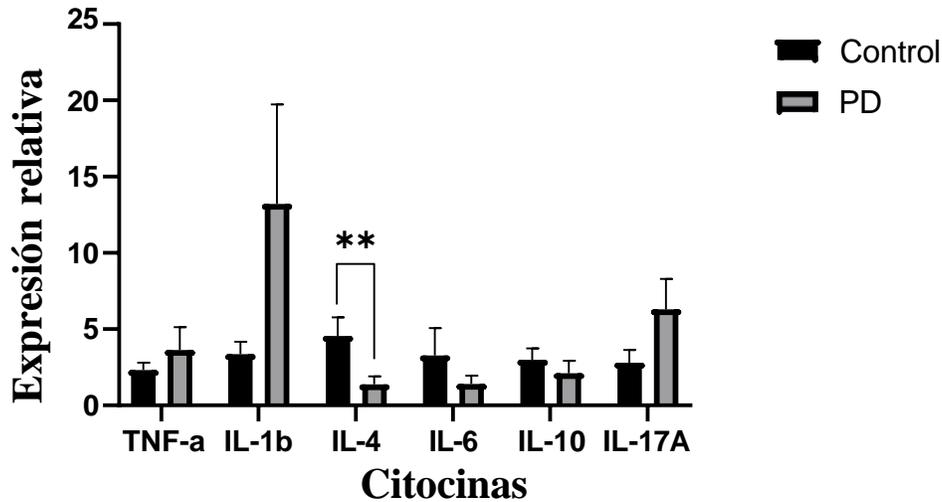


Figura 15. Comparativa entre la expresión relativa de genes de interés entre los controles y los pacientes PD. Prueba T-Student.

Los resultados arrojados muestran una tendencia a mayor expresión de citocinas proinflamatorias, es decir, TNF-a, IL-1b e IL-17A, sin embargo, no existe una diferencia significativa estadísticamente hablando. Por otro lado, en el caso de las citocinas antiinflamatorias (IL-4 e IL-10) se observa una mayor expresión génica, siendo marcada en el caso de la IL-4, en donde si existe una diferencia significativa con un valor $p=0.0081$. Cabe destacar el caso de la IL-6, que, si bien no existe diferencia estadística, si se observa un incremento de la expresión en individuos control con respecto al grupo problema.

Aunado a lo anterior, se realizó el análisis de la expresión génica de citocinas posterior a un mes de tratamiento indicado por el médico (Tx) con metformina para observar si existieron cambios en la expresión del perfil inflamatorio y antiinflamatorio de los pacientes diagnosticados con prediabetes, en la **figura 16** se pueden observar los resultados.

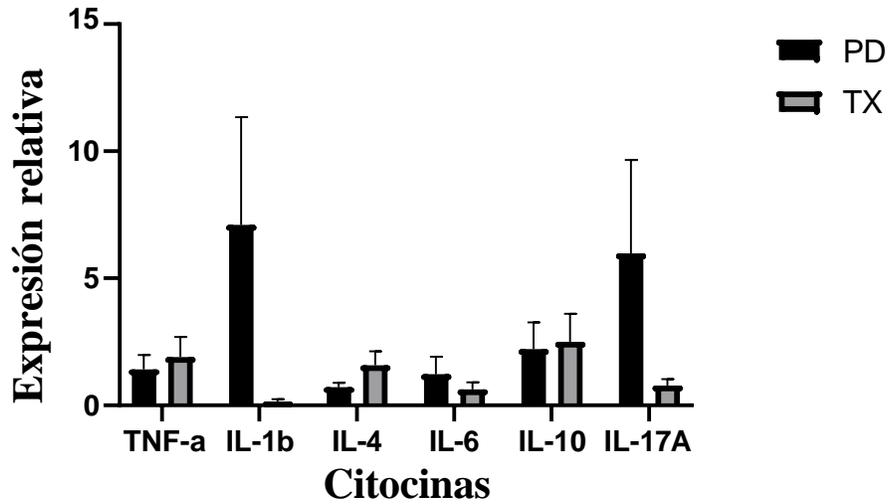


Figura 16. Expresión relativa pre y post tratamiento con metformina. Prueba T-Student pareada.

En la **figura 16**, se puede observar que, si bien no existió una diferencia significativa estadísticamente hablando, se encuentra una tendencia de disminución de expresión génica en todas las citocinas proinflamatorias y un incremento en la expresión de las antiinflamatorias (IL-4 e IL-10).

DISCUSIÓN

Si bien en los resultados se puede dilucidar una tendencia al alza de los marcadores proinflamatorios, no existió diferencias significativas entre ambos grupos, dicha tendencia es más notable en la IL-1b, una citocina relacionada directamente con la supresión del proceso de internalización de la glucosa mediada por la insulina y lipogénesis, y que, a su vez, en concentraciones elevadas crónicamente induce daño a tejidos como el páncreas, en el cual conduce a la apoptosis de células beta, las células encargadas de la producción de insulina, lo que libera moléculas que son reconocidas como PAMPs (marcadores intracelulares que se detectan como moléculas de daño) y generan una respuesta inflamatoria en las células del sistema inmunitario, así como una disminución de las concentraciones en sangre de insulina con lo que las concentraciones plasmáticas de glucosa se incrementan, contribuyendo a la existencia de un ciclo que permitirá el mantenimiento de los perfiles proinflamatorios celulares, que en última instancia provocarán daño a los tejidos periféricos del individuo afectado.

El hecho de que no existan diferencias significativas entre ambos grupos podría ser indicativo de que la prediabetes es un estado intermedio inmunometabólico entre condiciones de euglucemia e hiperglicemia, por lo que el incremento de la inflamación, si bien existe, no es lo suficientemente grande con respecto a los individuos clínicamente sanos, sin embargo, se conoce que mientras más se avanza el estadio de la enfermedad, se produce mayor estrés a nivel celular, con lo que la inflamación se incrementa de manera progresiva, por lo que el desarrollo de diabetes es un efecto colateral de dicho incremento de marcadores proinflamatorios.

