



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN

TÍTULO DE LA TESIS
ASOCIACIÓN DE LOS NIVELES DE METILACIÓN DE LOS GENES *INS* E *IRS1*
CON INDICADORES DE CONTROL METABÓLICO Y EL CONSUMO DE
INULINA EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO II.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN

P R E S E N T A:

L. N. ARIADNA XIMENA CERÓN RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. OLLIN CELESTE MARTÍNEZ RAMÍREZ

CO-DIRECTOR DE TESIS:
DRA. AZUCENA SALAZAR PIÑA

COMITÉ TUTORAL:

DRA. AMERICA IVETTE BARRERA MOLINA

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO 2020

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo otorgado por el programa financiado por CONACYT número 005576 Maestría en Ciencias de la Nutrición y a la Dra. Julieta Rubio por el apoyo para llevar a cabo una estancia de investigación en el Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

A mi papá un pilar fundamental en mi vida, mi motor y mi apoyo incondicional quien me ha ensañado a nunca darme por vencida, a siempre buscar más y mejores oportunidades, a ser siempre amable y agradecida con la vida.

A mi mamá quien me ha brindado siempre su amor incondicional, quien me ha enseñado que el esfuerzo y el trabajo constante es una virtud muy valiosa, a no darme por vencida nunca y a seguir siempre adelante a pesar de las adversidades.

A mis hermanas y mis cuñados, quienes han sabido siempre apoyarme, animarme, orientarme y brindarme todo su amor y compañía.

A la Dra. Ollin Celeste por ser siempre tan amable, por su calidez humana y por el gran apoyo que ha sido como parte de este nivel de estudio, por enseñarme el querer y valorar el mundo de la investigación y el laboratorio. Siempre le estaré agradecida por el todo el tiempo que me dedico y las enseñanzas dentro y fuera del ámbito estudiantil y por haberme recibido como alumna a un semestre de iniciada la maestría.

A la Dra. Azucena por ser un ejemplo de persona destacada por su inteligencia, amabilidad y sinceridad, y por abrirme a un panorama distinto de la nutrición que se convirtió en un gran reto para mi y me hizo valorar aún más mi carrera y por brindarme la confianza para realizar el presente proyecto, al igual que al M.C.N. Fernando Torres Romero por brindarme el apoyo necesario para continuar con otro enfoque su investigación.

A la Dra. Julieta Rubio un agradecimiento especial por abrirme las puertas del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, por brindarme un espacio dentro de su laboratorio e incluirme como parte de su alumnado, por ser siempre tan amable conmigo y con mis compañeros promoviendo siempre la unión como

equipo de trabajo, por su gran calidad humana y el gran apoyo que me brindó durante la estancia de investigación.

Al Dr. David Martínez-Duncker por haberme recibido como alumna al inicio de la maestría, por su amabilidad y calidez humana, por su tiempo y sus enseñanzas, por ser un gran ejemplo de ser humano.

A mis compañeros de la maestría, especialmente a mis compañeras y amigas Perla Miranda y Martha Martínez-Duncker por guiarme en un lugar nuevo para mi, por brindarme su amistad, por apoyarme siempre que lo necesite, por los ratos de risas, clases, salidas, tareas y comidas compartidas.

A mis compañeros del laboratorio de la UNAM Erik, Wendy, Sebastián, Jessica, Samuel, Daniela, David, Alejandra, Alegna, Pavel y Renato por recibirme tan amablemente en su laboratorio, brindarme un espacio y compartir conmigo material, enseñanzas, risas y tiempo.

A personas muy especiales para mi Amanda, Susana, Wendy, Francis y Jessica por ser grandes mujeres y excepcionales amigas.

RESUMEN

Introducción: Actualmente se buscan tratamientos que mejoren el control de la Diabetes Mellitus tipo II (DMT2) y la inulina ha demostrado tener eficacia en la disminución de los niveles de glucosa y demás parámetros de control metabólico en estudios realizados en pacientes con diabetes, sobrepeso y dislipidemias. Por otro lado, estos efectos sobre el control metabólico podrían estar asociados con cambios en la modulación epigenética de los principales genes de la vía de la insulina. **Objetivo.** Determinar la relación entre los niveles de metilación de los genes *INS* e *IRS-1*, el consumo de inulina y el control metabólico de pacientes con DMT2. **Material y métodos.** Estudio experimental longitudinal con 67 pacientes del hospital general de Huitzucó, Guerrero que participaron en una intervención con consumo de inulina de agave, 10gr durante 2 meses en un estudio previo. Los parámetros evaluados incluyeron composición corporal, análisis bioquímicos y niveles de metilación de los genes *INS* e *IRS-1* mediante MS-PCR. **Resultados.** Se estudiaron 23 hombres y 44 mujeres con edad media de 54.4 años \pm 10.2. Se encontró que el 100% de los sujetos del estudio presentaron algún nivel de metilación del gen *INS* y los niveles de no-metilación presentaron un cambio con un aumento significativo post-intervención en la población general y en las mujeres. El estatus de metilación se encontró relacionado con circunferencia abdominal, masa grasa, glucemia y c-LDL; la no-metilación se vio relacionada con circunferencia abdominal, grasa abdominal, grasa total, colesterol total, c-LDL y ácido úrico. Con respecto al gen *IRS-1* encontramos el estatus de no-metilación en todos los sujetos estudiados sin cambios posteriores a la intervención con una porción no significativa de sujetos con algún nivel de metilación. **Conclusiones.** Se encontraron cambios estadísticamente significativos en los niveles de metilación del gen *INS* posterior a la intervención con inulina, lo cual podría tener repercusiones en la expresión del gen de la insulina, esto a su vez podría explicar los cambios encontrados en los indicadores metabólicos de los pacientes.

ABSTRACT

Introduction: Currently worldwide we are looking for treatments that improve the type II diabetes mellitus (T2DM) control, inulin has shown efficacy in the reduction of glucose levels and other metabolic control parameters in studies with diabetes patients, overweight and dyslipidemia. On the other hand, these effects on metabolic control could be associated with changes in the epigenetic modulation on the main genes of the insulin pathway. **Objective:** To determine the relationship between methylation levels of the INS and IRS1 genes, inulin consumption and the metabolic control of T2DM patients. **Material and methods:** This longitudinal study included samples from 67 study subjects from the General Hospital of Hiutzuco, Guerrero, who participated in an intervention with agave inulin consumption, 10gr for 2 months in a previous study. The parameters of the samples assayed included body composition, biochemical analysis and methylation levels of INS and IRS1 genes. We analyzed using MS-PCR. **Results:** 23 men and 44 women with a mean age of 54.4 years \pm 10.2 were studied. We found that the 100% of study subjects considered some level of INS gene methylation and specified non-methylation levels had a change with a significant increase post-intervention in the general population and women. Levels of abdominal circumference, fat mass, glycemia and LDL-C were found to be significantly related to methylation status; levels of abdominal circumference, abdominal fat, total fat, total cholesterol, LDL-C and uric acid were found related to non-methylation status. About IRS1 gene, we found the non-methylation status in all the studied subjects without changes after the intervention with a non-significant portion of subjects with some level of methylation. **Conclusions:** Statistically significant changes were found in the methylation levels of INS gene after inulin intervention, which could have repercussions on the expression of that gene, this could explain the changes found in the metabolic indicator of the patients.

INDICE GENERAL

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
INDICE GENERAL	III
INDICE DE FIGURAS	V
INDICE DE TABLAS	VI
SIGLAS Y ABREVIATURAS	VIII
SIMBOLOGÍA	X
1. ANTECEDENTES	13
1.1 DIABETES MELLITUS.....	13
1.2 DIABETES MELLITUS TIPO 2.....	13
1.3 EPIDEMIOLOGÍA DE LA DMT2.....	14
1.4 GASTOS POR COMPLICACIONES DE LA DMT2.....	15
1.5 FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A DMT2.....	16
1.5.1 Obesidad y sobrepeso.....	16
1.5.2 Dieta.....	16
1.5.3 Edad.....	17
1.5.4 Sedentarismo.....	17
1.5.5 Antecedentes heredofamiliares.....	17
1.5.6 Etnia.....	18
1.6 COMPLICACIONES DE LA DMT2.....	18
1.7 SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA EN CONDICIÓN FISIOLÓGICA NORMAL.....	19
1.7.1 Vía de señalización de la PI3K.....	20
1.8 TRATAMIENTO PARA DMT2.....	22
1.8.1 Tipos de tratamiento:.....	23
1.9 INULINA Y DIABETES.....	28
1.10 EPIGENÉTICA EN DMT2.....	29
1.10.1 Metilación del DNA.....	29
1.10.2 Funciones de la metilación.....	30
1.10.3 Diabetes Mellitus Tipo 2 y metilación.....	31
1.10.4 Cambios de la vía de señalización de los genes <i>INS</i> , <i>IRS1</i>	32
1.10.5 Metilación <i>de novo</i>	33
1.10.6 Dieta y epigenética en respuesta a la enfermedad.....	34
2. JUSTIFICACIÓN	37
3. HIPÓTESIS	38
4. OBJETIVOS	38
A. GENERAL.....	38
B. ESPECÍFICOS.....	38
5. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	39
A. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	39
B. UNIVERSO DE TRABAJO Y MUESTRA.....	39
C. INSTRUMENTO DE INVESTIGACIÓN.....	40

D. DESARROLLO DEL PROYECTO	40
E. DISEÑO DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
6. RESULTADOS.....	47
7. DISCUSIÓN	72
8. CONCLUSIONES	80
9. REFERENCIAS.....	81
10. ANEXOS.....	86

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Señalización de insulina en condición fisiológica normal.	22
Figura 2. Representación esquemática de la metilación del DNA, la alteración de la transcripción y a la expresión de los genes.	31
Figura 3. Esquema de las vías que contribuyen a las complicaciones de la DMT2.	32
Figura 4. Niveles de metilación y no metilación del gen INS.	54
Figura 5. Niveles de metilación y no-metilación del gen INS, mujeres.	55
Figura 6. Indicadores de control metabólico y niveles de metilación y no-metilación del gen INS.	60
Figura 7. Colesterol LDL limítrofe y niveles de metilación del gen INS antes y después de la intervención con inulina.	64
Figura 8. Indicadores de control metabólico y niveles de no metilación del gen INS antes y después de la intervención con inulina.	66

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efectos nutricionales y beneficios potenciales para la salud de los fructanos de tipo inulina (21,24).....	27
Tabla 2. Estudios que investigaron la asociación de factores dietéticos y metilación.	35
Tabla 3. Secuencia de los primers para INS, IRS-1.	45
Tabla 4. Datos descriptivos de la población.	48
Tabla 5. Características clínicas de la población antes y después la suplementación con inulina.	49
Tabla 6. Análisis de los indicadores de control metabólico de la población dividido en categorías.	51
Tabla 7. Niveles de metilación y no metilación de los genes INS e IRS-1.....	53
Tabla 8. Niveles de metilación y no metilación de los genes INS e IRS-1 categorizado por sexo.	54
Tabla 9. Niveles de metilación y no-metilación del gen INS por tiempo de evolución de DMT2 antes y después de la intervención con inulina.	56
Tabla 10. Niveles de metilación y no-metilación del gen IRS-1 por tiempo de evolución de DMT2 antes y después de la intervención con inulina.	56
Tabla 11. Niveles de metilación y No-metilación del gen INS, antes y después de la intervención con inulina categorizado por IMC.....	57
Tabla 12. Indicadores de control metabólico y niveles de metilación del gen INS.	58
Tabla 13. Indicadores de control metabólico y niveles de no-metilación del gen INS.	60
Tabla 14. Indicadores de control metabólico y niveles de metilación del gen INS antes y después de la intervención con inulina.	62
Tabla 15. Indicadores de control metabólico y niveles de no-metilación del gen INS antes y después de la intervención con inulina.	64
Tabla 16. Niveles de metilación y no-metilación del gen IRS-1, antes y después de la intervención con inulina categorizado por IMC.....	66
Tabla 17. Indicadores de control metabólico y niveles de metilación del gen IRS-1.	67

Tabla 18. Indicadores de control metabólico y niveles de no-metilación del gen IRS1.	68
Tabla 19. Indicadores de control metabólico y niveles de metilación del gen IRS-1 antes y después de la intervención con inulina.	69
Tabla 20. Indicadores de control metabólico y niveles de no-metilación del gen IRS-1 antes y después de la intervención con inulina.	70

SIGLAS Y ABREVIATURAS

ADA: Asociación Americana de Diabetes (por sus siglas en inglés).

AKT: Proteína cinasa B (por sus siglas en inglés).

ALAD: Asociación Latinoamericana de Diabetes.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ATP III: Panel de tratamiento para adultos (por sus siglas en inglés).

BAD: Proteína antiapoptótica antagonista de Bcl2

LDL: Lipoproteínas de baja densidad (por sus siglas en inglés).

HDL: Lipoproteínas de alta densidad (por sus siglas en inglés).

CpG: Citosina y guanina enlazados por fosfatos.

FID: Federación Internacional de Diabetes.

DMG: Diabetes Mellitus Gestacional.

DMT2: Diabetes Mellitus tipo 2.

DNA: Ácido Desoxirribonucleico (por sus siglas en inglés).

DNMT1: DNA (citosina-5)- metiltransferasa 1.

DNMT3b: DNA (citosina-5)- metiltransferasa 3B.

DNMTs: DNA metiltransferasa

DPP4: Inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV.

EEUU: Estados Unidos de América

ENSANUT MC: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino

FDA: Administración de Alimentos y Fármacos (por sus siglas en inglés).

G6DPH: Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa.

GLP1: Análogo del péptido similar al glucagón tipo 1.

GRAS: Generalmente reconocido como seguro (por sus siglas en inglés).

GS: Glucógeno sintasa

GSK3: Glucógeno sintasa cinasa 3

IL-6: Interleucina 6

IMC: índice de masa corporal

iNOS: Sintasa de oxido nítrico inducible

INS: Insulina

IR: Receptor de insulina

IRS1: Sustrato receptor de la insulina isoforma 1 (por sus siglas en inglés).

M.C.N: Maestro en Ciencias de la Nutrición.

MAP cinasas: Cinasas activadas por mitógenos.

MODY: Diabetes de inicio en la madurez de los jóvenes.

MS-PCR: PCR específica de metilación (por sus siglas en inglés).

mTOR: molécula blanco de la rapamicina en mamíferos.

NFKB2: Subunidad del factor nuclear NF-kappa-b2.

NPH: Protramina neutra de Hagedorn.

NSE: Estándar basado en evidencia (por sus siglas en inglés).

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PFK2: Fosfofructocinasa 2.

PI3K: Fosfatidilinositol 3 cinasa.

PI4-P: Fosfatidilinositol 4-fosfato.

PTB: Dominio de unión a fosfotirosinas.

PY: Tirosina fosforilada.

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.

RTK's: Factores de crecimiento con actividad intrínseca de cinasas de Tyr.

SAM: S-adenosilmetionina.

SH2: Dominio 2 de la proteína Scr.

USD: dólar.

UV: Ultravioleta

U.A.E.M: Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

U.N.A.M: Universidad Nacional Autónoma de México.

PIP₃: PI3,4,5- trisfosfato.

A1C: Hemoglobina glucosilada.

DNMT3a: DNA (citosina-5)- metiltransferasa 3A.

PIP₂: PI3,4-bisfosfato.

PI4,5-P₂: Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato.

5-Mc: 5 metilcitosina.

SIMBOLOGÍA

C: Cuartil.

C/u: Cada uno.

CA: Circunferencia Abdominal.

CH₃: Grupo metilo.

DI: Decilitro.

g.: Gramos.

G1: Grupo 1.

G2: Grupo 2.

Kg.: Kilogramos

Kg/m²: Kilogramos sobre metros cuadrados.

l.: Litro.

mg.: Miligramos.

ml.: Mililitros.

ng.: Nanogramos.

nm.: Nanómetros.

°C: Grados centígrados.

Pb: Pares de bases.

rpm.: Revoluciones por minuto.

µg: Microgramos.

µl: Microlitro.

µmol: Millonésima de mol.

1. ANTECEDENTES

1.1 Diabetes Mellitus

La Diabetes Mellitus conjunta a un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por niveles elevados de glucosa en sangre relacionado a defectos en la secreción de la insulina, defectos en la acción de la insulina o a ambas condiciones. Los niveles elevados de glucosa en sangre de forma constante o hiperglucemia crónica de la diabetes se asocian con la disfunción y daño de diferentes órganos, en especial con los ojos, riñones, vasos sanguíneos y el corazón (1,2).

La diabetes se puede clasificar de forma general en las siguientes categorías:

- A. Diabetes Mellitus Tipo 1 (DMT1), se relaciona con la destrucción de las células β pancreáticas de forma autoinmune que por lo general lleva a un déficit absoluto de insulina.
- B. Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2), se desarrolla por la pérdida progresiva de la secreción de insulina de las células β del páncreas.
- C. Diabetes Mellitus Gestacional (DMG), diagnosticada por lo general en el segundo o tercer trimestre de embarazo, sin la manifestación de signos o síntomas previo a la gestación.
- D. Diabetes ocasionada por otras causas, tales como síndromes de la diabetes monogénica (diabetes neonatal o tipo MODY), enfermedades del páncreas exocrino (fibrosis y pancreatitis), diabetes por drogas o productos químicos (por ejemplo, el desarrollado con el uso de glucocorticoides, tratamiento del VIH / SIDA, o después de trasplante de órganos) (3).

1.2 Diabetes Mellitus Tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), es una enfermedad crónico-degenerativa caracterizada por una deficiencia relativa a la insulina y por resistencia a la insulina periférica. A menudo se asocia con la edad, obesidad, falta de actividad física, historia familiar de primer grado o con una fuerte predisposición genética, sin embargo, la etiología genética de la diabetes tipo 2 es aún un tema poco estudiado

(3,4). Para el diagnóstico de esta enfermedad existen criterios emitidos por la Asociación Americana de Diabetes (ADA) dentro de los cuales se encuentran las siguientes especificaciones: glucemia en ayunas ≥ 126 mg/dl (ayuno definido como no ingesta calórica en las últimas 8 horas), glucemia plasmática a las 2 horas ≥ 200 mg/dl durante una prueba oral de tolerancia a la glucosa (la prueba deber ser realizada con una carga de 75 gramos de glucosa anhidra disuelta en agua), hemoglobina glucosilada (A1C) ≥ 6.5 y glucemia al azar ≥ 200 mg/dl en el paciente con síntomas clásicos de hiperglucemia o crisis hiperglucémica (3). Los pacientes con DMT2 pueden o no tener la presencia de síntomas característicos de la enfermedad, estos síntomas pueden no ser reconocidos o tardar tiempo en aparecer, por lo que muchas personas con esta enfermedad pueden no estar conscientes de su condición por muchos años (4). Los síntomas principales de la DMT2 son: poliuria, definido como la excreción abundante de orina, polidipsia, que es el aumento anormal de la sed, polifagia, referido a un aumento anormal de la necesidad de comer, pérdida de peso, fatiga e irritabilidad, infecciones frecuentes, visión borrosa, heridas que tardan en sanar, hormigueo o entumecimiento en miembros inferiores o superiores (5).

1.3 Epidemiología de la DMT2

La epidemiología se dedica al estudio de la distribución y la frecuencia de la enfermedad y sus determinantes en la población. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el mundo existe una prevalencia de más de 422 millones de personas con esta enfermedad y es muy probable que esta cifra aumente a más del doble para el año 2030. Los resultados de la prevalencia de DMT2 se han incrementado con rapidez en los países de medianos y bajos ingresos. Para el año 2015 la diabetes fue la causa directa de 1,6 millones de muertes aproximadamente. Para el año 2012 otros 2.2 millones de muertes se atribuyeron a la hiperglucemia y aproximadamente la mitad de las muertes relacionadas con esta enfermedad fue en personas menores a los 70 años (6). De acuerdo con las cifras de 2017 de la Federación Internacional de Diabetes (FDI),

existían en el mundo 425 millones de personas que viven con diabetes, de las cuales, 123 millones se encontraban en una edad mayor a 65 años y 327 millones en edades comprendidas entre los 20 y 64 años. De forma ordenada los países China, la India, los Estados Unidos, Brasil, Rusia y México, son los países con mayores cifras de prevalencia de diabetes, cifras que podrían incrementarse a 693 millones para el año 2045. La diabetes en todas las formas impone un costo inaceptablemente alto, desarrollo humano, social y económico para los países que se encuentran en vías de desarrollo. En el caso específico de México, nuestro país ocupa el 5º lugar a nivel mundial en la prevalencia de diabetes mellitus tipo 2, siendo aproximadamente, 12 millones las personas que viven con este padecimiento; por todo lo antes mencionado, actualmente existe una urgencia para reducir la carga mundial de esta enfermedad que afecta actualmente a tantos millones de personas (7). De acuerdo con los resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016 (ENSANUT MC 2016) la prevalencia de diabetes registrada fue del 9.4% de pacientes con diagnóstico previo, del cual el 10.3% correspondía a mujeres y 8.4% a hombres con edades comprendidas entre 60 y 69 años. Es importante destacar que la ENSANUT MC 2016 registró un aumento en la prevalencia de diabetes respecto a las registradas en la ENSANUT 2012 con 9.2% y en la ENSANUT 2006 con 7.2%, sin embargo, el total de esta prevalencia podría ser mayor por aquellas personas con diabetes que desconocen su condición (8).

1.4 Gastos por complicaciones de la DMT2

La diabetes es un problema creciente que conlleva a altos costos para la sociedad. De acuerdo con las estimaciones de la Federación Internacional de Diabetes, en el año 2013 la diabetes costó como mínimo 548.000 millones de USD en gastos de salud a nivel mundial del cual el 11% del gasto fue en adultos; más del 80% de los 184 millones de personas con diabetes de este grupo de edad vive en países de ingresos medios y bajos. Por otro lado, para el año 2035, se espera que este número aumente a 264 millones y más del 86% vivirá en países de ingresos medios y bajos (4). Las complicaciones debidas a la diabetes son una causa importante de discapacidad, disminución de la calidad de vida y muerte. De acuerdo a los

resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino ENSANUT MC 2018, las personas con diagnóstico previo de diabetes reportaron complicaciones tales como: visión disminuida (54.5%), daño en retina (11.19%), pérdida de la vista (9.9%), úlceras (9.14%) y amputaciones (5.5%) (8). En 2013, se gastaron un promedio estimado de 1,437 USD por persona con diabetes a nivel mundial en el tratamiento y control de la enfermedad (4,8).