Aunado a lo anterior, es importante mencionar que, en México se tiende a llevar una alimentación poco balanceada, con alimentos ultra procesados y ricos en grasas y carbohidratos lo que impacta directamente sobre los valores de inflamación presentados por los individuos del grupo control, que, en la actualidad se sabe que la ingesta de este tipo de dietas, conduce a una activación del sistema inmunitario similar a aquella relacionada con microorganismos, y que si bien, estos individuos del grupo control se seleccionaron de manera minuciosa, no fue posible controlar la alimentación de estos de manera estricta, y precisamente esto se puede observar en la expresión relativa de la IL-6, que se observa con mayor tendencia de expresión en el caso de los individuos clínicamente sanos, esto debido quizá a, en primera instancia a la alimentación.

El caso particular de la IL-6, que se encontró incrementada en los individuos clínicamente sanos, sin embargo, no fue estadísticamente significativo, sin embargo, es importante mencionar que, el incremento de esta citocina en individuos clínicamente sanos está asociada con un mayor riesgo de desarrollo de enfermedades cardíacas y desarrollo de DM[87, 88]. Aunado a lo anterior, este resultado difiere a lo reportado en la literatura, en la cual, este marcador se encuentra incrementado en aquellos individuos con prediabetes o con DM, con respecto al grupo control.

Otra de las citocinas en la que se puede observar una tendencia marcada, es la IL-17, una citocina producida por los linfocitos CD4+ Th17, cuyo papel interesantemente no se ha dilucidado con totalidad en la generación de estados de hiperglicemia, y es que, es una citocina que principalmente se encuentra en mucosas actuando en la defensa del organismo contra microorganismos extracelulares, no obstante, se ha descrito que el uso de anticuerpos monoclonales anti IL-17 mejora los estados de hiperglicemia. Es imperante el hecho de que la IL-17 es una citocina que activa una señalización que induce la secreción de mediadores proinflamatorios como quimiocinas, IL-6 y moléculas de adhesión que permiten la acumulación de células inmunitarias en sitios de inflamación, lo que explicaría su participación en la generación de estados de hiperglicemia, a su vez contribuyendo al mantenimiento del estado de metainflamación. Aunado a esto, se sabe que esta citocina está asociada a otras enfermedades con implicaciones de hiperreactividad inmunológica, como el caso de la psoriasis, lupus, entre otras enfermedades autoinmunes, por lo que un a señalización y producción continua de IL-17 ocasiona una desregulación del sistema inmunitario, lo que podría deducir el papel de la IL-17 como generador de células con perfil proinflamatorio a nivel sistémico [89].

Otro aspecto fundamental para explicar el hecho de que no existieron cambios significativos en el perfil inflamatorio de los individuos del grupo control con respecto al grupo con prediabetes es que, en las clínicas en donde se han reclutado a los participantes del grupo con prediabetes, inmediatamente después de que se les diagnosticara con resistencia a la insulina o prediabetes mediante estudios de laboratorio, el médico tratante derivó a los pacientes al servicio de nutrición, para que el profesional de la salud le indicara cambios en el estilo de vida, necesarios para frenar la progresión de la prediabetes a DM2, lo anterior, tiene un impacto directo sobre los resultados obtenidos, ya que, si bien, al momento de la primera toma de muestra, los sujetos aún no están tomando ningún fármaco, como la metformina, si han reducido en la manera de lo

posible la ingesta de dietas altas en grasa, así como regulado el consumo de carbohidratos simples, los cuales tienen un papel preponderante en la generación de mediadores proinflamatorios, adicionalmente, se les otorga un plan de ejercicios para complementar la pérdida de peso y la sensibilidad a la insulina. Asimismo, la restricción calórica de las dietas proporcionadas en estos servicios, tienen un efecto similar a la administración de metformina, es decir, provocan la activación AMPK gracias al incremento intracelular de cAMP acompañada de una disminución de ATP, con lo que se inhiben vías de señalización relacionadas a la inflamación como mTORC1, o SREBP, esta última proteína estando directamente relacionada con la síntesis de lípidos, y permitiendo la autofagia y optimización energética celular, lo que se traduce en un uso adecuado de las reservas energéticas por parte de los tejidos. Es por lo anterior que la metformina funge como un coadyuvante en la intervención al estilo de vida del individuo, lo que conlleva a cambios metabólicos celulares beneficiosos, así como sensibilización a la insulina, promoviendo esto a la resolución del estado de hiperglicemia. Esto último, permite a las células recuperarse del estrés metabólico que ocasiona la hiperglicemia por sí misma, lo que se traduce en una disminución de la inflamación de los individuos, y creando la oportunidad de frenar la progresión a estadios más avanzados de la enfermedad, como el caso de la DM y todas las comorbilidades que esto conlleva.

Por otro lado, es interesante remarcar el hecho de que existieron diferencias estadísticamente significativas en los valores obtenidos de IL-4, una citocina antiinflamatoria utilizada para observar el comportamiento inflamatorio del organismo. Dicha citocina, participa en el proceso de polarización de linfocitos T CD4⁺ a sus fenotipos Th2, cuyo patrón de expresión es fundamental en la regulación del sistema inmunitario, secretando citocinas antiinflamatorias, así como promoviendo la polarización de macrófagos a su fenotipo M2 que funcionan como células inmunológicas de vital importancia para el mantenimiento homeostático, debido a que participan en la supresión inmunitaria para resolución de estados prolongados de inflamación que ocasionan daños a los tejidos, esto gracias a la expresión de IL-10 y de otros factores solubles que permiten inhibir las señales inducidas por las citocinas proinflamatorias [90], por lo que se puede asumir que el estado de la expresión de citocinas en estos individuos se encuentra en un estado de equilibrio con respecto al grupo con prediabetes.

En las muestras post tratamiento, si bien, no existieron diferencias significativas, si se observaron valores interesantes, debido a que se encuentra un patrón de disminución de la expresión génica en los marcadores de la IL-1b, y en la IL-17A, lo que indicaría la eficacia del fármaco para ir frenando progresivamente la secreción de marcadores proinflamatorios. Por otra parte, se nota también un incremento en la tendencia de expresión en la IL-4 e IL-10. Lo anterior se puede atribuir a las propiedades antiinflamatorias y antioxidantes de la metformina, que disminuye el estrés en el retículo endoplásmico, que es una fuente importante de marcadores intracelulares que permiten la expresión de mediadores proinflamatorios y la producción de especies reactivas de oxígeno tan características del metabolismo normal celular y que se encuentran incrementadas en individuos con resistencia a la insulina, debido a un metabolismo anormal celular.

Es importante destacar que, debido al poco tiempo de tratamiento, esto es, 1 mes, los efectos en la expresión génica por parte del fármaco no son tan marcados, pero nos da un indicio de que a largo plazo podría inducir cambios importantes que aportan a la regulación tanto de metabolismo, como de la optimización de la internalización de la glucosa al interior de la célula, lo que reducirá la concentración plasmática de este carbohidrato en estos individuos. Otro punto importante es que, este fármaco por si mismo no ocasiona la remisión de la progresión a DM, si no que tiene que ir acompañado de un cambio en el estilo de vida que proporcionará el medio perfecto para la regularización del metabolismo y del perfil inmunológico del paciente. Es por lo anterior que, si se observa una tendencia sin llegar a ser estadísticamente significativa, lo que da pie a una observación más prolongada del efecto de este fármaco.

Lamentablemente no se pudieron obtener los parámetros bioquímicos de los individuos posterior al tratamiento, esto debido a limitaciones técnicas y falta de espacio de trabajo en las clínicas en donde se reclutaron los pacientes.

CONCLUSIONES

- No existen diferencias significativas en el perfil proinflamatorio entre pacientes con recién diagnóstico de prediabetes e individuos clínicamente sanos.
- La expresión génica de IL-4 se encuentra elevada en el grupo control.
- El tratamiento de 1 mes con metformina no modificó de manera significativa la expresión relativa de las citocinas tanto inflamatorias, como antiinflamatorias, sin embargo, si se observó una tendencia de disminución en el caso de los primeros, y una inclinación de incremento en el caso de las segundas, lo que sugiere que el seguimiento prolongado de la monitorización de los marcadores inmunológicos antes mencionados podrían verse radicalmente modificados posterior a un tratamiento de mayor duración, lo que podría potenciar este efecto de inmunomodulación en los individuos con prediabetes.

ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES

Este proyecto será sometido a su aprobación por el Comité de Ética y el Comité de Investigación en Salud del HGR 1 del IMSS, Delegación Michoacán.

Este estudio será regido bajo las consideraciones éticas de la declaración de Helsinki, la declaración universal de bioética y los derechos humanos, el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Además de todos los aspectos en cuanto al cuidado que se deberá tener con la seguridad y bienestar de los pacientes se respeta cabalmente los principios contenidos en el Código de Nüremberg,

De acuerdo con el reglamento de la ley general de Salud en Materia de Investigación para la salud en su título segundo, capítulo 1, artículo 13.- en toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberán prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar. Artículo 14.- la investigación que realice en seres humanos deberá desarrollarse conforme a las siguientes bases: deberá adaptarse a los principios científicos y éticos que justifiquen la investigación médica, contara con el consentimiento informado del sujeto en quien se realizara la investigación o de su representante legal. Artículo 16.- en las investigaciones en seres humanos se protegerá la privacidad del individuo sujeto de investigación, identificándolo sólo cuando los resultados lo requieren y éste lo autorice. Artículo 17.- se considera como riesgo de la investigación a la probabilidad de que el sujeto de investigación sufra algún daño como consecuencia inmediata o tardía del estudio.

Para efectos de este estudio y apegados a este reglamento, la investigación se clasifica en la siguiente categoría: Riesgo de la Investigación: Dado que este protocolo incluye la toma de muestras sanguíneas, esta se clasifica con un riesgo tipo II (mínimo) en el que se realizaran procedimientos comunes como toma de muestra de sangre, signos vitales, medidas antropométricas, historia clínica y preguntas dirigidas al paciente en estudio

7.1. ASPECTOS DE BIOSEGURIDAD

1. La investigación se considera de riesgo mínimo en aspectos de bioseguridad ya que se coleccionarán datos del expediente clínico y toma de muestra sanguínea por personal calificado. Los RPBI generados durante el estudio serán manejados bajo la norma NOM-087-ECOL-SSA1-2002.
2. Las muestras de sangre serán recolectadas en la Unidad de Medicina Familiar No. 80 del IMSS.
3. Las muestras de sangre serán obtenidas de pacientes de quienes no se reporte tener enfermedades de tipo infecto-contagiosas por lo que el manejo de las muestras y el desecho de material empleado para la toma de las mismas es de bajo riesgo. No obstante, todo el material punzocortante que haya sido empleado para la toma de muestras, así como el desecho de las mismas en el laboratorio serán depositados en recipientes especiales, manejados por expertos para el desecho de los mismos.
4. Las muestras de plasma o suero serán almacenadas en refrigeradores asignados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento.
5. Este protocolo no contempla el uso de fármacos o de otros productos médicos que requieran de prescripción por lo cual los riesgos y efectos colaterales para el participante son mínimos, restringiéndose a la posible formación de un hematoma debido a la punción de la vena para la toma de la muestra. Esto se explica con detenimiento en la carta de consentimiento.