Con el 10% de la población adulta afectada a nivel mundial, la región de América del Norte y Caribe tiene la segunda prevalencia comparativa más alta de diabetes mellitus tipo 2 con 36.8 millones de personas afectadas, la mayor parte de esta población vive en los EEUU, México y Canadá que de acuerdo con las estimaciones para el año 2035 se espera que el número de personas con DMT2 aumente hasta los 50.4 millones (4).

1.5 Factores de riesgo asociados a DMT2

Existen diversos factores de riesgo importantes para el desarrollo de la DMT2, por ejemplo: sobrepeso, obesidad, dieta, edad, sedentarismo, antecedentes heredofamiliares y grupo étnico (4).

1.5.1 Obesidad y sobrepeso

La obesidad (Índice de Masa Corporal IMC mayor o igual 30 kg/m²) y el sobrepeso (IMC comprendido en el rango de 25 a 30 kg/m²) incrementan el riesgo de desarrollar DMT2 a cualquier edad. En la actualidad más del 80% de los casos de DMT2 pueden ser atribuidos a la obesidad. Por el contrario, la reversión del sobrepeso y la obesidad también disminuye el riesgo de DMT2 y mejora el control glucémico, los niveles de presión arterial y/o de lípidos en pacientes con diabetes establecida. (9,2)

1.5.2 Dieta

La dieta se considera un factor de riesgo puesto que juega un papel importante en el desarrollo de la DMT2, algunos datos sugieren que ciertos factores dietéticos pueden estar implicados en la fisiopatología de esta enfermedad tales como la

composición de la dieta, en particular con el alto consumo de hidratos de carbono, grasas saturadas, el consumo de alcohol, el bajo consumo de fibra y la exposición a un ambiente obesogénico que se asocia directamente con la afectación del peso corporal que contribuyen al desarrollo de la DMT2 (9).

1.5.3 Edad.

La edad se ha considerado como un factor de riesgo importante para la diabetes. La prevalencia de DMT2 aumenta a partir de la mediana edad, y es mayor en la tercera edad por lo que las pruebas clínicas de diagnóstico deben comenzar a la edad de 45 años. Estas pruebas de diagnóstico deben ser realizadas en adultos con sobrepeso u obesidad de cualquier edad con uno o más factores de riesgo para diabetes (3,2,9).

1.5.4 Sedentarismo

El estilo de vida sedentario disminuye la utilización de energía del organismo promoviendo la ganancia de peso corporal, lo que aumenta el riesgo de DMT2. Una de las conductas sedentarias más prevalente es ver la televisión por tiempos prolongados, lo cual se ha visto asociado con el desarrollo de obesidad, por otra parte, la actividad física de intensidad moderada reduce la incidencia de nuevos casos de DMT2 independientemente de la presencia o ausencia de intolerancia a la glucosa (9).

1.5.5 Antecedentes heredofamiliares

Tener parentesco con algún familiar de primer grado con DMT2 se asocia con una fuerte relación para el desarrollo de esta enfermedad. La posibilidad de que un individuo sea diagnosticado con la enfermedad, teniendo un padre o madre con DMT2 es de 2 a 3 veces mayor para desarrollar diabetes (aproximadamente un 40% de riesgo incrementado) y el riesgo incrementa de 5 a 6 veces si ambos padres presentan la condición, mientras que el riesgo en la población general es de alrededor del 7% (9).

1.5.6 Etnia

Existen grupos étnicos que tienen una predisposición particular para desarrollar resistencia a la insulina y DMT2 cuando se exponen a condiciones adversas. La prevalencia de diabetes diagnosticada entre hispanos es 1.9 veces más alto que el de los caucásicos. La diabetes se diagnostica en una edad temprana y los hispanos sufren de mayores tasas de diabetes relacionadas con complicaciones y mortalidad, por otro lado, las poblaciones de afrocaribeños e indios asiáticos también exhiben una mayor prevalencia de DMT2 que los caucásicos (9).

1.6 Complicaciones de la DMT2.

Las personas con DMT2 tienen un riesgo incrementado para desarrollar diversos problemas de salud que pueden generar discapacidad o incluso ocasionar la muerte (2). Las complicaciones de la diabetes son en gran medida consecuencia de lesiones en los pequeños vasos sanguíneos causadas por la hiperglucemia crónica, daño que puede presentarse en diferentes órganos, nervios y vasos sanguíneos. (9) La causa más común de muerte y discapacidad entre las personas que tienen diabetes es la enfermedad cardiovascular. Algunas de las enfermedades cardiovasculares que acompañan a la diabetes son: infarto al miocardio, angina de pecho, enfermedad arterial periférica e insuficiencia cardíaca congestiva (4,9). Otra de las enfermedades con una alta prevalencia en los pacientes con diabetes es la enfermedad renal o nefropatía, esta patología es incluso más común en personas con diabetes que en aquellas que no tienen esta enfermedad, siendo una de las principales causas para el desarrollo de la enfermedad renal crónica. (8) La nefropatía diabética se origina por daño en pequeños vasos sanguíneos a causa de la hiperglucemia crónica, lo cual puede causar daño renal parcial o total. Otra de las complicaciones por DMT2 es la retinopatía diabética, la cual se define como el desarrollo de una enfermedad en los ojos que puede generar un daño en la visión y provocar ceguera, en cuanto a la fisiopatología de retinopatía esta se origina debido a que la red de vasos sanguíneos dirigidos a irrigar la retina puede bloquearse y dañarse a causa de la hiperglucemia crónica, lo que conlleva a la pérdida permanente de la vista (4). La relación entre la elevación de la glucosa en

sangre y el aumento de la presión arterial puede generar daño a nivel del sistema nervioso y derivado de ello pueden producirse diversos problemas tales como: afecciones a la digestión, disfunción eréctil, dolor, hormigueo o pérdida de la sensibilidad en miembros periféricos, pie diabético, amputaciones, entre otras. (9,10,11) La pérdida o disminución de la sensibilidad en extremidades inferiores es de gran importancia, ya que si existen lesiones a este nivel, el hecho de que no sean percibidas puede dar paso al desarrollo de infecciones graves, úlceras y pie diabético, dando lugar a cirugías de amputaciones mayores (4).

Derivado de las patologías antes mencionadas es importante que las personas con diabetes mantengan un seguimiento de forma regular de las complicaciones.

1.7 Señalización de la insulina en condición fisiológica normal.

La insulina es una hormona polipeptídica compuesta por 51 aminoácidos que se secreta en las células β de los islotes de Langerhans en el páncreas, su función principal es mantener las concentraciones de la glucemia en rangos normales y ejercer su efecto (captación, metabolización, utilización y almacenamiento de hidratos de carbono, proteínas y lípidos) en los principales tejidos metabólicos como el tejido adiposo, músculo y en hígado, los cuales son regulados por la cascada de señalización intracelular de la insulina (12,13). El receptor de insulina (IR, por sus siglas en inglés) es una glucoproteína compuesta por 2 subunidades α y 2 subunidades β que se unen por puentes disulfuro. El IR pertenece a la familia de receptores para factores de crecimiento con actividad intrínseca de cinasas de Tyr (RTK's), que al ser estimulados por su ligando generan una autofosforilación en residuos de Tyr. Las subunidades α de este receptor se localizan en la parte externa de la membrana plasmática y tienen sitios de unión para la insulina, las subunidades β tienen por su parte una porción en la parte externa de la membrana, una porción transmembranal y una última porción intracelular con un dominio de actividad de cinasa de Tyr. Cuando la insulina se une a su receptor y este se activa, inicia el encendido de cascadas de señalización la cual puede ser mediada por dos vías principales de transducción las cuales son activadas por acción de la insulina: la

primera de ellas es la vía de la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) y la segunda es la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas), ambas se encargan de regular la mayoría de las acciones de la insulina que se asocian a la expresión genética, la regulación del metabolismo energético y a los efectos mitogénicos (13).

1.7.1 Vía de señalización de la PI3K

La vía de la fosfatidilinositol 3 cinasa o PI3K se activa cuando el receptor fosforilado y activo es reconocido e interacciona con el sustrato del receptor de la insulina (IRS) generando su fosforilación. Las proteínas IRS están conformadas por un dominio amino-terminal y por un dominio de unión a fosfotirosinas (PTB) los cuales permiten el acoplamiento de IRS al IR activo. Los IRSs contienen de 8 a 18 sitios potenciales de fosforilación (dependiendo del tipo de IRS, (actualmente se conocen 4 isoformas de IRS-1 a IRS- 4), que, al ser fosforilados por el IR, se convierten en sitios de unión y activación de proteínas con dominios SH2 (homología al dominio 2 de la proteína Src) que actúan como proteínas adaptadoras, como es el caso de PI3K. De las 4 isoformas de IRS existentes, de acuerdo con diversos estudios, es la isoforma 1 (IRS1) la que está involucrada en el transporte de glucosa a las células (13).

La vía de las P13K es el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo de la glucosa y de lípidos, y es la vía de interés para el presente proyecto.

Las PI3Ks, son heterodímeros que constan de una subunidad reguladora (p85 α , p55 α , p50 α , p85 β ó p55^{PIK}) y de una subunidad catalítica (p110 α , p110 β ó p110 δ). Las subunidades reguladoras son proteínas adaptadoras que contienen dos dominios SH2, los cuales permiten su unión a las proteínas IRS-1, dando por resultado la activación de la subunidad catalítica de PI3K. En consecuencia, p110 se encuentra ubicada cerca de la membrana plasmática con acceso a sus sustratos PI4,5-P₂ (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato) y PI4-P (fosfatidilinositol 4-fosfato), los cuales son fosforilados en la posición 3 del inositol, generando así los productos PIP₂ (PI3,4-bisfosfato) y PIP₃ (PI3,4,5- trisfosfato). El PIP₃ actúa como sitio de

unión para cinasas de Ser como PDK1 y Akt o proteína cinasa B (PKB). En el caso específico de la cinasa Akt, posterior a su reclutamiento en la membrana plasmática esta es fosforilada en dos residuos denominados Ser⁴⁷³ y la Thr³⁰⁸. La fosforilación en la Ser⁴⁷³ ocurre en primer lugar por acción del complejo proteico mTor/Rictor, conocido también como PDK2. La anterior fosforilación parece promover una interacción entre el motivo hidrofóbico del carboxilo terminal de Akt y la cinasa PDK1 que la fosforila en la Thr³⁰⁸; ambas fosforilaciones son de suma importancia para que Akt pueda activarse en su totalidad. Existen tres isoformas de Akt (Akt1-3), pero la que parece tener la mayor relevancia en la incorporación de glucosa inducida por insulina es la isoforma 2. La enzima Akt es responsable de regular algunos de los efectos metabólicos de la insulina a través de la fosforilación de sustratos que propagan la respuesta de la insulina, dentro de los que se incluyen a la enzima glucógeno sintasa (GS), a la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3), a la fosfofructocinasa 2 (PFK2), a la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), a la molécula blanco de la rapamicina en mamíferos (mTOR), a la proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (factor de transcripción CREB), a la caspasa 9 y a la proteína antiapoptótica antagonista de Bcl2 (BAD) (13).

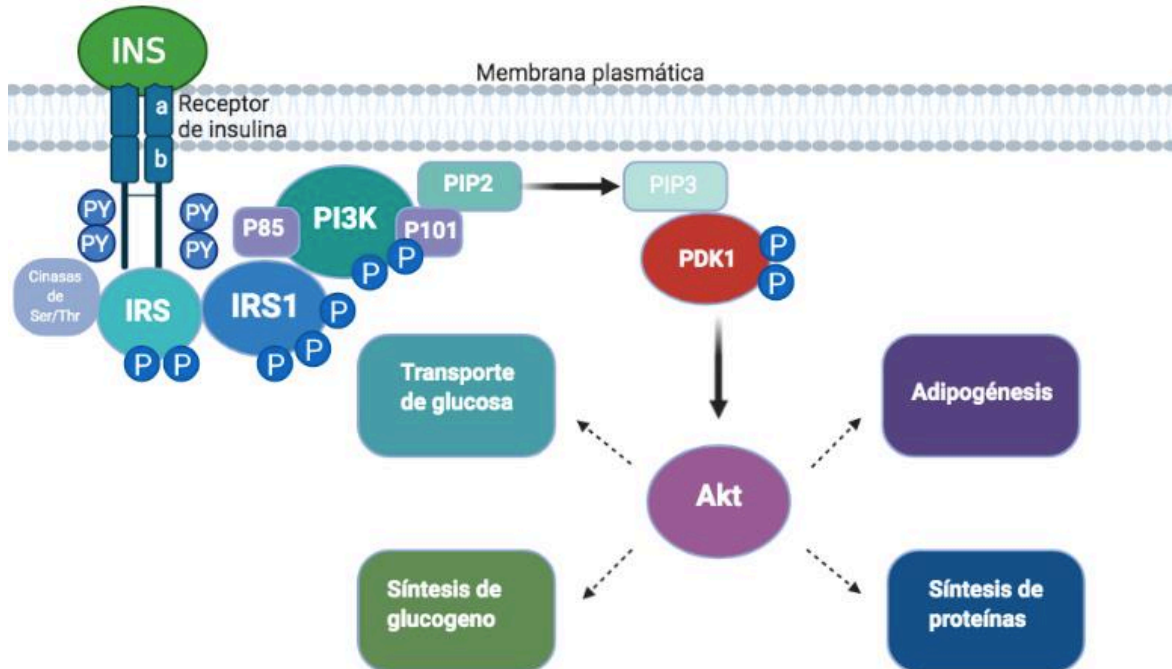


Figura 1. Señalización de insulina en condición fisiológica normal. INS, insulina; PY, tirosina fosforilada; IRS, sustrato receptor de la insulina, P, fosfato; IRS1, sustrato receptor de la insulina isoforma 1; PI3K, fosfatidilinositol 3 cinasa; P85, subunidad reguladora de PI3K; P101, subunidad catalítica de PI3K; PIP2, PI3,4-bisfosfato; PIP3, PI3,4,5- trisfosfato; PDK1, cinasa dependiente de PIP3; Akt, proteína cinasa B. Fuente: elaboración propia con base en artículo de Gutiérrez Rodelo C., Mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina: una actualización (13).

1.8 Tratamiento para DMT2

La diabetes mellitus tipo 2 es una enfermedad crónica, degenerativa e incurable pero controlable. Existen varios objetivos en el tratamiento del diabético tipo 2, pero su esencia radica en el control metabólico y la prevención de las complicaciones.

Los objetivos en el tratamiento de la DMT2 son:

- Mantener al paciente libre de hiperglicemia e hipoglucemias e impedir las complicaciones agudas.
- Evitar la aparición de complicaciones crónicas.
- Que el paciente pueda realizar normalmente sus actividades con la mejor calidad de vida posible (14).

1.8.1 Tipos de tratamiento:

1) Tratamiento preventivo

Son aquellos dedicados a retrasar la aparición de la DMT2 a través de programas bien estructurados para modificar estilos de vida.

2) Tratamiento no farmacológico:

El tratamiento no farmacológico es el único tratamiento integral basado en la modificación del estilo de vida con especial énfasis en la reducción del peso corporal en el paciente con sobrepeso u obesidad, capaz de controlar simultáneamente la mayoría de los problemas metabólicos de los pacientes con diabetes, incluyendo la resistencia a la insulina, la hiperglicemia, la hipertensión arterial y la dislipoproteinemia. Este tipo de tratamiento consiste en 3 pilares fundamentales: educación terapéutica, nutrición adecuada y actividad física

Educación terapéutica continuada

La educación en el paciente con diabetes es un elemento esencial en la atención integral al paciente. Tiene como objetivos principales proporcionar conocimientos y la información necesaria sobre la enfermedad; enseñar y entrenar en la adquisición de habilidades y hábitos pretende crear en los pacientes una real conciencia de su problema, lo que le permitirá lograr cambios en su estilo de vida para una mejor atención en su estado de salud.

Terapia Médica Nutricional

Para esta patología el tratamiento nutricional está dirigido a contribuir a la normalización de los valores de la glucemia durante las 24 horas, y a favorecer la normalización de los valores lipídicos principalmente. Las dietas con alto contenido en fibra, y una proporción adecuada de hidratos de carbono, con alimentos de bajo índice glucémico, son eficaces en el control de la glucemia.

Actividad física

La realización de actividad física de forma regular ha demostrado tener ventajas fisiológicas inmediatas como mejoría de la acción sistémica de la insulina de 2 a 72 h, mejora de la presión sistólica y aumento de la captación de glucosa por el músculo y el hígado. (2)

3) Tratamiento farmacológico

Debe considerarse su empleo en el paciente cuando con la dieta y el ejercicio físico no se consiga un adecuado control de la DMT2, tras un período razonable (4-12 semanas) después del diagnóstico.

Existe gran variedad de medicamentos para el tratamiento de la DMT2 con diversos enfoques; medicamentos que aumentan la secreción de insulina independiente del nivel de glucosa, medicamentos que disminuyen la insulinoresistencia, medicamentos que disminuyen el paso de la glucosa actuando en el tracto digestivo, medicamentos que aumentan la secreción de insulina dependiente de glucosa y suprimen la secreción de glucagón y por último insulinas y análogos de insulina.

4) Tratamientos alternativos

Existe una gran incertidumbre sobre la eficacia y seguridad de tratamientos alternativos o naturales. Actualmente existen muy pocos ensayos aleatorizados y randomizados que evalúen dicha eficacia y seguridad para poder obtener conclusiones fiables. Por lo tanto, datos tan importantes como dosis eficaces, efectos adversos y contraindicaciones no están totalmente dilucidados, algunos ejemplos de tratamientos naturales basados en evidencia son:

Melón amargo o pera balsámica (Momordica charantia)

Debido a que los componentes de su extracto presentan una similitud estructural con la insulina animal, también es conocida como “insulina vegetal”. El mecanismo de acción postulado es mejorar la secreción pancreática de insulina y disminuir la gluconeogénesis hepática, reducir los niveles de glucosa en sangre a largo plazo. Los efectos adversos reportados son que puede provocar abortos, se debe evitar su uso en lactantes, niños y personas alérgicas, puede causar favismo en pacientes con déficit de G6PDH (16,17,18).

Evidencia Natural Standard Evidence-based (NSE) para DMT2: C, evidencia científica no clara (19).

Diente de león (Taraxacum officinale)

Proporciona vitaminas (tiamina, riboflavina), electrolitos (potasio, calcio, magnesio, fósforo), hierro y fibra. La Food and Drug Administration (FDA) tiene aprobado el uso del extracto como aditivo alimentario, efecto hipoglucemiante. Se debe evitar su uso en personas alérgicas, en pacientes con enfermedad biliar y / o con insuficiencia hepática. Los efectos adversos reportados son el aumento de la secreción de ácido gástrico y reducción de la eficacia de antiácidos, anticoagulantes o fármacos antiplaquetarios (16,20).

Evidencia Natural Standard Evidence-based (NSE) para DMT2: C, evidencia científica no clara (19).

Fenogreco (Trigonella foenum-graecum)

El mecanismo de su acción hipoglucemiante es múltiple. Por un lado, se produce un retraso en el vaciado gástrico, además de una disminución en la absorción de carbohidratos y un aumento de sensibilidad a la insulina en los tejidos. Las semillas de fenogreco incrementan la secreción de insulina dependiente de glucosa. Los efectos adversos más frecuentes son trastornos gastrointestinales como dispepsia y distensión abdominal. También presenta un efecto anorexígeno y puede causar hipopotasemia (16,21).

Evidencia Natural Standard Evidence-based (NSE) para DMT2: A, fuerte evidencia científica (19).

Nopal (Opuntia streptacantha)

Contiene gran cantidad de fibra soluble y de pectina lo que puede interferir en la absorción intestinal de la glucosa y a reducir los niveles plasmáticos de colesterol. Produce un aumento de volumen de las heces, por lo que puede provocar diarrea.

Por otro lado puede producir rinitis alérgica, inflamación nasal y asma. A pesar de esto, el nopal es considerado seguro cuando se usa como alimento (16,22).

Evidencia Natural Standard Evidence-based (NSE) para DMT2: C, evidencia científica no clara (19).

Cebolla (Allium cepum)

Los efectos hipoglucemiantes que presenta se atribuyen a que producen una mayor secreción de insulina pancreática y/o mejoran el proceso anabólico de almacenaje de glucógeno a partir de glucosa. La cebolla es segura cuando se ingiere como alimento en una dieta equilibrada, aunque administrada en grandes cantidades puede causar trastornos gastrointestinales (aumento de la acidez estomacal y dispepsia). También ha demostrado reducir los niveles de tensión arterial tanto en pacientes hipertensos como no hipertensos (16,17).

Evidencia Natural Standard Evidence-based (NSE) para DMT2: C, evidencia científica no clara (19).

Inulina (Inula helenium)

Los fructanos de tipo inulina son componentes naturales de varias frutas y verduras comestibles. Las fuentes dietéticas más comunes son el trigo, la cebolla, el plátano, el ajo y el puerro (23). También pueden ser encontrados en una gran variedad de plantas, incluyendo la achicoria, la alcachofa de Jerusalén, los espárragos y las plantas de agave de la especie *agavaceae*. A pesar de sus similitudes, los fructanos son distintos el uno del otro en su origen, la estructura y las características de fermentación (24). Los fructanos de agave poseen una estructura de tipo mixta que les provee la característica de ser ramificados. México ha sido considerado como el centro de origen y diversidad biológica de fructanos del género Agave, debido a la diversidad taxonómica dentro de su territorio. De las 310 especies reportadas, más de 272 se pueden localizar en este país (25).

La inulina puede contribuir de manera significativa a una dieta bien equilibrada al aumentar el contenido de fibra, al mejorar la diversidad de las fuentes de fibra y al afectar específicamente varias funciones gastrointestinales (composición de la microflora intestinal, funciones de la mucosa, actividades endocrinas, minerales, absorción) e incluso funciones sistémicas (especialmente la homeostasis lipídica y las funciones inmunes), así como reduciendo el riesgo de enfermedades diversas (23). También se ha demostrado un aumento el nivel de GLP-1 en suero para suprimir la secreción y producción de IL-6 y la gluconeogénesis hepática, lo que da como resultado una moderación de la tolerancia a la insulina y reducción de la glucemia (26).