BIBLIOGRAFÍA

1. PARVEEN S, KHAN A, Pharmaceutical QK-J of, 2020 undefined. An Insight of Prediabetes. JprtonlineCom [Internet]. 2020;1(01). Available from: www.jprtonline.com
2. Care D, Suppl SS. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care*. 2020;43(January):S14–31.
3. Edwards CM, Cusi K. Prediabetes: A Worldwide Epidemic. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2016;45(4):751–64.
4. Rett K, Gottwald-Hostalek U. Understanding prediabetes: definition, prevalence, burden and treatment options for an emerging disease. *Curr Med Res Opin* [Internet]. 2019;35(9):1529–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/03007995.2019.1601455>
5. Luc K, Schramm-Luc A, Guzik TJ, Mikolajczyk TP. Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes. *J Physiol Pharmacol*. 2019;70(6):809–24.
6. O'Neill CM, Lu C, Corbin KL, Sharma PR, Dula SB, Carter JD, et al. Circulating levels of IL-1B+IL-6 cause ER stress and dysfunction in islets from prediabetic male mice. *Endocrinology*. 2013;154(9):3077–88.
7. Chehimi M, Vidal H, Eljaafari A. Pathogenic Role of IL-17-Producing Immune Cells in Obesity, and Related Inflammatory Diseases. *J Clin Med*. 2017;6(7):68.
8. Sangrós FJ, Torrecilla J, Giráldez-García C, Carrillo L, Mancera J, Mur T, et al. Association of General and Abdominal Obesity With Hypertension, Dyslipidemia and Prediabetes in the PREDAPS Study. *Rev Española Cardiol (English Ed)*. 2018;71(3):170–7.
9. Care D, Suppl SS. 3. Prevention or delay of type 2 diabetes: Standards of medical care in diabetesd2020. *Diabetes Care*. 2020;43(January):S32–6.
10. Hostalek U, Gwilt M, Hildemann S. Therapeutic Use of Metformin in Prediabetes and Diabetes Prevention. *Drugs*. 2015;75(10):1071–94.
11. Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2018;14(2):88–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2017.151>

-
12. Forouhi NG, Wareham NJ. Epidemiology of diabetes. *Med (United Kingdom)* [Internet]. 2014;42(12):698–702. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpmed.2014.09.007>
 13. Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Dispon en <https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2006/doctos/informes/ensanut2006.pdf> Consult el 01 diciembre del 2020. 2006;
 14. Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Dispon en <http://ensanut.insp.mx/informes.php#VEaHcngz6k> Consult el 01 diciembre del 2020. 2012;
 15. Rojas-Martínez R, Basto-Abreu A, Aguilar-Salinas CA, Zárate-Rojas E, Villalpando S, Barrientos-Gutiérrez T. Prevalence of previously diagnosed diabetes mellitus in Mexico. *Salud Publica Mex.* 2018;60(3):224–32.
 16. Barranco-Cuevas IA, Zavaleta-García BH, Rodríguez-Chávez MDC, García-Galicia A, Gutierrez-Gabriel I, González-López AM, et al. Lifestyle Impact on Glycemic Control in Patients Diagnosed with Type 2 Diabetes. *J Adv Med Med Res.* 2019;30(55):1–7.
 17. Raj R, Sahay S, Tripathi J. Medications of diabetes mellitus and antidiabetic medicinal plants: A review. *Drugs.* 2016;1(1):19–28.
 18. Care D, Suppl SS. 9. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care.* 2020;43(January):S98–110.
 19. Grossmannm V, Schmitt VH, Zeller T, Panova-Noeva M, Schulz A, Laubert-Reh D, et al. Profile of the immune and inflammatory response in individuals with prediabetes and type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2015;38(7):1356–64.
 20. Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2010;125(2 SUPPL. 2):S24–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.016>
 21. Lackey DE, Olefsky JM. Regulation of metabolism by the innate immune system. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2016;12(1):15–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2015.189>
 22. Hameed I, Masoodi SR, Mir SA, Nabi M, Ghazanfar K, Ganai BA. Type 2 diabetes mellitus: From a metabolic disorder to an inflammatory condition. *World J Diabetes.* 2015;6(4):598.
 23. Asghar A, Sheikh N. Role of immune cells in obesity induced low grade inflammation and insulin resistance. *Cell Immunol* [Internet]. 2017;315(March):18–26. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.03.001>

24. Okabe Y, Medzhitov R. Tissue biology perspective on macrophages. *Nat Immunol* [Internet]. 2016;17(1):9–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.3320>
25. Bai Y, Sun Q. Macrophage recruitment in obese adipose tissue. *Obes Rev*. 2015;16(2):127–36.
26. Thomas D, Apovian C. Macrophage functions in lean and obese adipose tissue. *Metabolism* [Internet]. 2017;72:120–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2017.04.005>
27. Parisi L, Gini E, Baci D, Tremolati M, Fanuli M, Bassani B, et al. Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: Killers or Builders? *J Immunol Res*. 2018;2018.
28. Appari M, Channon KM, McNeill E. Metabolic Regulation of Adipose Tissue Macrophage Function in Obesity and Diabetes. *Antioxidants Redox Signal*. 2018;29(3):297–312.
29. Viola A, Munari F, Sánchez-Rodríguez R, Scolaro T, Castegna A. The metabolic signature of macrophage responses. *Front Immunol*. 2019;10(JULY):1–16.
30. Caslin HL, Bhanot M, Bolus WR, Hasty AH. Adipose tissue macrophages: Unique polarization and bioenergetics in obesity. *Immunol Rev*. 2020;295(1):101–13.
31. McNelis JC, Olefsky JM. Macrophages, Immunity, and Metabolic Disease. *Immunity*. 2014;41(1):36–48.
32. Monastero RN, Pentylala S. Cytokines as Biomarkers and Their Respective Clinical Cutoff Levels. *Int J Inflam*. 2017;2017.
33. Liu C, Feng X, Li Q, Wang Y, Li Q, Hua M. Adiponectin, TNF- α and inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Cytokine*. 2016;86:100–9.
34. Varfolomeev E, Vucic D. Intracellular regulation of TNF activity in health and disease. *Cytokine* [Internet]. 2018;101:26–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2016.08.035>
35. Wajant H, Siegmund D. TNFR1 and TNFR2 in the control of the life and death balance of macrophages. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7(May):1–14.
36. Sedger LM, McDermott MF. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 2014;25(4):453–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.07.016>
37. Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic

strategies. *Nat Rev Rheumatol* [Internet]. 2016;12(1):49–62. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2015.169>

38. Akash MSH, Rehman K, Liaqat A. Tumor Necrosis Factor-Alpha: Role in Development of Insulin Resistance and Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *J Cell Biochem*. 2018;119(1):105–10.
39. Tseng W, Huang Y-S, Lin H, Luo S, Mccann F, Clanchy F, et al. TNFR signalling and its clinical implications. *Cytokine*. 2018;101:19–25.
40. Netea MG, van de Veerdonk FL, van der Meer JWM, Dinarello CA, Joosten LAB. Inflammasome-Independent Regulation of IL-1-Family Cytokines. *Annu Rev Immunol*. 2015;33(1):49–77.
41. Banerjee M, Saxena M. Interleukin-1 (IL-1) family of cytokines: Role in Type 2 Diabetes. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2012;413(15–16):1163–70. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2012.03.021>
42. Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: Mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(7):407–20.
43. Gurung P, Kanneganti TD. Novel Roles for Caspase-8 in IL-1 β and Inflammasome Regulation. *Am J Pathol*. 2015;185(1):17–25.
44. Afonina IS, Müller C, Martin SJ, Beyaert R. Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme. *Immunity*. 2015;42(6):991–1004.
45. Narayanan KB, Park HH. Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-mediated cellular signaling pathways. *Apoptosis*. 2015;20(2):196–209.
46. Tan Q, Huang Q, Ma YL, Mao KM, Yang GH, Luo P, et al. Potential roles of IL-1 subfamily members in glycolysis in disease. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 2018;44(November):18–27. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2018.11.001>
47. Jager J, Grémeaux T, Cormont M, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Interleukin-1 β -induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology*. 2007;148(1):241–51.
48. Maiorino MI, Bellastella G, Giugliano D, Esposito K. Cooling down inflammation in type 2 diabetes: how strong is the evidence for cardiometabolic benefit? *Endocrine*. 2017;55(2):360–5.
49. Kaur S, Bansal Y, Kumar R, Bansal G. A panoramic review of IL-6: Structure, pathophysiological roles and inhibitors. *Bioorganic Med Chem* [Internet]. 2020;28(5):115327. Available from:

<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115327>

50. Schaper F, Rose-John S. Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 2015;26(5):475–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.07.004>
51. Rose-John S. Interleukin-6 family cytokines. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(2):1–18.
52. Baran P, Hansen S, Waetzig GH, Akbarzadeh M, Lamertz L, Huber HJ, et al. The balance of interleukin (IL)-6, IL-6soluble IL-6 receptor (sIL-6R), and IL-6sIL-6Rsgp130 complexes allows simultaneous classic and trans-signaling. *J Biol Chem*. 2018;293(18):6762–75.
53. Drutskaya MS, Nosenko MA, Atrekhany KSN, Efimov GA, Nedospasov SA. Interleukin-6: From molecular mechanisms of signal transduction to physiological properties and therapeutic targeting. *Mol Biol*. 2015;49(6):837–42.
54. Garbers C, Heink S, Korn T, Rose-John S. Interleukin-6: Designing specific therapeutics for a complex cytokine. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2018;17(6):395–412. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2018.45>
55. Akbari M, Hassan-Zadeh V. IL-6 signalling pathways and the development of type 2 diabetes. *Inflammopharmacology* [Internet]. 2018;26(3):685–98. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10787-018-0458-0>
56. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma Clin Immunol* [Internet]. 2018;14(s2):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1>
57. Kumar B V., Connors TJ, Farber DL. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity* [Internet]. 2018;48(2):202–13. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.007>
58. Taniuchi I. CD4 Helper and CD8 Cytotoxic T Cell Differentiation. *Annu Rev Immunol*. 2018;36(1):579–601.
59. Hirahara K, Nakayama T. CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases: Beyond the Th1/Th2 paradigm. *Int Immunol*. 2016;28(4):163–71.
60. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:145–73.

-
61. Caza T, Landas S. Functional and Phenotypic Plasticity of CD4+ T Cell Subsets. *Biomed Res Int*. 2015;2015.
 62. Tumes DJ, Papadopoulos M, Endo Y, Onodera A, Hirahara K, Nakayama T. Epigenetic regulation of T-helper cell differentiation, memory, and plasticity in allergic asthma. *Immunol Rev*. 2017;278(1):8–19.
 63. Diller ML, Kudchadkar RR, Delman KA, Lawson DH, Ford ML. Balancing inflammation: The link between Th17 and regulatory T cells. *Mediators Inflamm*. 2016;2016.
 64. Brucklacher-Waldert V, Ferreira C, Stebegg M, Fesneau O, Innocentin S, Marie JC, et al. Cellular Stress in the Context of an Inflammatory Environment Supports TGF- β -Independent T Helper-17 Differentiation. *Cell Rep* [Internet]. 2017;19(11):2357–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.052>
 65. Lochner M, Wang Z, Sparwasser T. The Special Relationship in the Development and Function of T Helper 17 and Regulatory T Cells [Internet]. 1st ed. Vol. 136, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier Inc.; 2015. 99–129 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.07.013>
 66. Patel DD, Kuchroo VK. Th17 Cell Pathway in Human Immunity: Lessons from Genetics and Therapeutic Interventions. *Immunity* [Internet]. 2015;43(6):1040–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2015.12.003>
 67. Beringer A, Noack M, Miossec P. IL-17 in Chronic Inflammation: From Discovery to Targeting. *Trends Mol Med*. 2016;22(3):230–41.
 68. Kilian E, Valentina D, Andrea C. IL-17 and IL-22 in immunity : driving protection and pathology. :1–21.
 69. McGeachy MJ, Cua DJ, Gaffen SL. The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease [Internet]. Vol. 50, *Immunity*. Elsevier Inc.; 2019. p. 892–906. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.021>
 70. Amatya N, Garg A V, Gaffen SL. IL-17 Signaling : The Yin and the Yang. *Trends Immunol* [Internet]. 2017;xx:1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2017.01.006>
 71. Abdel-Moneim A, Bakery HH, Allam G. The potential pathogenic role of IL-17/Th17 cells in both type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2018;101(February):287–92. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.103>