Es importante destacar que tanto la inulina como sus derivados fueron aceptados como ingredientes GRAS (generalmente reconocido como seguro, por sus siglas en inglés) por el FDA desde 1992, lo cual indica que pueden usarse en formulaciones alimenticias y proyectos de investigación (27).

Seguridad: Aún faltan estudios en humanos para verificar su eficacia (26).

Tabla 1.Efectos nutricionales y beneficios potenciales para la salud de los fructanos de tipo inulina (23,26).

Beneficios potenciales
Composición y actividades de la microflora intestinal.
Producción de heces
Absorción de Ca y otros minerales.
Producción de péptidos endocrinos gastrointestinales.
Inmunidad y resistencia a las infecciones.
Homeostasis lipídica
Reducción de los riesgos de enfermedad.
Infecciones intestinales
Enfermedades del intestino irritable
Cáncer de colon
Osteoporosis
Obesidad

1.9 Inulina y diabetes

Los efectos de los fructanos de tipo inulina sobre la glucosa y el metabolismo de los lípidos se han revisado en varios artículos. El mecanismo por el cual la inulina se asocia como beneficio en la diabetes esta enfocado en el péptido-1 similar al glucagón (GLP-1). El GLP-1 es una hormona clave liberada por las células L enteroendocrinas en respuesta a la ingestión de nutrientes. Se produce mediante el procesamiento postraducciona específico del tejido de su péptido proglucagón precursor por la prohormona convertasa-1. Promueve la secreción de insulina y la proliferación de células β en el páncreas, controla la síntesis de glucógeno en las células musculares y promueve la saciedad (28). En un estudio clínico realizado en pacientes con dislipidemia y con obesidad o sobrepeso con dosis de 15g de inulina de agave durante 60 días, se encontró una reducción en los niveles de glucosa en ayunas al final de la intervención y es consistente con estudios previos que han sostenido que la suplementación con fructanos de agave induce una mayor concentración de GLP-1 y su precursor, ARNm de proglucagón en los diferentes segmentos colónicos que son capaz de promover la producción de péptidos satietogénicos / incretina en la parte inferior del intestino, con efectos prometedores sobre el metabolismo de la glucosa (29). En un estudio reciente realizado en ratas diabetizadas se encontró que el tratamiento con inulina redujo los niveles de glucosa en sangre en ayunas y alivió la intolerancia a la glucosa y los paneles de lípidos en sangre en ratas diabéticas. Además, el tratamiento con inulina incrementó el GLP-1 y redujo el nivel de IL-6 (26).

La comprensión del mecanismo bioquímico mediante el cual los fructanos de tipo inulina modulan la saciedad o el metabolismo de la glucosa o los lípidos es esencial para proponer consejos nutricionales clave para la diabetes (28).

En el presente estudio nos proponemos analizar los patrones de metilación del DNA en pacientes con DMT2 y la correlación con el consumo de inulina.

1.10 Epigenética en DMT2

La definición de epigenética fue descrita en los años cincuenta por el embriólogo Conrad H. Waddington, quien la describió como el análisis causal del desarrollo que implicaba las interacciones de los genes con el ambiente desarrollando el concepto de paisaje epigenético, el cual hace referencia a las opciones que sigue una célula en un embrión en las claves del desarrollo por acción de factores inductores embrionarios o genes homeóticos. (30)

En la actualidad el término epigenética se describe como el estudio de los mecanismos que regulan la expresión génica sin modificar la secuencia del DNA. Los cambios epigenéticos permiten que los genes se expresen o se silencien en función de condiciones exteriores como factores ambientales, tabaco, alimentación y/o ejercicio. De esta forma nuestras células sufren cambios epigenéticos durante toda la vida. Los principales mecanismos epigenéticos comprenden la metilación del DNA, la modificación de las histonas y la acción de los ARN no codificantes (31,10).

1.10.1 Metilación del DNA

La metilación del DNA es un importante mecanismo epigenético de control transcripcional el cual juega un papel importante en el mantenimiento de las funciones celulares (32). La metilación del DNA se genera por la unión de un grupo metilo (-CH₃) a la posición 5' del anillo de la citosina, transformándose en 5-metilcitosina (5-mC), esta unión se produce específicamente en los dinucleótidos citosina-guanina, los cuales, se agrupan en el genoma constituyendo las llamadas islas CpG. Estas islas son especialmente abundantes en las regiones promotoras de los genes y otras zonas reguladoras. Las enzimas encargadas de la metilación del DNA son las DNA metiltransferasas (DNMTs), enzimas clave en la regulación epigenética las cuales se encargan de catalizar la transferencia del grupo metilo de la S-adenosilmetionina (SAM) producto del ciclo de un carbono de la citosina del DNA (33). Se han descrito tres enzimas principales en el proceso de metilación, DNMT1, DNMT3a, y DNMT3b. Por otra parte, la DNMT2 es considerada como funcional casi exclusivamente sobre el RNA, en conjunto, todas ellas son esenciales

principalmente para establecer los patrones de metilación y para mantenerlos posteriormente en los procesos de replicación (34). La metilación del DNA es un proceso dinámico eficientemente regulado, las secuencias no metiladas pueden ser metiladas y los grupos metilo pueden perderse, por lo que los patrones de metilación de las células somáticas son el resultado de ambas actividades, metilación y desmetilación. (35,31,36). La distribución en el genoma de las islas CpG, en el cual la metilación del DNA ocurre, es asimétrica (32).

1.10.2 Funciones de la metilación

El modelo de metilación, como se conoce actualmente, se basa en dos funciones, metilación *de novo* y de mantenimiento. Por su parte las enzimas DNMT3a y las DNMT3b se encargan de establecer patrones nuevos de metilación, estas dos enzimas están mayormente expresadas en el desarrollo y la diferenciación celular y menormente expresadas en las células diferenciadas (37). Por otra parte, la metilación de mantenimiento se establece por reconocimiento de la hebra hemimetilada durante la replicación del DNA, por medio de las enzimas DNMT1 y de mas interacciones proteicas, este sistema de replicación debe asegurar que se mantenga la fidelidad de dichos patrones (38).

La presencia de niveles de hipometilación global puede resultar en inestabilidad cromosómica y, por otro lado, la hipermetilación ha sido asociada con la inactividad de los genes supresores de tumores (32). La implicación de las alteraciones de los mecanismos epigenéticos en el desarrollo de enfermedades se ha situado en los últimos años como una vía de investigación emergente (31). Los patrones heredables del estado de metilación en el genoma son generalmente estables. Se ha sugerido que los patrones de metilación de las islas CpG pueden servir para compartamentalizar al genoma en zonas transcripcionalmente activas e inactivas (35).

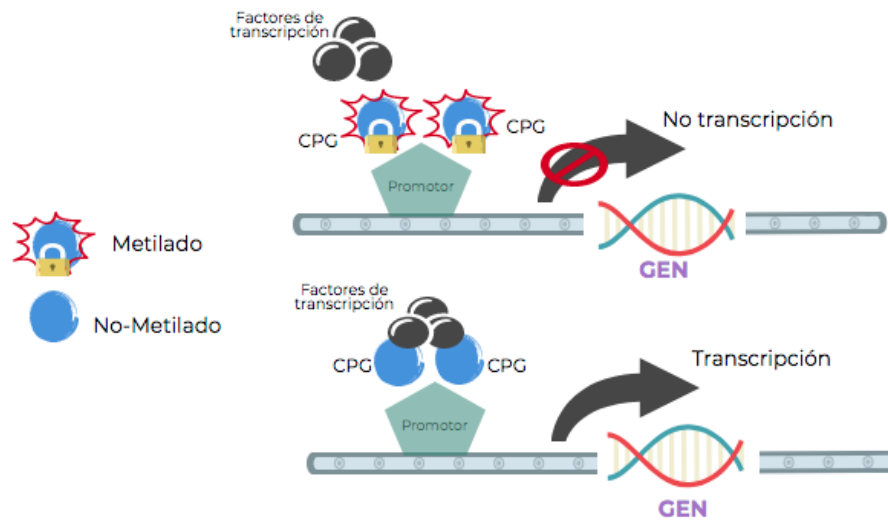


Figura 2. Representación esquemática de la metilación del DNA, la alteración de la transcripción y a la expresión de los genes. CPG, citosina y guanina enlazados por fosfatos. Fuente: elaboración propia con base en artículo de Bansal Amita, Pinney E. Sara, DNA methylation and its role in the pathogenesis of diabetes (39).

1.10.3 Diabetes Mellitus Tipo 2 y metilación

Varios estudios han investigado la relación entre la variación genética y la metilación del DNA con respecto a la DMT2, pero se desconoce si la metilación del DNA es un mediador en la vía de la enfermedad o si está alterada en respuesta al estado de la enfermedad (40). A pesar del aumento exponencial en la investigación epigenética en la última década, el estado actual de las alteraciones de la metilación del DNA en la sangre de sujetos humanos con DMT2 sigue siendo limitado. Se está investigando cada vez más un enfoque de genes candidatos para cuantificar el estado de metilación de sitios CpG específicos dentro de genes asociados con DMT2, diversos hallazgos han relacionado la metilación del DNA con el porcentaje de hemoglobina glucosilada, por otra parte, en las células β y los linfocitos *natural killer* se correlacionaron positivamente con la resistencia a la insulina y un aumento de los niveles de metilación global del DNA en individuos con tolerancia a la glucosa deteriorada o DMT2 sin tratamiento previo en comparación con aquellos con normoglucemia. Es importante señalar que los cambios en la metilación del DNA asociados a la DMT2 en las células β pancreáticas y en los tejidos sensibles a la

insulina (hígado, músculo y tejido adiposo) se han reportado reflejados en la sangre, lo que ofrece la oportunidad de utilizar muestras clínicas alternativas no invasivas para el análisis de metilación (41).

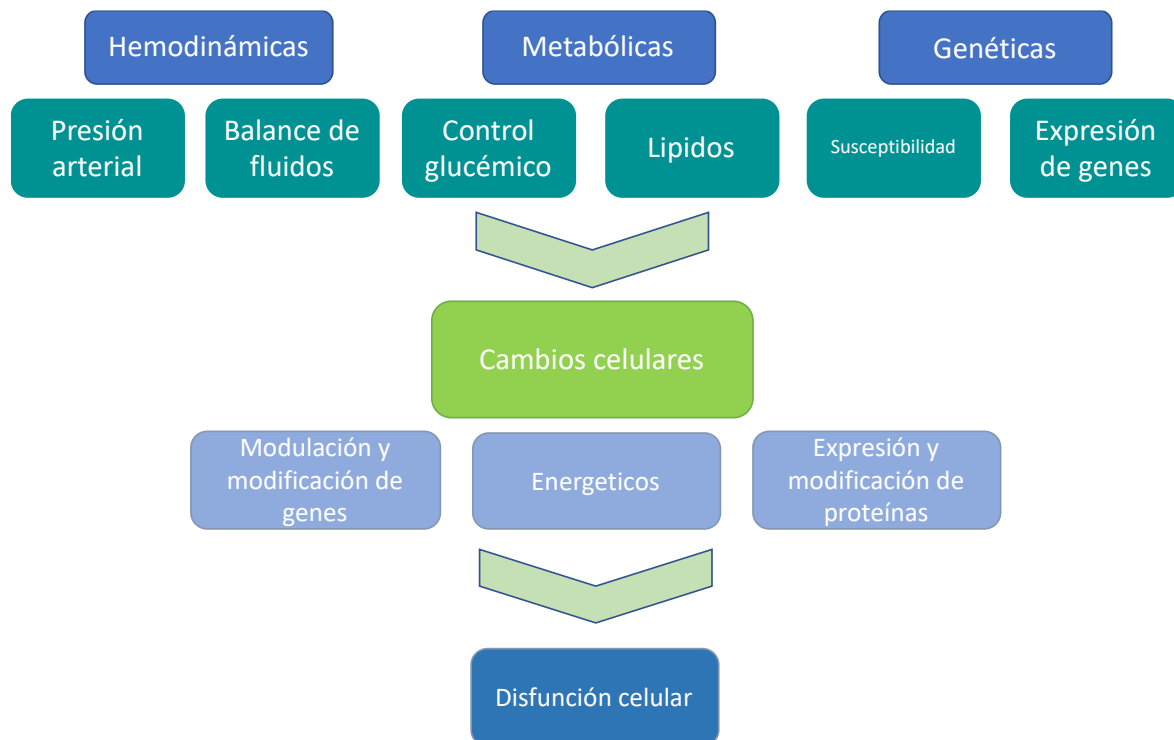


Figura 3. Esquema de las vías que contribuyen a las complicaciones de la DMT2. Fuente: Elaboración propia con base en artículo de Forbes, J. M. y Cooper, M. E., *Mechanisms of diabetic complications* (42).

1.10.4 Cambios de la vía de señalización de los genes *INS*, *IRS1*.

1.10.4.1 *INS*

La insulina es el principal producto sintetizado por las células β pancreáticas. La proteína que se sintetiza en primer lugar a partir del gen de la insulina es la “preproinsulina” (43).

Después de la eliminación del péptido señal precursor, la proinsulina se escinde después de la traducción en tres péptidos: la cadena B y los péptidos de la cadena A, que se unen covalentemente a través de dos enlaces disulfuro para formar insulina y péptido C. La unión de la insulina al receptor de insulina estimula la

captación de glucosa. Se ha identificado una multitud de alelos mutantes con efectos fenotípicos (44). En el año 2007 se describieron mutaciones en heterocigosis en el gen *INS* que se relacionaron con diabetes tipo 1 y tipo 2. Eran mutaciones que originaban un cambio en algunos residuos de la molécula de insulina distorsionando su conformación espacial (43).

1.10.4.2 IRS1

El sustrato 1 del receptor de insulina (*IRS1*) un sustrato de la tirosina quinasa receptora de insulina, es un elemento crítico en las vías de señalización de la insulina y se ha informado que las mutaciones en el gen *IRS1* tienen un papel en la determinación de la susceptibilidad a los rasgos relacionados con la DMT2 (13,45). Las proteínas IRS contienen de 8 a 18 sitios potenciales de fosforilación (en función del tipo de IRS, IRS-1 a IRS-4), que, al ser fosforilados por el IR, se convierten en sitios de activación y unión de proteínas. De las 4 isoformas de IRS que existen, se ha reportado que la isoforma 1 es la que está involucrada en el transporte de glucosa a las células, la unión de las proteínas *IRS-1* a las subunidades reguladoras de las PI3K dan como resultado la activación de la subunidad catalítica de PI3K. Se ha documentado en estudios clínicos, que en tejido adiposo, hígado y músculo de pacientes con obesidad (tejidos importantes que desempeñan un papel importante en el desarrollo de la resistencia a la insulina), la expresión de las proteínas *IRS-1* disminuye aproximadamente al 54%, y este aumento en la degradación de *IRS* puede estar inducido por el aumento en la fosforilación de IRS en residuos de Ser/Thr (12,11).

1.10.5 Metilación *de novo*

Los patrones de metilación en las células somáticas son generalmente estables y heredables, sin embargo, son reprogramados ampliamente en las células germinales y durante el desarrollo embrionario temprano, siendo la metilación *de novo* particularmente activa en estos estadios (35). Cuando una secuencia CpG adquiere este tipo de metilación, esta modificación es estable por consiguiente es heredada como un patrón de metilación clonal (46). La metilación *de novo* también puede ocurrir en las células somáticas adultas, un número significativo de islas CpG

son susceptibles de metilación progresiva en ciertos tejidos durante el proceso de envejecimiento o en los procesos neoplásicos. Sin embargo, la velocidad con que ocurren estos cambios parece ser muy lenta. Recientemente se ha observado que existen patrones de metilación anormales en muchos tipos de cáncer, los cuales conducen principalmente a la inactivación de genes supresores de tumores y a la inestabilidad del genoma (35).

1.10.6 Dieta y epigenética en respuesta a la enfermedad

Los factores epigenéticos pueden ser regulados por factores ambientales dentro de los cuales se incluye la nutrición, y por lo tanto proporcionar un mecanismo por el cual existan cambios de expresión génica que puede conducir tanto a la salud como a la enfermedad. La evidencia actual que une a la dieta con las modificaciones genéticas puede ser reducido a dos escenarios: La “ventana” crítica del desarrollo temprano (durante el desarrollo fetal y/o neonatal) y durante las transiciones dietéticas (durante la etapa adulta ocurrida en un periodo relativamente largo de tiempo) (36). Estudios clínicos sugieren que parte de los efectos de protección en el cáncer están asociados con diversos componentes alimentarios bioactivos relacionados con los patrones de metilación. Factores dietéticos han sido implicados en muchas vías involucradas en la carcinogénesis, incluyendo la apoptosis, control de ciclo celular, inflamación, reparación del DNA. Estos también son procesos regulados por la metilación del DNA y otros factores epigenéticos los cuales constituyen un importante mecanismo en el cual los componentes dietéticos pueden selectivamente activar o inactivar la expresión de diversos genes (32). En la Tabla 2 se muestran diversos estudios en los cuales reportaron asociación de factores dietéticos con la metilación de diversos genes

Tabla 2. Estudios que investigaron la asociación de factores dietéticos y metilación.

Referencia	Nombre del artículo	Sujetos de estudio	Metodología de metilación y del estudio	Principales resultados
Taper et al., 1999 (47)	Influence of Inulin and Oligofructose on Breast Cancer and Tumor Growth.	Ratas Sprague Dawley	El día 45 después de su nacimiento, inyección de carcinógeno. Investigación No.1 G1, dieta basal para ratones. G2, dieta basal para ratones + oligofructosa con dosis aumentada gradualmente. Transplante de tumor Investigación No.2 Dieta basal + 15 g de oligofructosa, inulina o pectina, 7 días. Agua y alimento ad libitum.	La introducción directa de un 15% de oligofructosa, inulina o pectina en la dieta no produjo ningún problema gastrointestinal en ratones, en ratas, indujo diarrea leve y transitoria. El tumor TLT sólido creció significativamente más lentamente en ratones alimentados con una dieta que contenía un 15% de oligofructosa, inulina o pectina en comparación con los alimentados con la dieta basal sola. El efecto anticancerígeno de la oligofructosa, inulina o pectina se puede considerar como antipromotor y / o antiprogresivo.
Rampersaud et al., 2000 (48)	Genomic DNA methylation decreases in response to moderate folate depletion in elderly women	Mujeres postmenopausicas de 60 a 85 años	Ensayo in vitro con enzimas de restricción. Período de agotamiento de folato de 7 semanas (118 ± 25 μ g de folato / d) seguido de un período de repleción de folato de 7 semanas (4 tratamientos = dieta de reducción + folato suplementario). A = 200 μ g de folato / d + ácido fólico B = 415 μ g de folato / d + ácido fólico C = 200 μ g de folato / d D = 415 μ g de folato / d	La incorporación de grupos metilo aumentó significativamente en respuesta a la depleción de folato. No se detectaron cambios significativos en la incorporación de grupos metilo en ningún grupo durante el período de reposición. La respuesta lenta a las dietas de repleción observadas sugiere que la normalización de la metilación del ADN después del agotamiento moderado del folato puede retrasarse en las mujeres mayores.
Fang et al., 2005 (49)	Reversal of Hypermethylation and Reactivation of <i>p16^{INK4a}</i> , <i>RARβ</i> , and <i>MGMT</i> Genes by Genistein and Other Isoflavones from Soy	Invitro. Líneas celulares de carcinoma de células escamosas esofágicas humanas.	Metilación del DNA por bisulfito, MsP, RT-PCR y PCR Tiempo Real. Células KYSE 510 se trataron con 2, 5, 10 o 20 μ mol / L de genisteína o 8.7 μ mol / L de 5-aza-dCyd en medio de cultivo fresco cada dos días, durante 6 días. Las células KYSE 150, LNCaP y PC3 se trataron con 10 o 20 μ mol / l de genisteína o 2 μ mol	La genisteína revirtió la hipermetilación del ADN en células KYSE 510 y 150. La genisteína y las isoflavonas de soja relacionadas reactivan los genes silenciados por la metilación, a través de una inhibición directa de la ADN metiltransferasa.

			/ L 5-aza-dCyd solos o juntos durante 6 días.	
Waterland et al., 2008 (50)	Methyl donor supplementation prevents transgenerational amplification of obesity.	Ratones Amarillo (A _{vy})	Preservación del Alelo A _{vy} a través de tres generaciones y evaluación de los efectos acumulativos sobre el color del pelaje y el peso corporal. Dieta estándar. Dieta suplementada con metilo (ácido fólico extra, vitamina B ₁₂ , betaina y colina).	La suplementación con metilo durante generaciones sucesivas causó hipermetilación persistente en el locus de de A _{vy} . La dieta hipermetilante conlleva a un silenciamiento epigenético progresivo del alelo obesogénico.
Wheizhu et al.,2012 (51)	<i>Trans</i> -Resveratrol Alters Mammary Promoter Hypermethylation in Women at Increased Risk for Breast Cancer.	Mujeres con riesgo de cáncer de mama.	Ms-PCR G1 = Placebo. G2 = <i>cuspidatum</i> con 5 mg de <i>trans</i> -resveratrol G3 = <i>cuspidatum</i> con 50 mg de <i>trans</i> -resveratrol. Muestras recogidas al inicio del estudio y a las 12 semanas de tratamiento	La metilación de <i>RASSF-1</i> α disminuyó con los niveles crecientes de <i>trans</i> -resveratrol sérico de ambas dosis. El cambio en la <i>metilación de RASSF-1</i> α se relacionó directamente con el cambio en PGE ₂ . Disminución en la metilación del gen supresor de tumores <i>RASSF-1</i> α .
Mayuko et al.,2017 (52)	Effects of dried tofu supplementation during interval walking training IWT on the methylation of the NFKB2 gene in the whole blood of older women.	Mujeres adultas 50-70 años	Metilación del DNA por pirosecuenciación PLG = IWT + placebo (n = 16; 108 kcal, 0,2 g de proteína, 5,5 g de grasa y 14,4 g de carbohidratos). DGT = IWT + ingesta de tofu seco (n = 16; 111 kcal , 9.6 g de proteína, 6.0 g de grasa y 4.6 g de carbohidratos). 5 meses.	El grupo DTG mejoró la metilación del gen NFKB2 en 4/6 sitios en la región promotora del gen NFKB2 más que el PLG 2/6 sitios.