-
72. Vieira R, Souto SB, Elena S, Ana L, Severino P, Jose S, et al. Sugar-Lowering Drugs for Type 2 Diabetes Mellitus and Metabolic Syndrome — Review of Classical and New Compounds : Part-I. 2019;
 73. Singh S, Usman K, Banerjee M. Pharmacogenetic studies update in type 2 diabetes mellitus. 2016;7(15):302–15.
 74. An, H. & He L. Current understanding of metformin effect on the control of hyperglycemia in diabetes. *J Endocrinol.* 2016;228 (8)(January):1–25.
 75. Ye J, Zhu N, Sun R, Liao W, Fan S, Shi F, et al. Metformin Inhibits Chemokine Expression Through the AMPK/NF- κ B Signaling Pathway. *J Interf Cytokine Res.* 2018;38(9):363–9.
 76. Bułdak Ł, Machnik G, Bułdak RJ, Łabuzek K, Bołdys A, Okopień B. Exenatide and metformin express their anti-inflammatory effects on human monocytes/macrophages by the attenuation of MAPKs and NF κ B signaling. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2016;389(10):1103–15.
 77. Negrotto L, Farez MF, Correale J. Immunologic effects of metformin and pioglitazone treatment on metabolic syndrome and multiple sclerosis. *JAMA Neurol.* 2016;73(5):520–8.
 78. Cameron AR, Morrison VL, Levin D, Mohan M, Forteach C, Beall C, et al. Anti-Inflammatory Effects of Metformin Irrespective of Diabetes Status. *Circ Res.* 2016;119(5):652–65.
 79. Kumar A, Wong R, Ottenbacher KJ, Al Snih S. Prediabetes, undiagnosed diabetes, and diabetes among Mexican adults: Findings from the Mexican Health and Aging Study. *Ann Epidemiol* [Internet]. 2016;26(3):163–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.annepidem.2015.12.006>
 80. Basto-Abreu A, Barrientos-Gutiérrez T, Rojas-Martínez R, Aguilar-Salinas CA, López-Olmedo N, De la Cruz-Góngora V, et al. Prevalencia de diabetes y descontrol glucémico en México: Resultados de la Ensanut 2016. *Salud Publica Mex.* 2020;62(1):50–9.
 81. Siddiqui S, Zainal H, Harun SN, Sheikh Ghadzi SM, Ghafoor S. Gender differences in the modifiable risk factors associated with the presence of prediabetes: A systematic review. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev* [Internet]. 2020;14(5):1243–52. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.06.069>
 82. Rodríguez LA, Barquera S, Aguilar-Salinas CA, Sepúlveda-Amor J, Sánchez-Romero LM, Denova-Gutiérrez E, et al. Design of a cluster-randomized trial of the effectiveness and cost-effectiveness of metformin on prevention of type 2 diabetes among prediabetic Mexican adults (the PRuDENTE initiative of Mexico City). *Contemp Clin Trials* [Internet]. 2020;95:106067. Available

from: <https://doi.org/10.1016/j.cct.2020.106067>

83. Goldberg RB. Cytokine and Cytokine-Like Inflammation Markers, Endothelial Dysfunction, and Imbalanced Coagulation in Development of Diabetes and Its Complications. 2009;94(September):3171–82.
84. Lwanga, S.K. & Lemeshow S. SAMPLE SIZE DETERMINATION IN HEALTH STUDIES. A PRACTICAL MANUAL. Geneva: World Health Organization; 1991.
85. See S, Care D, Suppl SS. 9 . Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment : Standards of Medical Care in Diabetes d 2020. 2020;43(January):98–110.
86. Okamoto, M., Hirai, H., Taniguchi, K., Shimura, K., Inaba, T., Shimazaki, C., Taniwaki, M., Imanishi J. Toll-like Receptors (TLRs) are expressed by myeloid leukaemia cell lines, but fail to trigger differentiation in response to the respective TLR ligands. *Br J Haematol*. 2009;147:585–7.
87. Lehrs kov LL, Pedersen BK, Ellingsgaard H. Clinical and Translational Report Exercise-Induced Changes in Visceral Adipose Tissue Mass Are Regulated by IL-6 Signaling : A Clinical and Translational Report Exercise-Induced Changes in Visceral Adipose Tissue Mass Are Regulated by IL-6 Signaling : A Randomized Controlled Trial. *Cell Metab* [Internet]. 2019;29(4):844-855.e3. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.12.007>
88. Ridker, P.M; Rifair, N; Stampfer M. Plasma Concentration of Interleukin-6 and the Risk of Future Myocardial Infarction Among Apparently Healthy Men. *Circ Res*. 2000;101(15):1–6.
89. Gardner LCS, Grantham HJ, Reynolds NJ. IL-17 May Be a Key Cytokine Linking Psoriasis and Hyperglycemia. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2019;139(6):1214–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.02.038>
90. Fang D, Zhu J. Molecular switches for regulating the differentiation of inflammatory and IL - 10 - producing anti - inflammatory T - helper cells. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2019;(0123456789). Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03277-0>

ANEXOS



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE MICHOACÁN
UNIDAD DE MEDICINA FAMILIAR N°80
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Morelia, Michoacán, a _____ de _____ del 202_.

Por medio de la presente, acepto participar en el protocolo de investigación titulado: "**EFEECTO DE LA METFORMINA EN LA EXPRESIÓN CELULAR Y MOLECULAR DE LA RESPUESTA PROINFLAMATORIAS EN CÉLULAS MONONUCLEARES CIRCULANTES DE PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2**". Registrado ante el Comité de Investigación en Salud del IMSS con el número: _____.

El siguiente documento le proporciona información detallada sobre el mismo. Por favor léalo atentamente.

PROPÓSITO DEL ESTUDIO

Lo (a) estamos invitando a participar en un estudio de investigación que se lleva a cabo en la UMF 80, Morelia, Michoacán. La Prediabetes es un problema de salud a nivel mundial y está relacionado con la obesidad, dietas no nutritivas e inactividad física. Las cifras de glucosa (azúcar en sangre) se encuentran más altas que lo normal (entre 100 y 125 mg/dL) y esta elevación tiene su efecto en el sistema de defensa del sistema inmune. El estudio tiene como propósito describir cómo algunas sustancias (moléculas) de su sangre llamadas citocinas (interleucina 1b, interleucina 6 e interleucina 17, y el factor de necrosis tumoral alfa) tienen que ver con la respuesta de defensa del sistema inmune (estado inflamatorio), en pacientes con Prediabetes. Además, se analizará el efecto del medicamento prescrito (metformina) por su médico con

respecto a la presencia de dichas moléculas en su sangre 3 meses después de que inició su tratamiento.

PROCEDIMIENTOS. Si usted acepta participar ocurrirá lo siguiente: Se le tomará una muestra de sangre venosa de uno de sus brazos, aproximadamente 8 cucharaditas de su sangre (8 mililitros), para realizarle algunos estudios de laboratorio. Nos tardaremos aproximadamente 10 minutos o menos en tomarle la muestra de sangre. Los estudios que le realizaremos con su muestra de sangre incluyen una química sanguínea para cuantificar su azúcar y sus grasas en sangre (colesterol, triglicéridos y lipoproteínas de alta y baja densidad) y medir moléculas tanto en el suero (líquido obtenido después de centrifugar su sangre) y en sus células de la sangre (la sangre contiene células blancas llamadas leucocitos), estas moléculas se llaman citocinas que favorecen la inflamación (interleucina 1b, interleucina 6 e interleucina 17, así como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-a) antes de su tratamiento con metformina y 3 meses después. Este procedimiento de toma de muestra sanguínea se realizará en el laboratorio clínico de la UMF 80, y no se requiere de la administración de anestésicos por tratarse de un procedimiento mínimamente doloroso. El propósito de realizarle los estudios clínicos y de laboratorio, es para saber más sobre sus condiciones generales de salud y forma parte de su manejo habitual. No conservaremos su muestra más allá del tiempo requerido para realizar estos análisis.

POSIBLES RIESGOS Y MOLESTIAS. Los posibles riesgos y molestias derivados de su participación en el estudio son los siguientes: La colecta de la muestra de sangre venosa de uno de sus antebrazos le puede causar una ligera molestia al introducir o retirar la aguja; ocasionalmente se puede lastimar la vena y se puede producir un hematoma (moretón) en el sitio de la punción, al final de la toma de la muestra, lo anterior se reduce al mínimo si mantiene presionado el sitio puncionado con una torunda (bolita de algodón) húmeda con alcohol. Además alguna de las preguntas a realizar le podría ocasionar alguna molestia. La información recopilada de su expediente clínico será tomada bajo absoluta reserva y no se revelarán bajo ninguna circunstancia sus datos personales.

POSIBLES BENEFICIOS. Los resultados obtenidos del estudio no le traen beneficios directos, sin embargo, servirán para establecer cómo se comporta su sistema de defensa antes y después del tratamiento con metformina. Con esto se podrían establecer mejoras en un futuro en la atención de pacientes con Prediabetes.

PARTICIPACIÓN O RETIRO. Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Si usted decide no participar, seguirá recibiendo la atención médica brindada por el IMSS y se le continuarán ofreciendo los procedimientos establecidos dentro de los servicios de atención médica del IMSS. Es decir, que, si usted no desea participar en el estudio, su decisión, no afectará su relación con el IMSS ni su derecho a obtener los servicios de salud u otros servicios que recibe del IMSS. Si en un principio desea participar y posteriormente cambia de opinión, usted puede abandonar el estudio en cualquier momento. El abandonar el estudio en el momento que quiera no modificará de ninguna manera los beneficios que usted tiene como derechohabiente del IMSS. Para los fines de esta investigación sólo utilizaremos la información que usted nos ha brindado

desde el momento en que acepto participar y hasta el momento en el cual nos haga saber que ya no desea participar.

PRIVACIDAD Y CONFIDENCIALIDAD. La información que proporcione y que pudiera ser utilizada para identificarlo (como su nombre, teléfono y dirección) será guardada de manera confidencial y por separado al igual que sus respuestas a los cuestionarios y los resultados de sus pruebas clínicas, para garantizar su privacidad. Nadie más tendrá acceso a la información que usted nos proporcione durante el estudio, al menos que usted así lo desee. NO se dará información que pudiera revelar su identidad, siempre su identidad será protegida y ocultada, le asignaremos un número para identificar sus datos y usaremos ese número en lugar de su nombre en nuestra base de datos.

PERSONAL DE CONTACTO EN CASO DE DUDAS O ACLARACIONES

Si tiene preguntas o quiere hablar con alguien sobre este estudio de investigación puede comunicarse de 7:00 a 15:00 horas, de lunes a viernes con la Dra. Anel Gómez García, matrícula IMSS 11680652, con el IBT. Benjamín Borja Rosas, matrícula IMSS: 98170375, quienes son los investigadores responsables del estudio, a los teléfonos: (443) ext.15. Otro contacto es el Secretario del Comité de Ética en Investigación del HGR N°1 del IMSS, Dr. Gerardo Muñoz Cortéz al teléfono Ext. 31407.