2. JUSTIFICACIÓN

La DMT2 se ha mantenido en los últimos años como una enfermedad de gran importancia debido a su alta y creciente prevalencia, a nivel mundial existen aproximadamente 425 millones de personas con DMT2 y en nuestro país se reportan 12 millones de personas, siendo esta enfermedad la principal causa de muerte en México.

Existe actualmente una urgencia de realizar mayores acciones para mejorar los resultados de los tratamientos para la DMT2, los tratamientos empleados para controlar esta enfermedad van desde intervenciones multidisciplinarias, tratamientos farmacológicos y opciones de tratamientos alternativos que tienen como finalidad el control glucémico y la prevención de las complicaciones propias de la enfermedad.

Para las personas que viven con diabetes el impacto inmediato de la enfermedad se presenta en la disminución de la calidad de vida y la muerte prematura si no se realiza un cuidado continuo y un tratamiento adecuado. Los tratamientos alternativos para la diabetes tienen como finalidad coadyuvar junto a los tratamientos farmacológicos para el mantenimiento de los niveles óptimos de glucosa, dentro de los tratamientos alternativos existentes la inulina ha demostrado tener eficacia en la disminución de los niveles de glucosa plasmática en estudios realizados en pacientes con diabetes, obesidad y estudios en animales. Las modificaciones epigenéticas a menudo se consideran como los subproductos de estímulos externos como la alimentación, que pueden influir en la expresión génica relacionados con la fisiopatología de la diabetes. Una de las principales vías de señalización de la insulina es la vía del fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) la cual regula la mayoría de las acciones de la insulina, existen dentro de esta vía 3 genes involucrados principalmente, el gen de la insulina (INS) y el gen del sustrato receptor de la insulina 1 (IRS1)) los cuales han demostrado tener un papel muy importante en el riesgo del desarrollo de la DMT2.

La metilación del DNA se correlaciona con los cambios en la expresión génica, lo que indica una posible diana terapéutica y un área de investigación activa. El desarrollo de un modelo que incorpore cambios genéticos y de metilación del DNA

podría ser útil para el desarrollo de objetivo terapéuticos innovadores para la diabetes.

A través de esta investigación se puede contribuir para determinar si la inulina puede ser utilizada como parte de un esquema de nutrición adecuado para pacientes con DMT2 mediante la determinación y el análisis de los patrones de metilación de los genes *INS* e *IRS1* que modifiquen en el DNA.

3. HIPÓTESIS

Existe una modificación de los niveles de metilación de los genes *INS* e *IRS1* asociado al consumo de inulina y al control metabólico en pacientes con DMT2.

4. OBJETIVOS

a. General

Determinar la relación entre los niveles de metilación de los genes *INS*, *IRS1*, el consumo de inulina y el control metabólico en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

b. Específicos

- 1) Reunir las muestras biológicas y los datos epidemiológicos de una intervención realizada con suplementación con inulina de agave previamente realizada a pacientes con DMT2.
- 2) Determinar los patrones de metilación de los genes *INS* e *IRS1* antes y después de la intervención con inulina.
- 3) Establecer si existe una relación entre los niveles de metilación, el consumo de inulina y el control metabólico de pacientes con DMT2.

5. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

a. Diseño del estudio.

De forma previa al presente proyecto se realizó un estudio longitudinal cuasiexperimental “Evaluación del efecto de inulina sobre inflamación sistémica de bajo grado y estado de nutrición de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 del hospital general de Huitzuco, Guerrero” realizado por el por el M.C.N. Fernando Torres Romero, estudio del cual toma los datos el presente proyecto.

b. Universo de trabajo y muestra

La población de estudio estuvo constituida por 67 pacientes con diagnóstico establecido de DMT2 del hospital general de Huitzuco Guerrero en el año 2018. Los pacientes tenían que cumplir con los siguientes criterios para su inclusión en el estudio: edad comprendida entre 30 y 70 años, diagnóstico previo de DMT2 mínimo de 12 meses, bajo tratamiento farmacológico de por lo menos 6 meses, consumo de fibra menor a 30 gramos, sin enfermedades gastrointestinales ni tiroideas, no embarazadas o en lactancia, sin consumo de prebióticos o probiótico, hipolipemiantes o antibióticos, no fumadores o consumidores de alcohol.

Se realizó una intervención con inulina de agave en los pacientes con DMT2, los pacientes fueron invitados a participar de forma directa a los que se encontraban en el área de consulta externa y por llamada telefónica a pacientes seleccionados de una base de datos por diagnóstico. Los pacientes que aceptaron participar en el protocolo firmaron una carta de consentimiento informado. La intervención se llevó a cabo en un lapso de 8 semanas con un consumo de 10 gramos diarios de inulina de agave de cadena corta. Intervención realizada por el M.C.N. Fernando Torres Romero.

Intervención con Inulina de agave.

La intervención fue llevada a cabo en un lapso de 8 semanas en las cuales para la visita inicial se obtuvo una muestra sanguínea de los pacientes y se realizaron

estudios dentro los cuales se incluyeron: estudios bioquímicos (glucosa central, triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL, ácido úrico), composición corporal (peso, índice de masa corporal (IMC), circunferencia abdominal (CA), % de masa grasa, % de masa muscular, grasa visceral), cuestionario sociodemográfico, cuestionario de adherencia al fármaco de base para la DMT2, cuestionario de actividad física, registro de alimentos y se les brindó a los pacientes sobres de inulina de agave con 10g c/u para 4 semanas de tratamiento. A las 4 semanas se citó nuevamente a los pacientes y se realizaron cuestionarios de adherencia a la inulina y a los fármacos de base para la DMT2 y se les brindó a los pacientes sobres de inulina de agave con 10g c/u para 4 semanas más de tratamiento, al finalizar las 8 semanas de tratamiento se tomó una muestra sanguínea de todos los pacientes y se volvieron a realizar los estudios, análisis y cuestionarios iniciales.

c. Instrumento de investigación

Dentro del proyecto antecesor se utilizaron cuestionarios y entrevistas para la determinación de los datos sociodemográficos, actividad física, registro de alimentos, apego al tratamiento de base para la DMT2 y apego al tratamiento con inulina.

d. Desarrollo del proyecto

Aislamiento de DNA

Para la obtención de una muestra de DNA íntegro y puro se realizó una extracción de la siguiente manera, a partir de una muestra sanguínea de 1.5ml de sangre, extraída antes y después de la intervención con inulina, se realizó la extracción de DNA genómico de leucocitos de sangre periférica usando un procedimiento estándar de separación por salinización, Lahiri And Nurnberger 1991, este método consiste en aislar (separar el ADN de las proteínas y lípidos mediante solventes orgánicos y ciclos de centrifugación) y purificar (realizar lavados con etanol y el remanente se elimina por evaporación para después hidratar el DNA y mantenerlo en solución) las moléculas de DNA basándose en las características fisicoquímicas de la molécula. Una vez aislado el DNA, se prosigue con la cuantificación de ácidos

nucleicos por espectrofotometría y posteriormente se realiza electroforesis en gel de agarosa.

Procedimiento para aislar el DNA.

A partir de 1.5ml de sangre entera se coloca en un tubo de 15ml para centrifuga y se adicionan 12ml de buffer de lisis, posteriormente se mezcla en vortex por 20 minutos. Se centrifuga la muestra a 6,000rpm durante 30 minutos, se decanta el sobrenadante cuidadosamente para no tirar el pellet (material sedimentado). Posteriormente se adicionan 600 µl de buffer de suspensión y 300 µl de perclorato de sodio. La suspensión se mezcla oscilando a temperatura ambiente por 15 minutos y después se incuban a 65°C por 30 minutos. Se adicionan 600 µl de cloroformo frío a -20°C y se mezcla por rotación a temperatura ambiente por 10 minutos, posteriormente se centrifuga la muestra a 5,000rpm durante 20 minutos. Se transfiere la fase acuosa (400 - 600 µl) que contiene DNA a un tubo eppendorf (de centrifuga) de 1.5ml. Se agrega cantidad 1:1 de etanol al 100% a 4°C por último se invierte el tubo varias veces. Se mantienen las muestras a -20° C para su uso posterior.

Procedimiento para purificar el DNA de las muestras extraídas.

Primero se centrifuga la muestra durante 10 minutos a 250rpm, después se decantar el etanol cuidando de no tirar el pellet. Se agregan 500 µl de etano al 75% frí y repiten los primeros pasos 3 veces. Después de la última decantación, dejar secar a temperatura ambiente por 60 minutos con el tubo invertido en una cama de sanitas. Posteriormente juntar todos los pellets de un individuo en un solo tubo eppendorf y se resuspende el DNA en 150 µl de agua inyectable, por último se deja en incubación a 50°C por 20 horas y se mantienen las muestras a -20° C para su uso posterior.

Cuantificación de DNA por espectrofotometría en Nanodrop.

Las muestras de DNA fueron cuantificadas por espectrofotometría UV mediante Nanodrop 1000 Thermo Fisher, para determinar la concentración y pureza del DNA.

Esta técnica nos permite confirmar que contamos con cantidad suficiente de ácidos nucleicos de calidad adecuada antes de llevar a cabo ensayos de PCR. El fundamento de este método se basa en la ley de Beer-Lambert que indica que la concentración de molecular de una solución puede ser calculada según la longitud de onda de luz absorbida por las moléculas disueltas. El DNA absorbe la luz ultravioleta a 260 nm, esto permite estimar su concentración en nanogramos/microlitro (ng/μl) mediante la espectrofotometría utilizando el espectrofotómetro Nanodrop, el cual utiliza un software asociado al equipo que permite la medición de la concentración, pureza y contaminación del DNA por proteínas o sales. La concentración de ácidos nucleicos se realiza a 260 nm, la concentración de proteínas a 280 nm, la estimación de la pureza de DNA se realiza usando la proporción de la absorbancia a 260/280 nm donde la proporción de 1.8 es aceptada como DNA puro, valores menores indican presencia de proteínas. Una segunda valoración de la pureza de ácidos nucleicos es la proporción 260/230, los valores aceptados se encuentran en el rango de 1.8 a 2.2, si la relación es menor indican la presencia de contaminantes como carbohidratos o fenol. Anexo 1.

Tratamiento de DNA con Bisulfito de Sodio.

Una vez que se evaluó el la integridad, concentración y pureza del DNA, se continuó con el tratamiento con bisulfito de sodio con el Kit EZ DNA Methylation KIT (ZIMO) 5001 y 5005, el cual se realizó siguiendo el protocolo del fabricante. Este método es el estándar de oro para el análisis de metilación del DNA y se basa en la conversión química selectiva de las citosinas no metiladas a uracilo en presencia de bisulfito de sodio, no convirtiéndose las bases de 5-metilcitosina, por lo que las citosinas metiladas no cambian. La reacción con bisulfito comprende una etapa de deaminación y una etapa de desulfonación que pueden llevarse a cabo por separado o simultáneamente. El DNA convertido se amplificará con primers específicos para citosinas no metiladas (U-T) y primers específicos para citosinas metiladas (C- G).

Procedimiento para el Kit EZ DNA Methylation KIT (ZIMO) 5001

Se agregan 5 µl de M- Dilution buffer a la muestra de DNA (concentración 400ng) ajustando el volumen total a 50 µl con agua inyectable y se mezcla, se pone a incubar la muestra a 37°C por 15 minutos. Posteriormente se agregan 100 µl del CT Conversion Reagent a cada muestra y mezclar. Centrifugar brevemente. Se incuba la muestra en la oscuridad a 50°C por 12-16 horas posterior a ese tiempo se incuba nuevamente la muestra a 0-4°C por 10 minutos. Se añaden 400 µl de M-Binding buffer a una columna dentro de un tubo de recolección y la muestra de DNA. Mezclar invirtiendo la columna varias veces. Después se centrifuga a máxima velocidad (10,000rpm) por 30 segundos. Desechar el flujo continuo y se adicionan diferentes reactivos, añadir 100 µl de M-Wash buffer a la columna, centrifugar a máxima velocidad (10,000rpm) por 30 segundos. Desechar el flujo continuo. Añadir 200 µl de M-Desulphonation buffer a la columna y dejar reposar a temperatura ambiente (20-30°C) por 15 a 20 minutos. Centrifugar a máxima velocidad (10,000rpm) por 30 segundos. Desechar el flujo continuo. Añadir 200 µl de M-Wash buffer a la columna, centrifugar a máxima velocidad (10,000rpm) por 30 segundos. Desechar el flujo continuo. Añadir otros 200 µl de M-Wash buffer a la columna, centrifugar a máxima velocidad (10,000rpm) por 30 segundos. Desechar el flujo continuo. Colocar la columna en un tubo de microcentrifuga de 1.5ml, añadir 10 µl de M-Elution buffer directamente a la matriz de la columna. Centrifugar a máxima velocidad (10,000rpm) por 30 segundos para eluir el DNA. Se mantienen las muestras en el ultracongelador para su uso posterior.

Determinación de los niveles de metilación de los genes INS, IRS1.

Methylation-specific PCR (MSP)

La determinación de la metilación del promotor de los genes se efectúa por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se realiza una PCR especial, la Methylation-specific PCR (MSP) por medio de la cual se puede estudiar y detectar la metilación del promotor en islas CpG a partir del DNA tratado con bisulfito sódico. La capacidad de MSP para diferenciar la citosina metilada de la no metilada

depende del tratamiento con bisulfito de sodio de DNA que retiene las marcas de metilación de las citosinas junto con la amplificación específica de este DNA modificado utilizando conjuntos de cebadores complementarios solo a los alelos anteriormente metilados o no metilados. Debido a que esta distinción es parte de la amplificación por PCR, se puede lograr una sensibilidad extraordinaria (típicamente a un nivel de detección del 0.1% de los alelos) mientras se mantiene la especificidad. Los resultados se obtienen inmediatamente después de la amplificación por PCR y la electroforesis en gel sin la necesidad de más análisis de restricción o secuenciación.

Son necesarios los primers específicos para una cadena de DNA convertido con bisulfito de sodio obtenidos de la base de datos Genome Browser on Human Dec 2013 y el software Methyl Primer Express v1.0 y las condiciones de la MSP para los genes (tabla 3).

Electroforesis en gel de agarosa.

Se lleva a cabo la electroforesis en gel de agarosa para observar si el DNA obtenido se encuentra íntegro. La electroforesis consiste en la migración de una partícula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico, así, moléculas de DNA de diferente tamaño van a emigrar de forma distinta en una electroforesis en gel de agarosa, permitiendo conocer el tamaño aproximado del fragmento de DNA en estudio, aplicando un marcador de peso molecular con el que las bandas puedan ser comparadas. En este caso en particular, a los geles de agarosa se le añade bromuro de etidio, sustancia que se intercala entre las bases del DNA y emite fluorescencia cuando se ilumina con luz ultravioleta, se visualizará en el gel bandas correspondientes a las muestras de DNA aplicado y el marcador de peso molecular. En este caso se deberá observar una banda estrecha cercana al pozo en que se colocó la mezcla de DNA. Si está fragmentado se observará una banda de más de un cm de ancho o un sendero luminoso en el carril de muestra. El DNA fragmentado dificulta la amplificación de productos de PCR de alto peso molecular y afecta la reproducibilidad de las técnicas.

Las bandas de DNA modificadas con bisulfito fueron analizadas utilizando el programa ImageJ (National Institutes of Health, USA) un programa de procesamiento digital de imágenes para evaluar la presencia y saturación de las bandas en el gel de agarosa. Todas las imágenes obtenidas de cada una de las muestras y para cada uno de los genes fueron cargadas al programa ImageJ para realizar la medición correspondiente a la saturación de cada una de las bandas del estatus metilado y no metilado para cada una de las muestras, las cifras fueron obtenidas por triplicado para obtener una cifra promedio de estas tres mediciones, la cual fue tomada como el resultado final de cada una de las muestras dependiendo el gen y el estatus.

Tabla 3. Secuencia de los primers para *INS*, *IRS-1*.

Gen	PRIMER	Secuencia	Tamaño del amplicon (pb)	Condiciones de MSPCR
<i>INS</i>	Methylated Forward	5'GGAGTTTGGCGTTAGTATAGTAC 3'	126	5 minutos a 95°C, 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 61°C y 60 segundos a 72°C, terminando con una extensión final a 72°C durante 5 minutos.
	Methylated Reverse	5'CACTATTATTTCTAACCTCGACCG 3'		
	Unmethylated Forward	5'GGGGAGTTTGGTGTTAGTATAGTAT 3'		
	Unmethylated Reverse	5' CCACTATTATTTCTAACCTCAACCA 3'		
<i>IRS1</i>	Methylated Forward	5' GAACGTGGTTTCGTAGTAAATC 3'	129	5 minutos a 95°C, 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 61°C y 60 segundos a 72°C, terminando con una extensión final a 72°C durante 5 minutos.
	Methylated Reverse	5' CACGAACGAAAACCGAAAA 3'		
	Unmethylated Forward	5' AAGGAATGTGGTTTTGTAGTAAATT 3'		
	Unmethylated Reverse	5' ACCCACAACAAAAACCAAAAA 3'		

e. Diseño de análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el software Graphpad Prism 8.3.0. y SPSS Statistics versión 25, para graficar los datos con resultados estadísticamente significativos se empleó el programa biorender. Se consideró que la diferencia estadísticamente significativa era para todas las pruebas $p < 0.05$. Se utilizaron frecuencia absoluta y porcentaje de todas las variables seleccionadas para hacer la descripción de la muestra ($n=67$). Los datos obtenidos se sometieron a pruebas de normalidad mediante el método de Shapiro-Wilk, se observó que únicamente los niveles de metilación del gen *INS* siguen una distribución normal de la curva, por lo que se aplicaron pruebas paramétricas y no paramétricas. Se aplicó la prueba t-student para muestras pareadas para las variables dentro de los parámetros de control metabólico con el propósito de determinar diferencias significativas entre la media de los datos antes y después de la intervención, con el propósito de tener un análisis más específico de cada uno de los parámetros de control metabólico incluidos en el estudio, cada uno de ellos se dividió en categorías de acuerdo a clasificaciones ya establecidas por organizaciones especializadas, en caso de no contar con una clasificación ya establecida se decidió que los datos serían clasificados en cuartiles. Con el objetivo de analizar si existía un efecto relacionando la frecuencia absoluta de cada una de las variables de control metabólico clasificadas y la intervención con inulina se realizó la prueba chi-cuadrado. En cuanto a los resultados de los niveles de metilación y no metilación de los genes de estudio (*INS* e *IRS-1*) de la muestra, estos fueron analizados mediante las pruebas t-student para muestras pareadas o la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon dependiendo del resultado previo de normalidad de cada uno de los datos. Por otro lado, para analizar si existía un efecto relacionado con la variable dicotómica sexo y el resultado del nivel de metilación y no metilación se realizaron pruebas de t-student para muestras pareadas, Wilcoxon y chi-cuadrado. Se efectuó la prueba ANOVA de un factor para determinar si las variables, tiempo de evolución de los pacientes desde el diagnóstico de DMT2 dividido en categorías (<5 años, de 5 a 10 años y >10 años) y el resultado de los niveles de metilación y no metilación de los genes del estudio están relacionadas de acuerdo con la media

de los resultados de las categorías, también se utilizó la prueba ANOVA o Kruskal-Wallis, dependiendo del resultado previo de normalidad según el test de Shapiro-Wilk de cada uno de los datos, para analizar cada uno de los indicadores de control metabólico (circunferencia abdominal, masa grasa, grasa abdominal, músculo, glucosa, triglicéridos, colesterol, colesterol LDL y ácido úrico) de acuerdo a sus clasificaciones en categorías y el resultado de los niveles de metilación y no metilación. Este método nos permite realizar un tipo particular de contrastes, una prueba de comparaciones múltiples *post hoc* o comparaciones a *posteriori*, para saber que media difiere de otra dentro de los grupos a comparar, de esta manera estas comparaciones nos permiten controlar la tasa de error al efectuar los contrastes.

Se aplicó la prueba chi-cuadrado al índice de masa corporal, el cual fue estratificado de acuerdo con su clasificación según la organización mundial de la salud, presentando los datos del IMC y los niveles de metilación y no metilación en una tabla de frecuencias para examinar la significación de la asociación de las variables. Por último, para realizar el análisis de los datos de control metabólico divididos en categorías con respecto al cambio en los niveles de metilación y no metilación de los genes antes y después de la intervención con inulina se utilizaron las pruebas t-student para muestras pareadas o la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon dependiendo del resultado previo de normalidad de cada uno de los datos, para poder determinar la diferencia de medias de los resultados de los niveles de metilación y no metilación.

6. RESULTADOS

Sujetos de estudio

La muestra que constituye este estudio tomada del proyecto antecesor, tiene una mayor prevalencia de mujeres con un 65.7% del total de la población. En cuanto a la edad promedio del total de los sujetos es de 54.4 años aproximadamente y refieren diferentes niveles de escolaridad, resaltan con un 26.9% aquellos que tienen estudios universitarios . Referente al tipo de fármacos utilizados para el

manejo de DMT2, observamos que poco más del 50% de los sujetos utilizan metformina y la mayoría son pacientes no insulino dependientes. (Tabla 4)

Tabla 4. Datos descriptivos de la población.

Característica (N=67)	Total	n (%)
Sexo	Hombres	23(34.4%)
	Mujeres	44(65.7%)
Edad (años) media ± DE	54.4±10.2	
Escolaridad		
Sin escolaridad		9 (13.4%)
Primaria		13 (19.4%)
Secundaria		14 (20.9%)
Preparatoria		13 (19.4%)
Universidad		18 (26.9%)
Fármacos usados		
Metformina		34 (50.7%)
Glibenclamida		4 (6.0%)
Insulina		2 (3.0%)
Metformina/Glibenclamida		11 (16.4%)
Metformina/Insulina		15 (22.4%)
Acarbosa		1 (01.5%)
Insulino dependientes		17 (25.3%)
No insulino dependientes		50 (74.6%)

Datos descriptivos de la población. Los datos se expresan en frecuencia y porcentaje. Resultados también presentados en el proyecto de investigación "Evaluación del efecto de la suplementación con inulina en el estado de nutrición de pacientes con diabetes mellitus tipo 2"

Resultados del tiempo de evolución de DMT2 y de los indicadores de control metabólico de la muestra de estudio antes y después de la intervención con inulina.

Para describir el tiempo de evolución de los pacientes desde el momento de su diagnóstico se categorizaron los años de evolución en 3 periodos (<5 años, de 5 a 10 años y >10 años, dividido así por la prognosis de la enfermedad en cuanto al

control metabólico), abarcando el 47.7% aquellos que tienen menos de 5 años con el diagnóstico de DMT2. (Tabla 5).

Dentro de los parámetros de control metabólico y los cambios obtenidos al hacer la comparación de los resultados antes y después de la intervención con inulina de agave, en cuanto a las variables antropométricas, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el peso, IMC y circunferencia abdominal ($p=0.001$, $p<0.001$ y $p=0.001$ respectivamente), observamos que la pérdida de peso al final de la intervención tiene una repercusión importante y significativa en cuanto al IMC el cual se modifica con respecto a la media de la población y de presentar un valor medio de $\bar{x} = 30.4 \pm 4.2$ que lo posiciona en el grado obesidad de clase 1, pasa a tener un valor medio de $\bar{x} = 29.8 \pm 4.6$ lo cual indica sobrepeso de acuerdo a la clasificación propia de la Organización Mundial de la Salud. Con respecto a las variables bioquímicas, fueron reportados los parámetros de control básicos para el manejo de la DMT2. En cuanto a los resultados de los parámetros músculo, glucosa y triglicéridos podemos observar una disminución de sus valores arrojando diferencias estadísticamente significativas ($p=0.020$, $p=0.013$ y $p=0.008$ respectivamente). En el caso particular del resultado de colesterol, esta variable presenta una disminución, la cual, aunque no es estadísticamente significativa, podríamos utilizar el concepto relevancia clínica, debido a que el resultado previo a la intervención $\bar{x}=202.7 \pm 47.9$ se encuentra dentro de la categoría “límite alto” y el resultado posterior a la intervención $\bar{x}=194.5 \pm 47.9$ lo posiciona dentro de la categoría “deseable”, de acuerdo con la Clasificación de la ATP III (53).

Por otro lado, los resultados de las variables masa grasa, grasa abdominal, colesterol LDL y ácido úrico, no mostraron ningún cambio relevante o estadísticamente significativo. (Tabla 5).

Tabla 5. Características clínicas de la población antes y después la suplementación con inulina.

Parámetros	Pre-Inulina Media±DE	Post-inulina Media±DE	p
Años de evolución de la DMT2			

<5 años	32 (47.7%)	N/A	-
5-10 años	12(17.9%)	N/A	-
>10 años	23 (34.3)	N/A	-
Parámetros de control metabólico			
Peso (kg)	73.8±13.6	72.5±14.3	0.001**
IMC (kg/m ²)	30.4±04.2	29.8± 04.6	< 0.001***
Circunferencia abdominal (cm)	100.3±10.1	99.5±10.2	0.001**
Masa grasa (%)	35.2±07.3	35.1±07.6	0.966
Músculo (%)	44.5±09.0	43.9±08.9	0.020*
Grasa abdominal (%)	10.8±03.7	11.1±04.1	0.094
Glucosa (mg/dl)	164.5±84.6	144.7±57.6	0.013*
Triglicéridos (mg/dl)	221.3±196.0	171±101.0	0.008**
Colesterol (mg/dl)	202.7±47.9	194.5±47.9	0.120
C-LDL (mg/dl)	113.6±39.2	115.3±38.9	0.695
Ácido Úrico (mg/dl)	04.9±02.5	04.6±01.4	0.372

*Datos descriptivos de la población. Los datos se expresan en media y desviación estándar. *p= <0.05, **p= <0.01 ***p= <0.001, los análisis se realizaron por la prueba de t-student para muestras pareadas. N/A: No aplica, IMC: Índice de masa corporal, C-LDL: Colesterol LDL.*

Para realizar un análisis más específico de los indicadores de control metabólico, estos fueron divididos en categorías considerando dos situaciones; la primera, para aquellos indicadores que de acuerdo con la literatura existe una clasificación con niveles específicos dictaminados por organizaciones especializadas y aplicables para la población de estudio y segundo, aquellos parámetros en los que no se podía aplicar la primera situación sus datos fueron clasificados en cuartiles.

Comenzando con el indicador Índice de Masa Corporal y la categorización de la Organización Mundial de la Salud, previo a la intervención existe una alta prevalencia de sujetos que se encuentran con el diagnóstico de sobrepeso y obesidad, en cuanto a los resultados posteriores a la intervención se muestra una disminución en aquellos casos de IMC en sobrepeso y un aumento notable de aquellos sujetos que alcanzan un IMC en peso adecuado pasando de 1 a 13 sujetos, se encontró una relación estadísticamente significativa entre el IMC y la intervención con inulina ($p=0.002$). Los parámetros circunferencia abdominal, masa grasa, grasa abdominal, masa muscular y ácido úrico fueron divididos en cuartiles. Referente a la circunferencia abdominal no se muestra una diferencia notable en el antes y después de la intervención ni entre hombres y mujeres. Para los resultados

de masa grasa observamos una disminución de la mediana posterior a la intervención y diferencias entre el porcentaje de masa grasa entre hombre y mujer. En cuanto a la grasa abdominal no se muestra diferencia notable en el antes y después de la intervención con una pequeña diferencia entre hombres y mujeres. Para los resultados de músculo no se observa disminución de la mediana posterior a la intervención, pero si diferencias entre hombre y mujeres. Para el ácido úrico, no se muestra una diferencia notable en el antes y después de la intervención ni entre hombres y mujeres.

Para los parámetros bioquímicos, glucosa, triglicéridos, colesterol y colesterol LDL, se tomó como referencia la clasificación de las guías ALAD y ATP III (54,53) con lo cual, la glucosa en ayunas previo a la intervención presentó una mayor prevalencia de sujetos con hiperglucemia, seguido por normoglucemia y una pequeña proporción de hipoglucemia (52.2%, 43.3% y 1.5% respectivamente), los resultados post intervención indican una disminución de la frecuencia de sujetos con hiperglucemia (43.3%) y un aumento de aquellos sujetos con normoglucemia (50.7%) además de un ligero aumento con un sujeto más en el nivel hipoglucemia sin alcanzar resultados significativos. En cuanto a los resultados de los parámetros triglicéridos y colesterol total se encontró una mayor prevalencia de sujetos dentro de los niveles normal y deseable (47.7% y 50.7%, respectivamente) con un pequeño aumento dentro de estos mismos niveles posterior a la intervención con inulina, pero sin alcanzar la significancia estadística. Por último, los resultados de colesterol LDL presentaron una mayor frecuencia sujetos dentro del nivel limítrofe seguidos de aquellos con nivel óptimo (38 y 23 sujetos, respectivamente) sin cambios significativos posterior a la intervención. (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis de los indicadores de control metabólico de la población dividido en categorías.

	N=67	Niveles	Pre-inulina Frecuencia	(%)	Post- Inulina Frecuencia	(%)	p
Índice de Masa Corporal₁							
Peso adecuado		18.5-24.9 kg/m ²	1	(00.6)	13	(19.4)	0.002
Sobrepeso		25.0-29.9 kg/m ²	34	(50.7)	24	(35.8)	

Obesidad	30.0 - > 40kg/m ²	32	(47.7)	30	(32.8)	
Circunferencia abdominal²						
Total		101		100		N/A
		(94-106.8)		(91.5-105)		
Hombres		101		100		
		(92-107)		(91.5-107)		
Mujeres		101.5		100.5		
		(94-106.6)		(92.1-104.9)		
Masa grasa						
Total		35.4		28.6		N/A
		(30.8-41.1)		(36.7-40.8)		
Hombres		28.2		23.9		
		(23.4-32.4)		(27.7-33.8)		
Mujeres		38.4		38.5		
		(34.9-41.9)		(34.4-43.4)		
Grasa Abdominal						
Total		10.5		10.5		N/A
		(8.0-12.5)		(8.5-13.0)		
Hombres		13.0		14.0		
		(9.0-16.5)		(10.0-17.0)		
Mujeres		10.0		10.0		
		(7.2-11.5)		(7.1-11.3)		
Músculo						
Total		42.0		42.1		N/A
		(38.7-47.8)		(38.5-47.4)		
Hombres		51.8		49.0		
		(46.4-57.3)		(46.5-58.7)		
Mujeres		40.1		39.4		
		(36.5-42.8)		(35.7-42.5)		
Glucosa en ayunas³						
Hipoglucemia	<79 mg/dl	3	(04.5)	4	(06.0)	0.576
Normoglucemia	80-130 mg/dl	29	(43.3)	34	(50.7)	
Hiperoglucemia	>130 mg/dl	35	(52.2)	29	(43.3)	
Triglicéridos³						
Normal	<150mg/dl	32	(47.7)	34	(51.5)	0.778
Levemente elevado	150-199mg/dl	13	(19.4)	12	(18.8)	
Elevado	200-499mg/dl	19	(28.3)	19	(28.7)	
Muy elevado	>500mg/dl	3	(04.4)	1	(01.5)	
Colesterol Totals³						
Deseable	< 200mg/dl	35	(50.7)	40	(59.7)	0.616
Limítrofe alto	200-239mg/dl	24	(35.8)	19	(28.4)	
Alto	≥ 240mg/dl	9	(13.4)	8	(11.9)	
Colesterol LDL³						
Óptimo	<100mg/dl	23	(34.3)	20	(29.8)	0.802
Limítrofe	100-159 mg/dl	38	(56.7)	40	(59.7)	
Elevado	160-189mg/dl	4	(5.9)	6	(08.9)	
Muy elevado	≥ 190mg/dl	2	(2.9)	1	(01.4)	
Ácido úrico						

Total	04.4 (03.5-06.1)	04.4 (03.4-05.6)	N/A
Hombres	03.9 (03.5-05.5)	04.0 (03.5-05.1)	N/A
Mujeres	04.7 (03.4-06.2)	04.5 (03.4-05.7)	N/A

*Evaluación de los cambios del control metabólico por categorías antes y después de la intervención con inulina. Los datos se presentan en frecuencia y porcentaje del total de la muestra. *P= <0.05, los análisis se realizaron por la prueba de Chi². Los datos de circunferencia abdominal, masa grasa, grasa abdominal, masa muscular y ácido úrico se presentan en cuartiles:50(25-75). N/A: No aplica.*

¹Organización mundial de la salud.

²Guías ALAD.

³Clasificación de la ATP III para el Colesterol Total, LDL, y Triglicéridos (mg/dL).

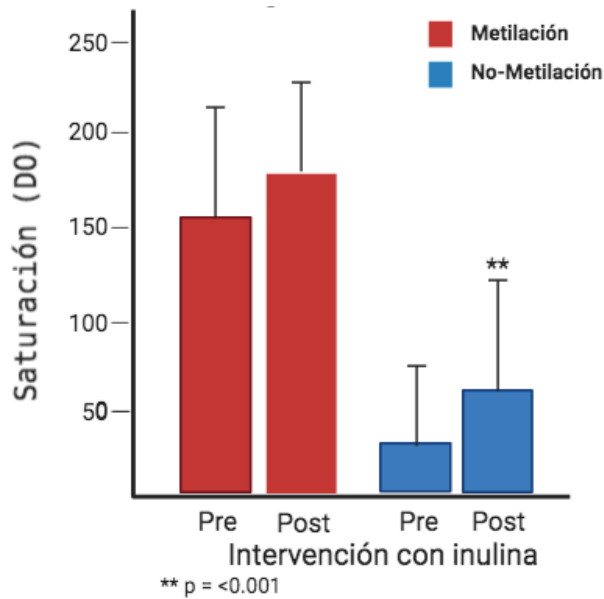
Niveles de metilación de los genes *INS* e *IRS1*.

Del total de sujetos que conforman la muestra de estudio el 100% de ellos presentan estatus de metilación para el gen *INS* sin cambio de frecuencia antes y después de la intervención. Con respecto al estatus de no metilación para el mismo gen, 16 sujetos presentaron este estatus antes de la intervención, cifra que engloba el 10.7% del total de la muestra de estudio con un aumento del 11% post intervención. (Tabla 7). El estatus de metilación, aunque con un aumento de la media en los niveles se presentó sin cambios significativos antes y después de la intervención con inulina a diferencia del aumento observado para el estatus de no metilación que resultó significativamente estadístico ($p=0.001$). (Figura 4). Por otra parte, para el gen *IRS-1* el estatus de metilación se presentó sólo en el 10 y 13% de la muestra de estudio pre y post intervención respectivamente, al contrario que con el gen citado anteriormente, es más prevalente el estatus de no metilación con el 100% observado en el total de los sujetos, sin cambios significativos para ambos estatus. (Tabla 7).

Tabla 7. Niveles de metilación y no metilación de los genes *INS* e *IRS-1*.

Estatus	Pre-inulina		Post-inulina		p		
	n	(%)	Media±DE	n		(%)	
<i>INS</i>							
Metilado	67	(100)	158.3 ± 58.2	67	(100)	169.8±58.6	0.1269
No metilado	16	(10.7)	27.9±56.4	32	(21.4)	56.1±74.6	0.001**
<i>IRS1</i>							
Metilado	15	(10.0)	28.0 ± 60.9	13	(8.7)	29.1±52.0	0.4471
No metilado	67	(100)	194.9 ± 48.7	67	(100)	192.8 ± 39.1	0.2144

Los datos se expresan en media y desviación estándar. **P= 0.001, los análisis se realizaron por las pruebas t-student para muestras pareadas y Wilcoxon.



Los análisis se realizaron por la prueba t-student para muestras pareadas.

Figura 4. Niveles de metilación y no metilación del gen *INS*.

En cuanto al análisis de los niveles de metilación y no-metilación categorizado por sexo, se observó un cambio estadísticamente significativo para el estatus del gen *INS* no metilado y los niveles presentados específicamente en las mujeres con una media de $\bar{x} = 34.0 \pm 63.3$ previo a la intervención con un cambio a $\bar{x} = 63.1 \pm 72.8$ post intervención. ($p=0.007$). (Tabla 8, figura 5). Los niveles de metilación para el gen *IRS-1* no presentaron diferencias significativas por sexo en la población de estudio. (Tabla 8).

Tabla 8. Niveles de metilación y no metilación de los genes *INS* e *IRS-1* categorizado por sexo.

Gen	Sexo	Pre-inulina Media±DE	Post-inulina Media±DE	p
<i>INS</i> Metilado	Hombre	162.2 ± 59.2	177.3±59.5	0.187
	Mujer	156.2±58.2	177.1±59.5	0.2374
<i>INS</i> No metilado	Hombre	16.2 ± 38.6	42.9 ± 77.9	0.0781
	Mujer	34.0 ± 63.3	63.1 ± 72.8	0.007**

<i>IRS1</i>	Hombre	23.5 ± 54.2	18.6 ± 49.5	0.999
Metilado	Mujer	30.4 ± 64.6	23.6 ± 53.7	0.357
<i>IRS1</i>	Hombre	196.7 ± 51.9	190.4 ± 46.1	0.610
No metilado	Mujer	194.0 ± 47.6	194.1 ± 35.4	0.345

Los datos se expresan en media y desviación estándar. **P= 0.01, los análisis se realizaron por las pruebas t-student para muestras pareadas y Wilcoxon.

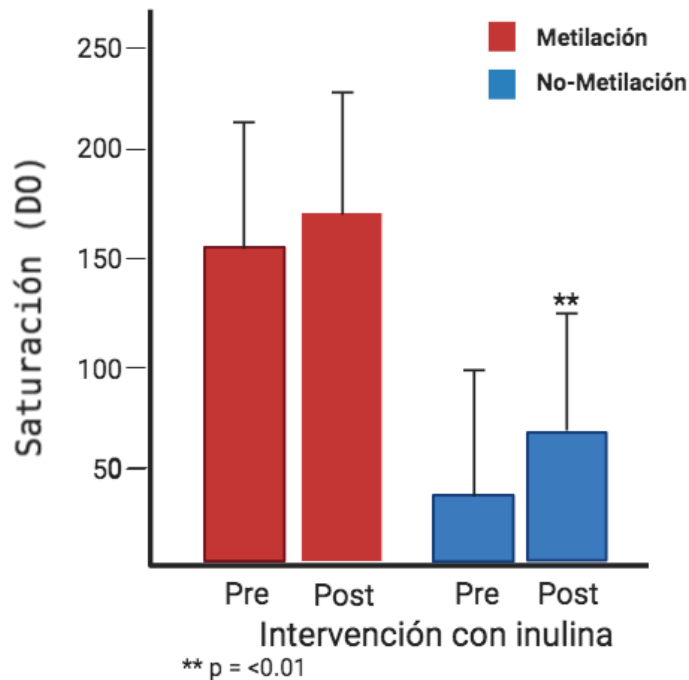


Figura 5. Niveles de metilación y no-metilación del gen *INS*, mujeres.

Los niveles de metilación y no metilación de ambos genes estudiados, *INS* e *IRS-1*, no presentaron relación con la categorización de tiempo de evolución desde el diagnóstico de DMT2 de los sujetos comprendidos en la muestra de estudio. (Tabla 9, tabla 10).

Tabla 9. Niveles de metilación y no-metilación del gen *INS* por tiempo de evolución de DMT2 antes y después de la intervención con inulina.

Intervención	Tiempo de evolución	Metilación.	p	No-Metilación	p
		Media±DE		Media±DE	
Pre-inulina	<5 años	153.4 ± 56.2	0.524	21.7 ± 45.6	0.661
	6-10años	168.1 ± 59.2		29.4 ± 68.8	
	>10años	165.0 ± 59.3		35.9 ± 64.2	
Post-inulina	<5 años	168.6 ± 59.7	0.987	51.5 ± 69.2	0.870
	6-10años	171.5 ± 69.7		64.2± 96.3	
	>10años	170.7 ± 53.7		58.4 ± 72.3	

Los datos se expresan en media y desviación estándar. *P= <0.05, los análisis se realizaron por ANOVA.

Tabla 10. Niveles de metilación y no-metilación del gen *IRS-1* por tiempo de evolución de DMT2 antes y después de la intervención con inulina.

Intervención	Tiempo de evolución	Metilación	p	No-Metilación	p
		Media±DE		Media±DE	
Pre-inulina	<5 años	35.3 ± 70.9	0.578	201.7 ± 48.0	0.364
	6-10años	36.7 ±64.3		195.2 ± 47.3	
	>10años	18.0± 48.3		185.1 ± 52.1	
Post-inulina	<5 años	16.8 ± 46.0	0.426	199.8 ± 29.7	0.218
	6-10años	27.8 ± 67.6		205.0 ± 28.9	
	>10años	28.0 ± 54.5		178.9 ± 48.5	

Los datos se expresan en media y desviación estándar. *P= <0.05, los análisis se realizaron por ANOVA.

Relación de los niveles de metilación y no-metilación de los genes *INS*, *IRS1* y los indicadores de control metabólico.

6.4.1 Gen *INS*.

Para el primer indicador de control metabólico analizado que fue el Índice de Masa Corporal se utilizó la categorización de la OMS que de acuerdo del resultado del índice sugiere la clasificación en bajo peso, peso adecuado y obesidad grado I, II y III, para nuestra población de estudio fueron diagnosticados todos los niveles de clasificación, con excepción del bajo peso, razón por la cual no es presentado en la tabla, la clasificación de obesidad grado I, II y III se englobó en una sola categoría general, obesidad para un mejor manejo en el análisis estadístico. Se observó una significación estadística en la asociación de los resultados obtenidos para la clasificación del IMC y los niveles de metilación antes y después de la intervención. ($p=0.002$). Por el contrario, para el IMC y los niveles de no metilación no se mostró significancia estadística. (Tabla 11).

Tabla 11. Niveles de metilación y No-metilación del gen *INS*, antes y después de la intervención con inulina categorizado por IMC.

IMC	Metilación			No Metilación		
	Pre	Post	p	Pre	Post	p
Peso adecuado	1	13	0.002*	1	6	0.471
Sobrepeso	34	24		6	10	
Obesidad	33	30		10	16	

*Los datos se expresan en frecuencia. * $p < 0.05$, los análisis se realizaron por la prueba Chi². Los valores nulos se modificaron por 1 para realizar la estadística.*

Con respecto a las variables antropométricas y bioquímicas se observó una relación entre los niveles de metilación del gen *INS* y la categorización de la circunferencia abdominal específicamente en mujeres, en masa grasa y glucosa en ayunas en ambos sexos previo a la intervención con inulina de agave (Tabla12, figura 6). Para el análisis con la prueba de ANOVA o Kruskal Wallis y su prueba posterior de múltiples comparaciones, en cuanto a los resultados de circunferencia abdominal dividido en cuartiles y los niveles de metilación previo a la intervención, se encontró

que existe diferencia entre los grupos comprendidos por el cuartil 1 con el cuartil 4 y entre el cuartil 3 con el cuartil 4. Las mujeres con mayor circunferencia abdominal tienen también mayores niveles de metilación del gen *INS* en comparación con las mujeres que presentaron una menor circunferencia ($p=0.018$). Referente a la masa grasa total de acuerdo con los niveles de metilación, existe una diferencia entre el cuartil 1 y el cuartil 2, siendo mayores los niveles de metilación en aquellos sujetos con menor cantidad de porcentaje de masa grasa ($p=0.010$). También se encontró una diferencia significativa dentro de la clasificación de la glucosa en ayunas, específicamente entre los niveles de metilación dentro de las categorías hipoglucemia y normoglucemia, se observan menores niveles de metilación en aquellos sujetos que presentaron hipoglucemia a diferencia de los niveles en normoglucemia. ($p=0.038$). Los demás indicadores no mostraron resultados estadísticamente significativos para los niveles de metilación (Tabla. 12). Por otra parte, para los niveles de no-metilación del gen *INS* con el mismo tipo de análisis, ANOVA y múltiples comparaciones, se encontró que existe una diferencia significativa con los resultados de grasa abdominal ($p=0.210$) específicamente entre el cuartil 3 y el cuartil 4. El resultado del nivel de no-metilación posterior a la intervención es significativamente menor en aquellos sujetos que se encuentran dentro del último cuartil que subdivide esta población en cuanto a grasa abdominal. (Figura 6) Los demás indicadores no mostraron resultados estadísticamente significativos para los niveles de no metilación. (Tabla 13).

Tabla 12. Indicadores de control metabólico y niveles de metilación del gen INS.

Indicador	Niveles N=67	Pre-inulina Media±DE	p	Post-Inulina Media±DE	p
Circunferencia Abdominal					
Total			0.8301		0.4044
C1		150.0±62.8		162.2±57.5	
C2		162.8 ±51.9		168.4±60.0	
C3		155.6 ±55.1		160.3±63.8	
C4		166.1±65.8		191.9±53.8	
Hombres			0.2040		0.7395
C1		178.2±56.1		165.1±54.6	
C2		169.6±58.0		201.4±50.3	
C3		180.4±52.9		168.8±79.8	
C4		112.4±59.9		173.1±58.9	

Mujeres			0.0189*		0.2267
C1		135.7±60.7		160.6±61.3	
C2		161.6±52.8		147.2±55.9	
C3		144.8±48.5		154.7±58.2	
C4		201.0±51.5		193.8±51.4	
Masa Grasa					
C1		180.7±54.7	0.0103*	184.8±55.9	0.3515
C2		132.3±51.8		154.1±62.6	
C3		138.6±55.4		160.4±53.2	
C4		176.5±56.3		180.7±62.1	
Grasa abdominal					
C1		149.8±58.5	0.6250	158.4±61.4	0.1955
C2		153.8±50.1		156.9±51.6	
C3		174.3±15.4		195.1±56.2	
C4		155±63.8		177.6±64.3	
Músculo					
C1		153.8±64.9	0.2105	165.5±61.8	0.0923
C2		162.6±59.9		160.4±58.2	
C3		184.2±49.1		199.9±51.0	
C4		140.6±53.2		152.7±56.8	
Glucosa en ayunas					
Hipoglucemia	<79 mg/dl	83.0±35.6	0.0383*	159.7±57.1	0.794
Normoglucemia	80-130 mg/dl	170.4±55.4		168.0±58.3	
Hiperoglucemia	>130 mg/dl	154.7±57.8		173.4±61.3	
Triglicéridos					
Normal	<150mg/dl	163.8±63.0	0.9719	166.2±64.4	0.9342
Levemente elevado	150-199mg/dl	159.7±68.7		173.6±52.8	
Elevado + Muy elevado	200- >500mg/dl	160.7±63.7		176.7±53.8	
Colesterol total					
Deseable	< 200mg/dl	159.7 ±58.7	0.977	163.9±55.6	0.603
Límitrofe alto	200-239mg/dl	157.6±60.6		178.4±64.2	
Alto	≥ 240mg/dl	155.3±56.3		179.5±64.4	
Colesterol LDL					
Óptimo	<100mg/dl	158.4±54.1	0.9481	154.8±61.5	0.1434
Límitrofe	100-159 mg/dl	157.1±62.3		180.9±53.5	
Elevado + Muy Elevado	160-≥190mg/dl	165.6±54.9		145.8±72.0	
Ácido Úrico					
			0.5813		0.7489
C1		159.1±57.6		162.0±63.3	
C2		141.8±48.8		162.0±64.1	
C3		166.9±57.9		179.3±49.3	
C4		165.8±69.3		176.6±60.1	

Evaluación de los cambios del control metabólico por categorías y el resultado del estatus metilación. Los datos se presentan en medias. *p<0.05 los análisis se realizaron por ANOVA. Diferencia de medias entre grupos. C1: Cuartil 1, C2: Cuartil 2, C3: Cuartil 3, C4: Cuartil 4.

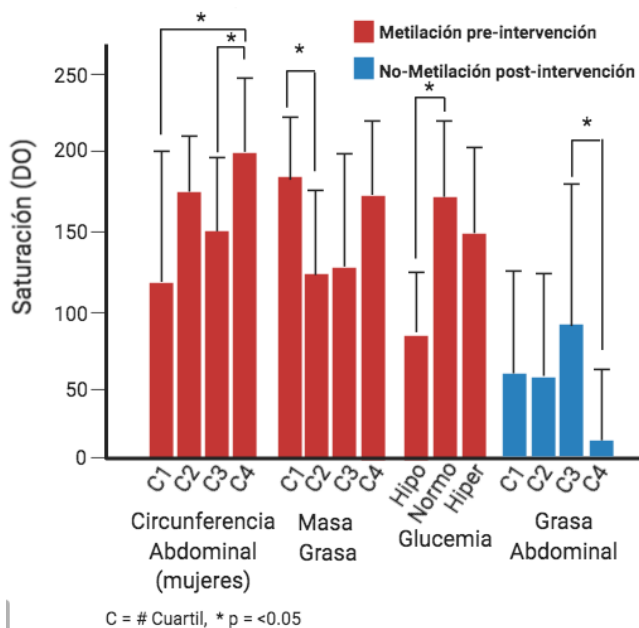


Figura 6. Indicadores de control metabólico y niveles de metilación y no-metilación del gen *INS*.

Tabla 13. Indicadores de control metabólico y niveles de no-metilación del gen *INS*.

Indicador	Niveles	Pre-inulina Media±DE	p	Post-Inulina Media±DE	p
N=67					
Circunferencia Abdominal					
C1		23.0±56.7	0.7931	50.3±73.5	0.8307
C2		26.7±61.7		65.1±83.3	
C3		27.3±50.0		62.0±76.2	
C4		35.2±61.5		45.9±70.4	
Masa Grasa					
C1		29.2±59.4	0.7199	58.9±83.8	0.1328
C2		N/A		23.9±46.9	
C3		23.6±53.6		81.5±82.3	
C4		35.6±61.5		60.5±74.1	
Grasa abdominal					
C1		20.5±59.7	0.0661	59.3±73.4	0.0210*
C2		46.0±65.7		53.2±63.8	
C3		38.2±60.8		93.1±92.6	
C4		4.5±17.5		13.9±50.1	
Músculo					
C1		37.2±72.7	0.1309	52.8±64.2	0.1140
C2		42.8±59.1		79.7±85.9	
C3		12.9±46.6		62.2±79.3	
C4		15.7±39.9		28.3±63.3	
Glucosa en ayunas					
Hipoglucemia	<79 mg/dl	00.0±00.0	0.556	26.4±52.9	0.514

Normoglucemia	80-130 mg/dl	34.0±63.1		49.4±70.7	
Hiperglucemia	>130 mg/dl	25.2±52.0		68.2±81.2	
Triglicéridos					
Normal	<150mg/dl	32.0±59.3	0.678	61.8±76.6	0.1356
Levemente elevado	150- 199mg/dl	33.8±60.6		81.9±86.8	
Elevado + Muy Elevado	200- >500mg/dl	18.8±44.5		32.8±58.7	
Colesterol total					
Deseable	< 200mg/dl	25.2±49.2	0.973	53.7±70.1	0.225
Limítrofe alto	200- 239mg/dl	31.5±66.0		78.0±89.9	
Alto	≥ 240mg/dl	28.3±60.5		16.5±34.3	
Colesterol LDL					
Óptimo	<100mg/dl	08.7±24.0	0.1765	45.6±51.5	0.8849
Limitrofe	100-159 mg/dl	39.3±65.6		63.4±85.0	
Elevado + Muy Elevado	160 - ≥ 190mg/dl	28.7±70.3		42.5±64.7	
Ácido Úrico			0.5751		0.3409
C1		18.7±46.8		54.6±68.2	
C2		13.1±29.3		81.5±97.7	
C3		37.8±66.6		62.2±72.2	
C4		42.9±72.9		24.3±44.1	

*Evaluación de los cambios del control metabólico por categorías y el resultado del estatus No-metilación. Los datos se presentan en media y DE. *p<0.05. Los análisis se realizaron por Kruskal Wallis. N/A: No Aplica, C1: Cuartil 1, C2: Cuartil 2, C3: Cuartil 3, C4: Cuartil 4.*

Referente a los indicadores de control metabólico dividido en categorías con respecto al cambio en los resultados de los niveles de metilación previo y posterior a la intervención con inulina, para las variables antropométricas no se encontraron cambios significativos, por otra parte, con respecto los datos bioquímicos, únicamente para el indicador colesterol LDL, los valores indican una diferencia de medias significativa específicamente en la categoría limítrofe en la que hubo un aumento en el nivel de metilación de $\bar{x}=157.1\pm62.3$ a 180.9 ± 53.5 posterior a la intervención con inulina. ($p=0.036$). (Figura 7, tabla 14). Por otro lado, para los resultados de los niveles de no-metilación y el cambio obtenido antes y después de la intervención con inulina, en cuanto a las variables antropométricas, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en circunferencia abdominal, masa grasa total y grasa abdominal (Figura 8, tabla 15). Para el parámetro circunferencia abdominal la media del nivel de no-metilación tuvo un

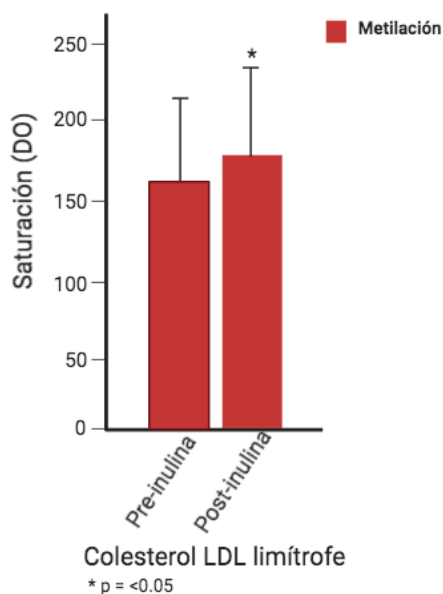
aumento de poco más del doble del nivel inicial, cambiando de $\bar{x}=27.3\pm 50.0$ a 62.0 ± 76.2 posterior a la intervención específicamente en el cuartil 3. ($p=0.003$). Para los cambios en la masa grasa total se observó un aumento de 3.4 veces más el nivel de no-metilación inicial de $\bar{x}=23.6\pm 53.6$ llegando a $\bar{x}=81.5\pm 82.3$, al igual que en el parámetro anterior, dentro del cuartil 3. ($p=0.006$). Por último, dentro de las variables antropométricas, se encontró un cambio en grasa abdominal dentro del cuartil 1, con un aumento, prácticamente de tres veces más, de la no-metilación pasando de $\bar{x}=20.5\pm 59.7$ a 59.3 ± 73.4 posterior a la intervención. En cuanto a los resultados de los indicadores bioquímicos y los cambios de la no-metilación se observaron cambios estadísticamente significativos dentro de las variables colesterol total, colesterol LDL y ácido úrico. Para el indicador colesterol total la diferencia de medias se encontró dentro de las categorías deseable y límite alto, para la categoría deseable se observó un cambio del doble de la no-metilación inicial $\bar{x}=25.2\pm 49.2$ a 53.7 ± 70.1 . ($p=0.048$). Para la categoría límite alto el cambio observado fue del doble con un nivel de no-metilación inicial de $\bar{x}=31.5\pm 06.0$ a $\bar{x}=78.0\pm 89.9$. ($p=0.009$). En cuanto a los resultados para el indicador colesterol LDL el cambio observado se dio en la categoría óptimo con un aumento de la media de $\bar{x}=08.7\pm 24.0$ a $\bar{x}=45.6\pm 51.5$. ($p=0.034$). Para el último indicador bioquímico con cambios significativos, el ácido úrico, mostró un cambio dentro del cuartil 2, con un aumento de la no-metilación de $\bar{x}=13.1\pm 29.3$ a $\bar{x}=81.5\pm 97.7$ ($p=0.003$). Cabe destacar que para los resultados de triglicéridos en la categoría levemente elevado se observó un aumento de la no-metilación al doble del resultado del nivel previo a la intervención, sin alcanzar significancia estadística siendo el valor de la p marginal ($p=0.074$). (Tabla 15).

Tabla 14. Indicadores de control metabólico y niveles de metilación del gen INS antes y después de la intervención con inulina.

Indicador	Niveles N=67	Pre-inulina Media±DE	Post-Inulina Media±DE	p
Índice de Masa Corporal				
Peso adecuado	18.5-24.9 kg/m ²	N/A	N/A	N/A
Sobrepeso	25.0-29.9 kg/m ²	156.8±57.8	158.7±60.0	0.6975

Obesidad	30.0 - >40 kg/m ²	164.0±57.6	176.3±56.3	0.5003
Circunferencia abdominal				
C1		150.0±62.8	162.2±57.5	0.4804
C2		162.8±51.9	168.4±60.0	0.2881
C3		155.6±55.1	160.3±63.8	0.6978
C4		166.1±65.8	191.9±53.8	0.0970
Masa grasa				
C1		180.7±54.7	184.8±55.9	0.8474
C2		132.2±51.8	154.1±62.6	0.2212
C3		138.6±55.4	160.4±53.2	0.1240
C4		176.5±56.3	180.7±62.1	0.7748
Grasa abdominal				
C1		149.8±58.5	158.4±61.4	0.6533
C2		153.8±50.1	156.9±51.6	0.9628
C3		174.3±15.4	195.1±56.2	0.2602
C4		155.0±63.8	177.6±64.3	0.4738
Masa muscular				
C1		153.8±64.9	165.5±61.8	0.5591
C2		162.6±59.9	160.4±58.2	0.7149
C3		184.2±49.1	199.9±51.0	0.4164
C4		140.6±53.2	152.7±56.8	0.6026
Glucosa en ayunas				
Hipoglucemia	<79 mg/dl	83.0±35.6	159.7±57.1	0.0931
Normoglucemia	80-130 mg/dl	170.4±55.4	168.0±58.3	0.8801
Hiperglucemia	>130 mg/dl	154.7±57.8	173.4±61.3	0.4064
Triglicéridos				
Normal	<150mg/dl	163.8±63.0	166.2±64.4	0.9098
Levemente elevado	150-199mg/dl	141.3±11.9	173.6±52.8	0.3507
Elevado + muy elevado	200->500mg/dl	160.7±63.7	176.7±53.8	0.4459
Colesterol total				
Deseable	< 200mg/dl	159.7±58.7	163.9±55.6	0.5092
Límitrofe alto	200-239mg/dl	157.6±60.6	178.4±64.2	0.2032
Alto	≥ 240mg/dl	155.3±56.3	179.5±64.4	0.4816
Colesterol LDL				
Óptimo	<100mg/dl	158.4±54.1	154.8±61.5	0.4831
Límitrofe	100-159 mg/dl	157.1±62.3	180.9±53.5	0.0362
Elevado + Muy Elevado	160- ≥ 190mg/dl	156.6±54.9	145.8±72.0	0.7169
Ácido Úrico				
C1		159.1±57.6	162.0±63.3	0.8727
C2		141.8±48.8	162.0±64.1	0.2304
C3		166.9±57.9	179.3±49.3	0.5371
C4		165.8±69.3	176.6±60.1	0.5273

Los datos se expresan en medias. *p= <0.05, los análisis se realizaron por la prueba de t-student para muestras pareadas.
N/A: No aplica, C1: Cuartil 1, C2: Cuartil 2, C3: Cuartil 3, C4: Cuartil 4.



Los análisis se realizaron por la prueba de t-student para muestras pareadas.

Figura 7. Colesterol LDL límite y niveles de metilación del gen INS antes y después de la intervención con inulina.

Tabla 15. Indicadores de control metabólico y niveles de no-metilación del gen INS antes y después de la intervención con inulina.

Indicador	Niveles N=67	Pre-inulina Media±DE	Post-Inulina Media±DE	p
Índice de Masa Corporal				
Peso adecuado	18.5-24.9 kg/m ²	N/A	N/A	N/A
Sobrepeso	25.0-29.9 kg/m ²	25.3±59.2	44.5±69.9	0.1909
Obesidad	30.0- > 40 kg/m ²	30.3±55.1	61.5±77.1	0.2101
Circunferencia abdominal				
C1		23.0±56.7	50.3±73.5	0.1094
C2		26.7±61.7	65.1±83.3	0.1016
C3		27.3±50.0	62.0±76.2	0.0039**
C4		35.2±61.5	45.9±70.4	0.4961
Masa grasa				
C1		29.2±59.4	58.9±83.8	0.3750
C2		0.0±0.0	23.9±46.9	0.0625
C3		23.6±53.6	81.5±82.3	0.0068**
C4		35.6±61.5	60.5±74.1	0.2324
Grasa abdominal				
C1		20.5±59.7	59.3±73.4	0.0117*
C2		46.0±65.7	53.2±63.8	0.5693
C3		38.2±60.8	93.1±92.6	0.1294
C4		4.5±17.5	13.9±50.1	0.9999
Masa muscular				
C1		37.2±72.7	52.8±64.2	0.4648

C2		42.8±59.1	53.2±63.8	0.2769
C3		12.9±46.6	93.1±92.6	0.0781
C4		15.7±39.9	13.9±50.1	0.6250
Glucosa en ayunas				
Hipoglucemia	<79 mg/dl	0.0±0.0	26.4±52.9	0.9220
Normoglucemia	80-130 mg/dl	34.0±63.1	49.4±70.7	0.4683
Hiperglucemia	>130 mg/dl	25.2±52.0	68.2±81.2	0.0626
Triglicéridos				
Normal	<150mg/dl	32.0±59.3	62.8±76.6	0.1511
Levemente elevado	150-199mg/dl	33.8±60.6	81.9±86.8	0.0742
Elevado + muy elevado	200->500mg/dl	18.8±44.5	32.8±58.7	0.2500
Colesterol total				
Deseable	< 200mg/dl	25.2±49.2	53.7±70.1	0.0484*
Limítrofe alto	200-239mg/dl	31.5±06.0	78.0±89.9	0.0098**
Alto	≥ 240mg/dl	28.3±60.5	16.5±34.3	0.8750
Colesterol LDL				
Óptimo	<100mg/dl	08.7±24.0	45.6±51.5	0.0342*
Limítrofe	100-159 mg/dl	39.3±65.6	63.4±85.0	0.1578
Elevado + Muy Elevado	160-189mg/dl	28.7±70.3	42.5±64.7	0.9999
Ácido úrico				
C1		18.7±46.8	54.6±68.2	0.1602
C2		13.1±29.3	81.5±97.7	0.0039**
C3		37.8±66.6	62.2±72.2	0.2334
C4		42.9±72.9	24.3±44.1	0.4961

Los datos se expresan en medias. *p= <0.05, **p= <0.01, los análisis se realizaron por la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. N/A: No aplica, C1: Cuartil 1, C2: Cuartil 2, C3: Cuartil 3, C4: Cuartil 4.

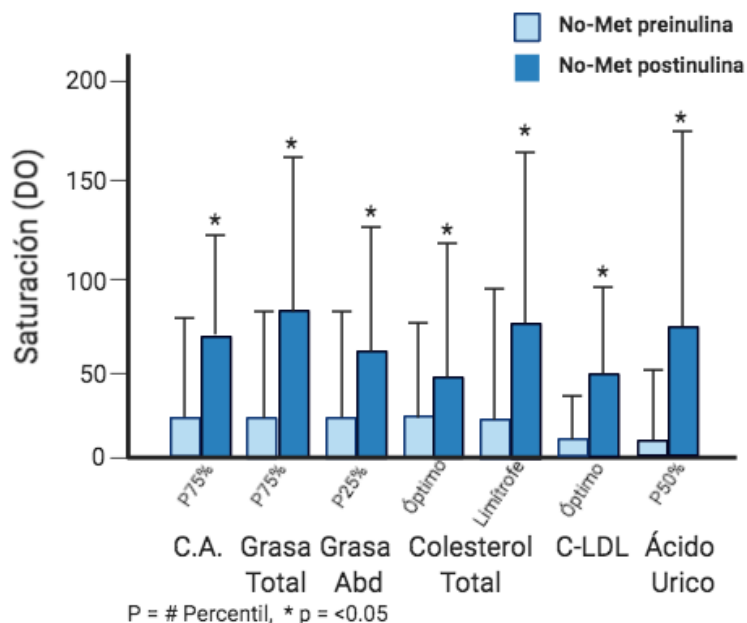


Figura 8. Indicadores de control metabólico y niveles de no metilación del gen *INS* antes y después de la intervención con inulina.

6.4.2 Gen IRS-1.

Comenzando con la categorización del Índice de Masa Corporal para este gen, podemos observar una mayor prevalencia de datos dentro de las categorías de la no-metilación derivado de los resultados en los niveles de metilación y no-metilación obtenidos que han sido detallados anteriormente. Para el análisis realizado para el IMC no se observó una significación estadística en la asociación de los resultados obtenidos para la clasificación del IMC y los niveles de metilación. Por el contrario, el IMC mostró una asociación con la no metilación y los resultados obtenidos antes y después de la intervención. ($p=0.002$). (Tabla 16).

Tabla 16. Niveles de metilación y no-metilación del gen IRS-1, antes y después de la intervención con inulina categorizado por IMC.

IMC	Metilación			No Metilación		
	Pre-inulina	Post-inulina	p	Pre-inulina	Post-inulina	p
Peso adecuado	1	1	0.984	1	13	0.002*

Sobrepeso	6	5	34	24
Obesidad	9	7	33	30

Los datos se expresan en frecuencia. * $p < 0.05$, los análisis se realizaron por la prueba χ^2 . Los valores nulos se modificaron por 1 para realizar la estadística. N/A: No aplica, IMC: Índice de masa corporal.

En cuanto a los niveles de metilación y el análisis realizado para determinar si existía relación con la categorización de los indicadores de control metabólico, tanto antropométricos como bioquímicos, no mostraron relación alguna en la muestra estudiada. Del mismo modo ocurrió sin resultados significativos para los niveles de no-metilación. (Tabla 17, tabla 18).

Tabla 17. Indicadores de control metabólico y niveles de metilación del gen IRS-1.

Indicador N=67	Niveles	Pre-inulina Media±DE	p	Post-Inulina Media±DE	p
Circunferencia Abdominal					
C1		40.1±66.1	0.779	31.3±60.8	0.802
C2		19.9 ±54.5		21.5±66.4	
C3		30.6±63.6		12.6±30.8	
C4		22.2±63.1		23.9±43.62	
Masa Grasa					
C1		18.6±36.7	0.913	19.3±53.4	0.739
C2		30.5±64.8		24.7±57.9	
C3		31.9±72.2		12.1±34.3	
C4		31.2±68.6		32.0±61.4	
Grasa abdominal					
C1		32.1±63.4	0.943	21.3±58.1	0.603
C2		29.1±57.7		31.8±64.0	
C3		20.1±58.4		18.9±40.0	
C4		30.8±69.2		7.6±27.5	
Músculo					
C1		19.7±48.7	0.712	24.4±57.5	0.948
C2		42.1±73.0		26.7±57.7	
C3		22.7±58.7		18.1±40.3	
C4		26.0±62.3		17.9±54.8	
Glucosa en ayunas					
Hipoglucemia	<79 mg/dl	74.4±129.0	0.645	26.5±53.1	0.538
Normoglucemia	80-130 mg/dl	27.7±66.3		31.1±64.4	
Hiperglucemia	>130 mg/dl	24.3±49.0		10.4±30.6	
Triglicéridos					
Normal	<150mg/dl	19.1±53.8	0.386	22.5±51.1	0.879
Levemente elevado	150-199mg/dl	32.6±63.5		10.3±25.7	
Elevado + Muy elevado	200- >500mg/dl	38.2±71.3		18.4±49.9	

Colesterol total					
Deseable	< 200mg/dl	25.2 ±57.7	0.906	20.4±48.8	0.804
Limítrofe alto	200-239mg/dl	29.3±67.0		20.0±52.3	
Alto	≥ 240mg/dl	35.1±62.0		33.4±70.7	
Colesterol LDL					
Óptimo	<100mg/dl	19.2±48.0	0.698	22.5±57.9	0.665
Limítrofe	100-159 mg/dl	33.0±66.7		18.8±45.2	
Elevado + Muy Elevado	160-≥190mg/dl	29.8±73.1		38.2±75.0	
Ácido Úrico			0.884		0.599
C1		24.7±58.0		23.0±56.9	
C2		30.6±63.7		35.0±71.3	
C3		20.3±49.0		12.6±35.6	
C4		36.7±75.0		15.8±34.5	

*Evaluación de los cambios del control metabólico por categorías y el resultado del estatus metilación. Los datos se presentan en medias y desviación estándar. *p=<0.05 los análisis se realizaron por Kruskal-Wallis. C1: Cuartil 1, C2: Cuartil 2, C3: Cuartil 3, C4: Cuartil 4.*

Tabla 18. Indicadores de control metabólico y niveles de no-metilación del gen *IRS1*.

Indicador	Niveles N=67	Pre- inulina Media±DE		Post-Inulina Media±DE	
Circunferencia Abdominal					
C1		201.0±40.2	0.255	195.0±33.0	0.408
C2		175.0±60.4		180.5±53.7	
C3		202.1±38.2		198.0±24.6	
C4		203.3±49.8		200.6±34.5	
Masa Grasa					
C1		201.2±50.4	0.184	190.0±45.5	0.462
C2		197.0±40.7		192.9±38.8	
C3		173.5±57.0		183.7±45.6	
C4		208.5±41.6		205.2±20.8	
Grasa abdominal					
C1		189.8±54.2	0.269	196.4±34.3	0.884
C2		178.5±51.2		187.8±43.8	
C3		208.4±43.5		193.6±41.5	
C4		204.1±42.4		197.0±35.7	
Músculo					
C1		191.7±46.6	0.361	193.4±41.5	0.257
C2		190.8±46.6		192.7±38.1	
C3		212.6±44.2		205.9±25.6	
C4		183.9±56.6		178.4±47.4	
Glucosa en ayunas					
Hipoglucemia	<79 mg/dl	210.0±26.6	0.300	149.2±75.0	0.066
Normoglucemia	80-130 mg/dl	204.0±51.9		197.0±34.8	

Hiperglucemia	>130 mg/dl	186.1±46.6		193.8±35.8	
Triglicéridos					
Normal	<150mg/dl	164.1±83.3	0.303	189.7±61.2	0.568
Levemente elevado	150-199mg/dl	188.9±52.0		185.4±35.8	
Elevado + Muy Elevado	200 - >500mg/dl	200.3±43.5		197.6±35.3	
Colesterol total					
Deseable	< 200mg/dl	195.5±55.1	0.597	189.3±44.3	0.565
Limítrofe alto	200-239mg/dl	199.5±41.4		195.0±30.0	
Alto	≥ 240mg/dl	180.1±42.3		205.0±30.0	
Colesterol LDL					
Óptimo	<100mg/dl	192.0±59.5	0.537	183.6±53.8	0.448
Limítrofe	100-159 mg/dl	199.5±41.7		197.4±31.7	
Elevado + Muy Elevado	160 - ≥ 190mg/dl	176.5±47.4		190.5±32.0	
Ácido Úrico					
			0.241		0.168
C1		173.5±61.1		194.2±34.4	
C2		197.7±43.1		177.2±47.9	
C3		203.3±42.1		206.7±25.6	
C4		204.1±45.2		194.1±41.6	

*Evaluación de los cambios del control metabólico por categorías y el resultado del estatus No-metilación. Los datos se presentan en media y desviación estandar. *p<0.05. Los análisis se realizaron por Kruskal Wallis. C1: Cuartil 1, C2: Cuartil 2, C3: Cuartil 3, C4: Cuartil 4.*

Referente a los indicadores de control metabólico dividido en categorías con respecto al cambio obtenido en los resultados de los niveles de metilación y no-metilación previo y posterior a la intervención con inulina no se observó ningún resultado significativo (tabla 19, 20).

Tabla 19. Indicadores de control metabólico y niveles de metilación del gen IRS-1 antes y después de la intervención con inulina.

Indicador	Niveles	Pre-inulina	Post-Inulina	p
N=67				
Índice de Masa Corporal				
Peso adecuado	18.5-24.9 kg/m ²	N/A	N/A	N/A
Sobrepeso	25.0-29.9 kg/m ²	20.5±51.2	26.1±60.7	0.8203
Obesidad	30.0-> 40 kg/m ²	30.8±62.5	26.6±53.7	0.8501
Circunferencia abdominal				
C1		35.7±63.5	25.7±56.1	0.2188
C2		22.4±57.5	25.3±71.6	0.7500
C3		30.6±63.6	11.2±29.4	0.3125
C4		22.3±63.1	23.9±43.6	0.8125
Masa grasa				
C1		18.6±36.7	20.5±54.9	0.6250

C2		30.5±64.8	24.7±57.9	0.9999
C3		31.9±72.2	12.1±34.3	0.5625
C4		31.2±68.6	32.0±61.4	0.9375
Grasa abdominal				
C1		32.1±63.4	22.1±54.9	0.6875
C2		29.1±57.7	32.7±67.2	0.8438
C3		20.1±58.4	18.9±40.0	0.8125
C4		30.8±69.2	7.6±27.5	0.2500
Masa muscular				
C1		20.8±47.4	22.9±56.0	0.9999
C2		42.4±75.3	28.3±59.0	0.6406
C3		22.7±58.7	18.1±40.3	0.8438
C4		26.0±62.3	23.2±57.4	0.999
Glucosa en ayunas				
Hipoglucemia	<79 mg/dl	74.4±129.0	26.5±53.1	0.9999
Normoglucemia	80-130 mg/dl	27.7±66.3	31.1±64.4	0.7002
Hiperoglucemia	>130 mg/dl	24.3±49.0	10.4±30.6	0.2686
Triglicéridos				
Normal	<150mg/dl	19.2±53.8	19.9±49.6	0.7646
Levemente elevado	150-199mg/dl	32.6±63.5	17.8±36.6	0.3125
Elevado + muy elevado	200->500mg/dl	38.2±69.6	18.4±49.9	0.2500
Colesterol total				
Deseable	< 200mg/dl	25.2±57.7	20.4±48.8	0.9999
Limítrofe alto	200-239mg/dl	29.3±67.0	20.0±52.3	0.5469
Alto	≥ 240mg/dl	35.1±62.0	33.4±70.7	0.8750
Colesterol LDL				
Óptimo	<100mg/dl	19.30±48.0	22.5±57.9	0.6250
Limítrofe	100-159 mg/dl	33.0±66.7	18.8±45.2	0.3484
Elevado + Muy Elevado	160- ≥ 190mg/dl	29.8±73.2	38.2±75.0	0.7500
Ácido Úrico				
C1		23.2±56.4	21.7±55.4	0.9375
C2		32.4±65.2	37.1±72.9	0.9453
C3		20.3±49.0	12.6±35.6	0.6250
C4		36.7±75.0	15.8±34.5	0.3125

Los datos se expresan en medias. *p= <0.05, los análisis se realizaron por la prueba de t para muestras pareadas. N/A: No aplica, C1: Cuartil 1, C2: Cuartil 2, C3: Cuartil 3, C4: Cuartil 4.

Tabla 20. Indicadores de control metabólico y niveles de no-metilación del gen IRS-1 antes y después de la intervención con inulina.

Indicador	Niveles	Pre-inulina	Post-Inulina	p
Índice de Masa Corporal				
Peso adecuado	18.5-24.9 kg/m ²	N/A	N/A	N/A
Sobrepeso	25.0-29.9 kg/m ²	192.7±49.7	191.2±47.1	0.9218
Obesidad	30.0 - > 40 kg/m ²	197.2±48.4	193.7±35.2	0.9569
Circunferencia abdominal				
C1		197.7±43.9	196.6±33.1	0.4038

C2		175.7±60.6	176.6±55.80	0.8999
C3		202.1±38.2	198.0±23.4	0.8999
C4		203.4±49.8	200.7±34.5	0.3755
Masa grasa				
C1		201.3±50.4	190.2±47.0	0.4637
C2		197.1±40.7	193.0±38.8	0.3289
C3		173.6±57.0	183.7±45.6	0.5477
C4		208.5±41.6	205.3±20.8	0.3225
Grasa abdominal				
C1		189.9±54.2	196.2±32.5	0.8650
C2		178.6±51.2	186.8±46.0	0.5477
C3		208.5±43.5	193.7±41.5	0.0946
C4		204.2±42.4	197.0±35.7	0.2734
Masa muscular				
C1		189.0±46.5	193.1±40.3	0.7819
C2		193.6±46.6	193.0±39.3	0.9265
C3		212.6±44.2	205.9±25.6	0.1594
C4		183.9±56.6	179.2±46.0	0.9799
Glucosa en ayunas				
Hipoglucemia	<79 mg/dl	210.0±26.6	149.2±75.1	0.5000
Normoglucemia	80-130 mg/dl	204.5±63.1	197.1±34.8	0.0689
Hiperoglucemia	>130 mg/dl	186.1±46.7	193.9±35.8	0.9534
Triglicéridos				
Normal	<150mg/dl	190.8±54.3	182.1±45.6	0.5733
Levemente elevado	150-199mg/dl	185.7±53.2	203.5±32.6	0.2439
Elevado + muy elevado	200->500mg/dl	206.4±35.7	203.1±27.2	0.3884
Colesterol total				
Deseable	< 200mg/dl	195.6±55.1	189.3±44.3	0.5207
Limítrofe alto	200-239mg/dl	199.6±41.4	195.1±30.0	0.6794
Alto	≥ 240mg/dl	180.1±42.3	205.1±30.0	0.3125
Colesterol LDL				
Óptimo	<100mg/dl	192.1±59.5	183.7±53.8	0.2413
Limítrofe	100-159 mg/dl	199.5±41.7	197.5±31.7	0.5466
Elevado + Muy Elevado	160-189mg/dl	176.6±47.4	190.5±323.0	0.8438
Ácido úrico				
C1		176.8±60.7	193.5±33.5	0.3060
C2		196.0±43.7	177.0±49.3	0.3529
C3		203.4±42.1	206.8±25.6	0.7119
C4		204.1±45.2	194.1±41.7	0.4037

Los datos se expresan en medias. *p= <0.05, los análisis se realizaron por la prueba de Wilcoxon para muestras pareadas.
 N/A: No aplica, C1: Cuartil 1, C2: Cuartil 2, C3: Cuartil 3, C4: Cuartil 4.

7. DISCUSIÓN

La edad media de los sujetos del estudio fue de 54.4 años, cifra levemente menor a la edad media nacional de pacientes con DMT2 según la ENSANUT 2018. La metformina fue el fármaco predominante, seguido de la combinación metformina/insulina, de acuerdo con la bibliografía, con el paso del tiempo se ha modificado el tipo de tratamiento farmacológico utilizado para esta patología, dejando de ser exclusivo el uso de hipoglucemiantes orales y con un aumento en el uso de la insulina, con o sin hipoglucemiantes orales. Por otro lado, para la categorización de los años de evolución fueron más prevalentes aquellos sujetos con menos de 5 años de evolución a partir del diagnóstico, cifra en un 50% menor comparado con la media a nivel nacional reportada en la ENSANUT 2018 (55).

En cuanto a la composición corporal, sobresalen las prevalencias de sobrepeso con el 50.7% y de obesidad con el 47.4% de la población estudiada, cifras que concuerdan con las categorías del Índice de Masa Corporal reportados con mayor prevalencia para pacientes con diabetes mellitus tipo 2 en México de acuerdo a la ENSANUT 2016. Los resultados de la media, previo a la intervención con inulina de agave, para los indicadores IMC (\bar{x} =30.4 kg/m²), cintura (\bar{x} =101cm en hombres y \bar{x} =101.5cm en mujeres), glucosa en ayunas (\bar{x} =163.5mg/dl), triglicéridos (\bar{x} =221.3mg/dl), colesterol total (\bar{x} =202.7mg/dl) y C-LDL (\bar{x} =113.6mg/dl) se encuentran por arriba de las cifras recomendadas para el control metabólico de pacientes con diabetes tipo II, las cuales indican que el IMC debe estar entre 18.5 a 25kg/m², el perímetro de cintura debe ser menor de 94 cm en hombres y menor de 90 cm en mujeres, la glucosa preprandial o en ayunas debe presentar resultados entre 80-130mg/dl , triglicéridos <130mg/dl, colesterol total <200mg/dl, y c-LDL <100 mg/dl para ambos sexos (54). Posterior a la intervención con inulina se encontraron cambios importantes en los indicadores de control metabólico de los sujetos destacando la pérdida de peso, la disminución de centímetros de cintura, músculo, glucosa en ayunas y triglicéridos. Que, si bien no sólo son estadísticamente significativos, si no también, clínicamente relevantes. Es importante destacar que a pesar de los cambios reportados en el estudio, fue el colesterol total el único parámetro que llegó a valores meta de control dentro de la media global, es por ello que se categorizaron cada uno de los indicadores, con lo

cual podemos observar detalladamente que previo a la intervención no se reportó ningún caso de peso adecuado de acuerdo al IMC y posterior a la intervención se observó un 19.4% del total de población dentro de la categoría de peso adecuado, porción de la población, la cual cumpliría con la meta de control. De acuerdo con lo reportado por la asociación Latinoamericana de Diabetes en 2019 un IMC por abajo de 25 kg/m² en pacientes con diabetes se ha relacionado con una mayor esperanza de vida tanto en hombres como en mujeres, al igual que la pérdida de 3 a 4 kg de peso dentro del primer año de diagnóstico de la enfermedad (54). Con respecto a lo reportado en el ensayo clínico Look AHEAD en 2010, la pérdida de peso también se ha visto relacionada positivamente con otros parámetros como es el control de la glucosa, la presión arterial, el colesterol HDL y los triglicéridos (57). Dentro del parámetro circunferencia abdominal podemos observar que los hombres dentro del cuartil 1 y una porción de hombres dentro del cuartil 2 también cumplen con la meta de control con cifras menores a 94cm, en la práctica, toda persona con un IMC mayor de 30 kg/m² tiene un exceso de grasa visceral que se refleja en un perímetro abdominal por arriba de las metas para el control metabólico. En cuanto a la glucosa en ayunas existe un aumento favorable de aquellos sujetos que presentan normoglucesmia preprandial de 29 a 34 sujetos posterior a la intervención. La asociación Americana de Diabetes en 2019 y la investigación de Melendez E y cols., en 2011 refieren que el control de la glucosa puede modificar beneficiosamente los niveles de lípidos en plasma, principalmente los niveles de triglicéridos, en particular en aquellos sujetos con niveles muy elevados y derivado de ello una mejor prevención cardiovascular y disminución de la mortalidad (3,15). Dentro de los indicadores lipídicos, del 47% al 51% presentaron triglicéridos en niveles normales, el resto de la población mantuvo sus niveles por arriba de lo normal, la asociación americana de diabetes en 2019 indica que los pacientes con DMT2 tienen una mayor prevalencia de anomalías lipídicas, lo que contribuye a su alto riesgo de enfermedad cardiovascular aterosclerótica (3). Para los resultados de colesterol total podemos observar que el 50.7% de la población al inicio de la intervención y el 59.7% posterior a la intervención, se encuentran en niveles óptimos, el resto de la población presentó niveles elevados. Está descrito que el metabolismo del

colesterol suele estar alterado en este tipo de pacientes a causa de tres mecanismos principales, el incremento de la glicación de las lipoproteínas ricas en colesterol, la resistencia a la insulina prevalente en DMT2 y sobrepeso, y a los cambios en la secreción de la insulina. Por último, en cuanto a los datos resultantes del colesterol LDL, se observó que tan sólo el 34.4% y el 29.8% de la población obtuvieron cifras de niveles óptimos, Monnier L. y cols., en 1995 describen que en pacientes con DMT2 bien controlados las concentraciones plasmáticas de unión al colesterol suelen responder y se encuentran generalmente dentro del rango normal, en este tipo de pacientes podemos encontrar una sensibilidad normal a la insulina en hígado y tejidos periféricos (58). Otro de los beneficios de la obtención de un buen control metabólico, es que este control podría evitar o retardar la aparición de complicaciones tanto microvasculares como macrovasculares a largo plazo en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

Respecto con los resultados de metilación del DNA de los genes incluidos en nuestro estudio, se encontró presente el estatus de metilación del sitio promotor del gen *INS* a diferentes niveles en el total de la población, las modificaciones epigenéticas, como es el caso de la metilación, es considerada como subproducto de diversos estímulos que pueden influir en la susceptibilidad genética de la diabetes. Bansal, A. y Pinney, S. en 2017, mostraron evidencia de que los niveles del estado de metilación en los promotores específicos de tejido juegan un papel importante en el control de la expresión de los genes asociados (39). De hecho Kuroda A. y cols., en 2009 y por su parte Yang B. y cols., en 2011, demostraron en sus investigaciones que la metilación del promotor del gen *INS* se encuentra implicada en la regulación de la expresión génica de insulina tanto de los islotes pancreáticos como de las células β (59,60). Bansal, A. y Pinney, S. en 2017, también hicieron referencia al hecho de que dependiendo de donde se localice la metilación del DNA en una secuencia genómica, la metilación puede tener diversos efectos sobre la función del gen, como provocar el silenciamiento de los genes (39). En una investigación realizada por Yang BT y cols. en 2011, en pacientes con diabetes y sin diabetes, se mostró que existían niveles aumentados de metilación en 4 sitios CpG de la región promotora del gen *INS* en los islotes pancreáticos

obtenidos de los pacientes con diabetes en comparación con los no diabéticos. Los niveles de metilación de estos sitios, junto con otros 9 sitios en la región, se correlacionaron negativamente con la expresión del mismo gen, lo que puede sugerir que el gen de la insulina está sujeto a la regulación factores epigenéticos (60). Adicionalmente de esta hipótesis podemos comparar el cambio de los niveles de metilación al estatus no metilado resultados de esta intervención, cabe destacar que el único cambio realizado para la intervención fue la suplementación con inulina y con lo cual en los resultados posteriores a la intervención observamos cambios en los niveles de no metilación aumentados de forma significativa para este gen. La evidencia en este caso nos sugiere que la metilación del DNA puede ser un proceso reversible y dinámico que requiere una regulación continua. Hasta hace algunos años, se desconocían cuáles eran los mecanismos de un proceso llamado, desmetilación, de acuerdo con las investigaciones de Bhutani N. y cols., en 2011 hoy en día se conocen dos mecanismos principales para este proceso, la desmetilación pasiva y la desmetilación activa. La desmetilación pasiva se lleva a cabo por la disminución o ausencia de actividad de las DNMTs, en especial la DNMT1, durante el mantenimiento de la 5mC tras la replicación celular, perdiéndose de esta manera la metilación en la hebra hemimetilada. Por otra parte, la desmetilación activa se lleva a cabo en respuesta a cambios de señales de la célula basada en dos vías, la vía oxidativa del grupo metilo de la 5-mC y la vía de deaminación de citosina inducida por mecanismos de reparación celular para la generación de una citosina (61). Sin embargo, aún no está claro como estos mecanismos podrían explicar los defectos encontrados en una enfermedad como la diabetes puesto que las vías activas aún no se han caracterizado bajo condiciones patológicas. Los resultados de los niveles de no-metilación posterior a la intervención de nuestro estudio se observaron significativamente aumentados en las mujeres. Mauvais, J en 2015 reportó en su investigación que el sexo contribuye a diferencias en muchos aspectos fundamentales del control de la homeostasis metabólica y enfermedades como la obesidad y la diabetes. En comparación con los hombres, las mujeres tienen más masa adiposa, más ácidos grasos libres circulantes, mayor contenido de lípidos intramiocelulares y sólo dos tercios de la

masa muscular de los hombres, factores que podrían predecirse para promover la resistencia a la insulina en las mujeres (62). Por lo tanto, es muy importante tener en cuenta que el sexo puede tener una influencia significativa en los resultados de la presente investigación. Es bien conocido que la metilación del DNA es diferente entre hombres y mujeres debido a la inactivación del cromosoma X en mujeres. En un estudio realizado por Cajsa Davegårdh y cols., en 2019 tanto en hombres como en mujeres para determinar la influencia del sexo en la metilación del DNA y la expresión genética mostraron que las mujeres tenían una mayor expresión de genes en vías relacionadas con el metabolismo de ácidos grasos y aminoácidos por presentar niveles menores de metilación a diferencia de los hombres (63).

Dick K y cols., en 2014 sugieren que el Índice de Masa Corporal es un fenotipo que esta determinado por el estilo de vida, factores ambientales y factores genéticos (64). Los resultados de la clasificación del IMC se encontraron asociados significativamente con la presencia de metilación del gen *INS* antes y después de la intervención en el presente proyecto. Existen investigaciones como la de Dick K y cols., en 2014 y la de Shuai L y cols., en 2019 con estudios del epigenoma los cuales han informado que existen gran cantidad de islas CpG, aproximadamente 500, las cuales podrían estar metiladas en relación con las categorías del IMC (65,64). En el estudio de Shuai L y cols., en 2019 se analizó la causalidad entre IMC y la metilación del DNA, sugieren que el IMC y el cambio de este tiene un efecto causal en la metilación del DNA, pero no viceversa, se propone que la inflamación desempeña un papel en el desarrollo de algunas enfermedades relacionadas con la obesidad e implican el hecho de que la metilación podría mediar los efectos de la obesidad sobre otras enfermedades relacionadas como la resistencia a la insulina (65).

Indicadores como la circunferencia abdominal en mujeres, masa grasa y glucosa en ayunas en ambos sexos previo a la intervención con inulina de agave se vieron relacionados en nuestro estudio con los niveles de metilación del gen *INS*. Se observaron niveles elevados de metilación en aquellas mujeres que presentaron las cifras más altas de circunferencia abdominal, así mismo, encontramos niveles más elevados de metilación y en aquellos sujetos que presentaron un mayor

porcentaje de masa grasa total al igual que niveles disminuidos de no-metilación en los sujetos con mayor circunferencia abdominal del total de la población. De acuerdo con la investigación de Gutierrez, C y cols., en 2017 en la que exponen que la adiposidad es un factor de riesgo de DMT2 ya que induce alteraciones hepáticas y en tejido muscular que conllevan a una respuesta inflamatoria crónica la cual contribuye a la resistencia a la insulina y a la disfunción metabólica sistémica, además de ser un factor relacionado también con la epigenética de la DMT2 (67). Rönn T y Lin C en 2015, Minae S. y cols., en 2018 y Walaszczyk y cols., también en 2018 exponen que existen diversos factores que afectan a la patogenia de la DMT2, entre ellos se incluye a la obesidad, que además es también considerado como un factor que puede alterar el epigenoma humano, estos estudios se han centrado en identificar las regiones susceptibles genéticamente con los rasgos de adiposidad (68,69,70). Por su parte, Minae S. y cols., en 2018 exponen que regiones metiladas de genes como el factor de crecimiento a la insulina 2 (*IGF2*) y *H19* se han asociado con la obesidad debido a sus importantes funciones dentro de la composición corporal asociados con un mayor peso y enfermedades metabólicas, como la resistencia a la insulina (69). Dentro de nuestra investigación pudimos observar niveles elevados de metilación en aquellos sujetos que presentaron el porcentaje mas elevado de grasa corporal, como se menciono anteriormente, y en aquellos que en contraste presentaron el menor porcentaje de grasa corporal. Un menor porcentaje de masa grasa asociado con la desnutrición se encuentra también asociado con el desarrollo de la DMT2 en la adultez, sobretodo si se presentó en etapas tempranas de la vida. Dentro del estudio realizado por Minae S. y cols., en 2018 en mujeres posmenopáusicas proporcionaron evidencia de que la metilación y la grasa corporal total se encontraban asociados, específicamente, los niveles elevados de metilación se encontraron asociados con una masa grasa total más baja (69). Glier M y cols., en 2014 reportaron que las marcas epigenómicas, como se mencionó anteriormente, son heredables, pero también que responden a los cambios ambientales, como los cambios en el estado nutricional (71). De esta forma con los niveles elevados de metilación del gen podría disminuir la expresión de la vía de la señalización de

insulina (PI3K)/Akt, resultado de la resistencia a la insulina, por lo que podemos deducir que nuestros resultados tienen un sentido biológico.

Por otro lado, pudimos observar que la hipoglucemia se relacionó significativamente con menores niveles de metilación en comparación de aquellos que presentaron normoglucemia.

La mayoría de los estudios como los de Kuroda A y cols., en 2009, Hall E y cols., en 2018 y Walaszczyk y cols., en 2018, que relacionan los niveles de metilación con la glucemia, resultan en un aumento de metilación asociado a una exposición prologada a niveles elevados de glucosa, lo cual podría a su vez estar asociado con una disminución en la expresión de los genes implicados (59,72,70). En un estudio realizado por Pinzon, J; Perna, A; Rojas, N en 2017 para analizar los niveles globales de metilación e hidroximetilación asociados a los niveles de control metabólico, considerando los porcentajes de la Hb1Ac, en pacientes con y sin diabetes, se observó que hay factores más allá de la enfermedad *per se*, lo que causa los cambios de la metilación global, sugiriendo que existe una relación directa entre la hiperglucemia crónica y sostenida con los cambios acumulativos en el epigenoma, como lo son el aumento de los niveles de metilación. (66). En el caso particular de nuestros resultados, la asociación se observó en aquellos sujetos que presentaron hipoglucemia presentaron también niveles bajos de metilación, estos niveles de metilación podrían sugerir una mayor expresión del gen, disminuyendo así, en cierta medida la resistencia a la insulina, lo que podría provocar los niveles bajos de glucosa en sangre en estos sujetos.

Respecto al colesterol LDL nuestro estudio arrojó un aumento en el nivel de metilación posterior a la intervención en aquellos sujetos que se encontraban dentro de la categoría de c-LDL limítrofe. En el estudio realizado por Ataíde L y cols., en 2019 que analizó el perfil de metilación del gen *ADRB3* y su asociación con el perfil lipídico y el estado nutricional en adultos, observaron que los resultados de colesterol LDL por encima de los niveles normales o deseables, tenían una probabilidad del 164% de generar mayor hipermetilación del gen, hallazgos que concuerdan con la investigación de Tzu-Ching y cols., en 2014 centrada en estudiar

la toxicidad coronaria inducida por c-LDL a través de la vía Akt-FGF2 a través de la metilación del DNA y con nuestros resultados (73,74).

En cuanto a la no-metilación del gen *INS*, encontramos diferencias con un aumento posterior a la intervención en diversos indicadores de control metabólico. En pacientes con cifras por arriba de la media total de la población de circunferencia abdominal, grasa total y ácido úrico, también se encontró un aumento de los niveles de no-metilación en aquellos sujetos que obtuvieron resultados de colesterol total en nivel óptimo y limítrofe y en aquellos sujetos con cifras por debajo de la media total de grasa abdominal. Nuestros resultados concuerdan con investigaciones como la de Pinzon, J; Perna, A; Rojas, N en 2017 en cuanto al hecho de que la metilación es un proceso dinámico dentro del cual los grupos metilo pueden perderse y que podrían estar asociados en respuesta al control metabólico de los pacientes. Esta respuesta metabólica podría diferenciar a los pacientes en metas de control y sus complicaciones en un futuro, adicional a un control dietético y farmacológico adecuado para prevenir tanto el deterioro metabólico como los efectos epigenéticos que podrían resultar en un desequilibrio de la expresión génica. (66)

Por otro lado, en cuanto al gen *IRS-1* involucrado en la vía de la señalización de la insulina, para la respuesta de insulina periférica y el crecimiento y la función de las células β pancreáticas, al igual que en un estudio realizado por Jiangbo M; Cheng, J y Wang, L. en 2013 de pacientes con y sin DMT2 en el que se analizó la contribución de la metilación del DNA del promotor del gen *IRS-1* y el riesgo de DMT2 sin encontrar una asociación significativa (75), nuestros resultados indicaron una muy baja prevalencia del estatus de metilación sin cambio significativo después de la intervención. Estos resultados pueden sugerir que el mecanismo de metilación del DNA del promotor génico puede no verse afectado derivado de los cambios metabólicos ocurridos en los sujetos de estudio con la intervención con inulina.

De acuerdo con Walaszczyk E. y cols., en 2018 los cambios epigenéticos pueden ser causa o consecuencia de la enfermedad o un factor que contribuye indirectamente a través de exposiciones ambientales que pueden afectar el epigenoma (70). Como se observó en parte de nuestros resultados, existen

múltiples factores que pueden afectar los niveles de metilación del DNA, como el IMC, el porcentaje de masa grasa, los niveles de glucemia y los niveles lipídicos. Lo que nos permite explicar la variación en los niveles de metilación de DNA entre individuos. Además, la acumulación de datos nos permite sugerir que las interacciones entre la genética y la epigenética influyen en la expresión de genes, como los utilizados en el presente estudio y a su vez, en cambios metabólicos importantes, lo que lleva al desarrollo o control de enfermedades complejas o complicaciones.

Dentro de las limitaciones del presente estudio, como es conocido, la metilación es un mecanismo epigenético que puede ser alterado por diversos factores ambientales o por los mismo procesos inmunológicos e inflamatorios a causa de la diabetes. Por esta razón para mitigar el sesgo, se trataron de controlar factores que podrían generar esas alteraciones incluyendo dentro los criterios de inclusión del estudio el consumo de alcohol y tabaco, la realización de ejercicio y la modificación de la dieta. Además de que cada uno de los sujetos de estudio efectúa el papel de su propio control y los únicos cambios a los que son sometidos en la presente investigación es al suplemento de inulina a agave y a los cambios de los indicadores de control metabólicos ocurridos durante el tiempo de la intervención.

Dentro de las implicaciones que podría aportar la presente investigación a futuro, destacamos el uso de perfiles de metilación del DNA como un biomarcador para predecir el riesgo de padecer DMT2 o de complicaciones lo cual podría conducir a terapias médicas o alternativas innovadoras.

8. CONCLUSIONES

1. Todos los sujetos incluidos en el estudio presentaron algún nivel de metilación del gen *INS*, el cual sufrió un cambio, con una disminución de los niveles de metilación posterior a la intervención con inulina de agave. El cambio presentado se observó también significativamente en mujeres.

2. Previo a la intervención se encontraron asociaciones entre los niveles de metilación del gen *INS* y los indicadores de control metabólico IMC, circunferencia abdominal, masa grasa total y glucemia. Y asociación entre los niveles de no

metilación del mismo gen con grasa abdominal. También encontramos un cambio significativo de los niveles de no metilación en circunferencia abdominal, grasa abdominal, grasa total, colesterol total, c-LDL y ácido úrico, todos con un aumento del nivel de no metilación.

3. Con respecto al gen *IRS-1* encontramos el estatus de no-metilación en el total de los sujetos estudiados sin cambios posteriores a la intervención con una porción no significativa de sujetos con algún nivel de metilación.

9. REFERENCIAS

1. ADA. Diagnóstico y clasificación de la Diabetes Mellitus. Diabetes Care. 2014 January; 37(1).
2. Madhu S. Diabetes Mellitus: Diagnosis and Management Guidelines. JIMSA. 2015 Jan. - Mar.; 28 (1).
3. ADA. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes 2018. Diabetes Care. 2018 January; 41: p. S13–S27,.
4. FID. ATLAS de la DIABETES de la FID. 6th ed. Guariguata L, editor.; 2013.
5. ADA. Diabetes org. [Online].; 2015 [cited 2018 Noviembre 22. Available from: <http://www.diabetes.org/es/informacion-basica-de-la-diabetes/sintomas-de-la-diabetes/>.
6. Mathers CD, et al. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. PLoS Med. 2006; 11(e442).
7. Federation ID. IDF Diabetes Atlas. IDF; 2017. Report No.: 8 Edition.
8. INSP. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. Informe de resultados. México: INSP; 2016.
9. Paulweber. B. A review of the quality of current diabetes clinical practice guidelines. Horm Metab Res. 2010; 42(S3-S36).
10. Dupont C. Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective. Istitute National of Health. 2009 Septiembre; 5(27): p. 351–357.
11. Castrejon V, Carbo R, Martinez M. Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de la glucosa. REB. 2007; 26(49-57).
12. Reyes J, Plancarte A. Bases moleculares de las acciones de la insulina. REB. 2008 Mayo;(9-18).
13. Rodelo CG. Mecanismos Moleculares de la Resistencia a la Insulina: Una Actualización. Gac Med Mex. 2017; 153(214-28).
14. A. F, S. R, E P. Tratamiento actual de la diabetes mellitus tipo 2. CCM. 2016 Ene-Mar; 20(1).
15. Melendez E, Tejedor J, Melendez A. Recomendaciones para el tratamiento farmacológico de la hiperglucemia en la diabetes tipo 2. Nefrología. 2011; 31(1).

16. Muñoz C, Ferreira F. Plantas medicinales en el tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2: una revisión. *Farmacéuticos comunitarios*. 2015; 7(4).
17. Dans A, Villarruz M, Jimeno C. The effect of Momordica charantia capsule preparation on glycemic control in type 2 diabetes mellitus needs further studies.. *J Clin Epidemiol*. 2007;60(6):554-559. doi:10.1016/j. j. 2017.
18. Fuangchan A, Sonthisombat P, Seubnukarn T. Hypoglycemic effect of bitter melon compared with metformin in newly diagnosed type 2 diabetes patients. *J Ethnopharmacol*. 2011; 134(2): p. 422-428.
19. Medicines N. Natural medicines evidence-based validated grading rationale: grading system. [Online].; 2015 [cited 2018 Diciembre 18. Available from: <https://naturalmedicines.therapeuticresearch.com/grading.aspx>.
20. Yeh G, Eisenberg D, Kaptchuk T. Systematic review of herbs and dietary supplements for glycemic control in diabetes. *Diabetes Care*. 2003; 26(4): p. 1277-1294. doi:10.2337/diacare.26.4.1277.
21. Shapiro K, Gong W. Natural products used for diabetes. *J Am Pharm Assoc*. 2002; 42(2): p. 217-226. doi:10. 1331/108658002763508515.
22. Cicero A, Derosa G, Gaddi A. What do herbalists suggest to diabetic patients in order to improve glycemic control? Evaluation of scientific evidence and potential risks. *A. cta Diabetol*. 2004;41(3). 2004; 41(3): p. 91-98. doi:10.1007/s00592-004-0150-2.
23. Marcel BR. Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients. *The Journal of Nutrition*. 2007 Noviembre; 137(11).
24. Martinez M , Martinez MA , Martinez ML. Clasificación toxicológica, envasado y etiquetado de productos químicos. *Toxicología*. 2005; 22: p. 162-168.
25. Herrera MS, Reyes VD. Propiedades funcionales y aplicaciones tecnologicas de fructanos. *Alimentos funcionales de hoy*. 2016;; p. 97-116.
26. Quian Z, Hongyue Y, Xinhua X. El fructano de tipo inulina mejora el fenotipo diabético y los perfiles de microbiota intestinal en ratas. *Peer J*. 2018 Marzo; 6(e4446).
27. Madrigal L, Sangronia Elba. La inulina y derivados como ingredientes clave en alimentos funcionales. *ALAN*. 2017; 57(4).
28. Delzenne NM, Cani PD, Neyrinck AM. Modulation of glucagon-like peptide 1 and energy metabolism by inulin and oligofructose: experimental data. *The Journal of Nutrition*. 2007 November; 137(11): p. 2547S – 2551S <https://doi.org/10.1093/jn/137.11.2547S>.
29. Hernandez S, Bricio R, Zavala M. Effect of Inulin from Agave tequilana Weber Blue Variety on the Metabolic Profile of Overweight and Obese Dyslipidemic Patients. *Journal of Clinical Trials*. 2016; 6(1): p. DOI: 10.4172/2167-0870.1000254.
30. Delgado-Coello BA. ¿Qué es la epigenética? *Ciencia*. 2011 enero-marzo;; p. 73-82.
31. Zulet MI. Epigenetic changes in neurology: DNA methylation in multiple sclerosis. *Neurología*. 2017 Septiembre; 7(463-468).

32. Davis C, Uthu EO. DNA methylation, cancer susceptibility, and nutrient interactions. *Exp Biol Med*. 2004 November; 229(10): p. 988-95.
33. Chen CC, Wang KY, Shen CKJ. DNA 5-methylcytosine demethylation activities of the mammalian DNA methyltransferases. *Journal of Biological Chemistry*. 2013; 288(13): p. 9084–9091.
34. Denis H, Ndlovu MN, Fuks F. Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO Reports*. 2011; 12(7): p. 647-656.
35. Dorantes MR. DNA methylation: an epigenetic process of medical importance. *Revista de investigación clínica*. 2004 Feb; 56(1).
36. Jiménez-Chillarón JC. The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health. *Biochimie*. 2012; 94(2242-2263).
37. Illingworth RS, Bird AP. CpG islands - “A rough guide.”. *FEBS Letters*. 2009; 583(11): p. 1713–1720.
38. El-Osta A, Brasacchio D, Yao D. Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *The Journal of Experimental Medicine*. 2008; 205(10): p. 2409–2417.
39. Bansal A, Pinney SE. DNA methylation and its role in the pathogenesis of diabetes. *Pediatric Diabetes*. 2017; 18: p. 167–177.
40. Elliott HR, Shihab HA, Lockett GA. Role of DNA Methylation in Type 2 Diabetes Etiology: Using Genotype as a Causal Anchor. *Diabetes*. 2017 June; 66(6): p. 1713-1722.
41. Willmer , Johnson , Louw. Blood-Based DNA Methylation Biomarkers for Type 2 Diabetes: Potential for Clinical Applications. *Front. Endocrinol*. 2018 December 4; 9(744).
42. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of Diabetic Complications. *Physiological Reviews*. 2013; 93: p. 137–188.
43. Rica I, Urrutia I, Martínez R. Canales de potasio y gen de la insulina: ¿Cuál es su papel en la diabetes infantil? *Rev Esp Endocrinol Pediatr*. 2012 April; 3(95).
44. Genome. NCIB. [Online].; 2018 [cited 2018 Diciembre 20. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3630#gene-expression>.
45. Duan C, Liu M, Xu H. Decreased expression of GLUT4 in male CG-IUGR rats may play a vital role in their increased susceptibility to diabetes mellitus in adulthood. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2016 October; 48(10): p. 872-882.
46. Mesa V, Barros P, Medina C. Metilación del ADN: marcador diagnóstico y pronóstico de cáncer. *Gac Méd Méx*. 2006; 142(1).
47. Taper HS, Roberfroid. Influence of Inulin and Oligofructose on Breast Cancer and Tumor Growth1. *J Nutr*. 1999; 129: p. 1488S–1491S.

48. Rampersaud G, Kauwell G, Hutson A. Genomic DNA methylation decreases in response to moderate folate depletion in elderly women. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2000 October; 72(4): p. 998–1003.
49. Fang MZ, Chen , Sun Y. Reversal of Hypermethylation and Reactivation of p16INK4a, RARb, and MGMT Genes by Genistein and Other Isoflavones from Soy. *Clin Cancer Res*. 2005 October; 11(19).
50. Waterland R, Travisano M, Tahilani K. Methyl Donor Supplementation Prevents Transgenerational Amplification of Obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2008 September; 32(9): p. 1373-1379.
51. Weizhu Z, Wenyi Q, Ke Z, Rottinghaus GE, Yin-Chieh C. Trans-Resveratrol Alters Mammary Promoter Hypermethylation in Women at Increased Risk for Breast Cancer. *Nutr Cancer*. 2012 April; 64(3): p. 393–400.
52. Mayuko M, Sakura N, Nobuo M. Effects of dried tofu supplementation during interval walking training on the methylation of the NFKB2 gene in the whole blood of older women. *The Journal of Physiological Sciences*. 2017 July.
53. Rubio MA, Moreno C, Cabrerizo L. Guías para el tratamiento de las dislipemias en el adulto: Adult Treatment Panel III (ATP-III). *Endocrinol Nutr*. 2004; 51(5): p. 254-65.
54. ALAD. Guías ALAD sobre el Diagnóstico, Control y Tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2 con Medicina Basada en Evidencia Edición 2019. ALAD. 2019;(2248-6518).
55. Rojas R, Basto A, Aguilar C. Prevalencia de diabetes por diagnóstico médico previo en México. *Salud pública de méxico*. 2018 Mayo-Junio; 60(3).
56. Garcia U, Landa A, Melgarejo H. Assessment of a Multidisciplinary Intervention in Patients With BMI >35 kg/m² and Recently Diagnosed Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019 July; 104(7): p. 2994–3002.
57. Group TLAR. Long-term effects of a lifestyle intervention on weight and cardiovascular risk factors in individuals with type 2 diabetes mellitus. four-year results of the look AHEAD trial. *Arch Intern Med*. 2010; 170: p. 1566-1575.
58. Monnier L, Percheron C, Descomps B. Insuline, diabète et métabolisme du cholestérol [Insulin, diabetes and cholesterol metabolism]. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1995; 189(5): p. 919–93.
59. Kuroda A, Rauch T, Todorov I. Insulin gene expression is regulated by DNA methylation. *PLoS ONE*. 2009; 4(9).
60. Yang B, Dayeh T, Kirkpatrick C. Insulin promoter DNA methylation correlates negatively with insulin gene expression and positively with HbA(1c) levels in human pancreatic islets. *Diabetologia* 54(2). 2011; 54(2): p. 360–367.
61. Bhutani , Burns DM, M. BI. DNA Demethylation Dynamics. *Cell*. 2011 September; 146.
62. Mauvais J. Sex differences in metabolic homeostasis, diabetes, and obesity. *Biol Sex Differ*. 2015; 6(14).

63. Cajsá D, Elin HW, Broh. Sex influences DNA methylation and gene expression in human skeletal muscle myoblasts and myotubes. *Stem Cell Research & Therapy*. 2019; 10(26).
64. Dick KJ, Nelson CP, Tsaprouni , Et al. DNA Methylation and Body-Mass Index: A Genome-Wide Analysis. *The Lancet*. 2014 June; 383.
65. Shuai L, Ee Ming W, Minh B. Inference about causation between body mass index and DNA methylation in blood from a twin family study. *International Journal of Obesity*. 2019 February; 43(2): p. 243-252.
66. Pinzon J, Perna A, Rojas N. Effect of diabetes status and hyperglycemia on global DNA methylation and hydroxymethylation. *Endocrine Connections*. 2017; 6(708): p. 708–725.
67. Gutierrez C, Roura