Personal de contacto para dudas sobre sus derechos como participante en un estudio de

investigación. Si Usted tiene dudas o preguntas sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: comisión de Ética de Investigación de la comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS: Av. Cuauhtémoc 330 4° Piso bloque “B” de la Unidad de Congresos. Col.

Doctores. México, D.F., CP 06720. Tel. (55) 56276900 Ext 21216 de 9 a 16:00 hrs o si así lo prefiere al correo electrónico comite.eticainv@imss.gob.mx

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio, además he leído (o alguien me ha leído) el contenido de este formato de consentimiento. Se me ha dado la oportunidad de hacer preguntas, todas mis preguntas han sido contestadas a satisfacción y se me ha dado una copia de este formato. Al firmar este documento estoy de acuerdo en participar en la investigación que aquí se describe.

En caso de colección de muestra sanguínea:

- No autorizo que se tome la muestra.
- Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio.

Nombre del participante.

Firma

Teléfono

Fecha

Le he explicado el estudio de investigación al participante y he contestado todas sus preguntas. Considero que comprendió la información descrita en este documento y libremente da su consentimiento a participar en este estudio de investigación.

Nombre del encargado de obtener
consentimiento

Firma

Teléfono

Fecha

Mi firma como testigo certifica que el/la participante firmó este formato de consentimiento informado en mi presencia, de manera voluntaria.



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE MICHOACÁN
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA
EFECTO DE LA METFORMINA EN LA EXPRESIÓN MOLECULAR DE LA
RESPUESTA PROINFLAMATORIA EN CÉLULAS MONONUCLEARES
CIRCULANTES DE PACIENTES CON PREDIABETES**

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Ficha de Identificación:

Fecha: _____

Nombre: _____

No. Afiliación: _____

Teléfono: _____

Sexo: M ()

F ()

Edad: _____

Características Clínicas y Antropométricas:

Peso: _____

Talla: _____

IMC: _____

Cintura: _____

Cadera: _____

TAS: _____

TAD: _____

Características Bioquímicas:

GLU: _____

CT: _____

c-LDL: _____

TG: _____

c-HDL: _____

c-VLDL: _____

Características Hematológicas:

RBC: _____

WBC (%): _____

WBC (#) _____

HGB: _____

NEUT (%): _____

NEUT (#) _____

HCT: _____

LYMP (%): _____

LYMP (#) _____

MCV: _____

MONO (%): _____

MONO (#) _____

MCH: _____

EOS (%): _____

EOS (#) _____

MCHC: _____

BASO (%): _____

BASO (#) _____

PLT: _____

VPM: _____

IG: _____

Enfermedades Crónico-Degenerativas:

HTA: Si () No ()

DM2: Si () No ()

CID: Si () No ()

ERC: Si () No ()

EPOC: Si () No ()

HTR: Si () No ()

Consumo de Fármacos:

Fármacos:

•

•

•

•

•

•

•

•

Dosis:

•

•

•

•

•

•

•

CARTA DE ACEPTACIÓN DE COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN IMSS



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS



Dictamen de Aprobado

Comité de Ética en Investigación 16028.
H GRAL REGIONAL NUM 1

Registro COFEPRIS 17 CI 16 022 019

Registro CONBIOÉTICA CONBIOETICA 16 CEI 002 2017033

FECHA Viernes, 18 de septiembre de 2020

Dra. Anel Gómez García

PRESENTE

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título **EFFECTO DE LA METFORMINA EN LA EXPRESIÓN MOLECULAR DE LA RESPUESTA PROINFLAMATORIA EN CÉLULAS MONONUCLEARES CIRCULANTES DE PACIENTES CON PREDIABETES** que sometió a consideración para evaluación de este Comité, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A P R O B A D O**.

Número de Registro Institucional

Sin número de registro

De acuerdo a la normativa vigente, deberá presentar en junio de cada año un informe de seguimiento técnico acerca del desarrollo del protocolo a su cargo. Este dictamen tiene vigencia de un año, por lo que en caso de ser necesario, requerirá solicitar la reaprobación del Comité de Ética en Investigación, al término de la vigencia del mismo.

ATENTAMENTE

Dra. Anel Gómez García
Presidente del Comité de Ética en Investigación No. 16028

Impresión

IMSS

SECRETARÍA DE SALUD Y SEGURIDAD SOCIAL

CARTA DE ACEPTACIÓN DEL COMITÉ LOCAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS



Dictamen de Aprobado

Comité Local de Investigación en Salud 1602.
H-GRAL REGIONAL NUM 1

Registro COFEPRIS 17 CI 16 022 019

Registro CONBIOÉTICA CONBIOÉTICA 16 CEI 002 2017033

FECHA Jueves, 01 de octubre de 2020

Dra. Anel Gómez García

PRESENTE

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título: **EFFECTO DE LA METFORMINA EN LA EXPRESIÓN MOLECULAR DE LA RESPUESTA PROINFLAMATORIA EN CÉLULAS MONONUCLEARES CIRCULANTES DE PACIENTES CON PREDIABETES** que sometió a consideración para evaluación de este Comité, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación, por lo que el dictamen es **APROBADO**.

Número de Registro Institucional

R-2020-1602-019

De acuerdo a la normativa vigente, deberá presentar en junio de cada año un informe de seguimiento técnico acerca del desarrollo del protocolo a su cargo. Este dictamen tiene vigencia de un año, por lo que en caso de ser necesario, requerirá solicitar la reaprobación del Comité de Ética en Investigación, al término de la vigencia del mismo.

Patricia Ortega León

Presidente del Comité Local de Investigación en Salud No. 1602

REGISTRADO

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL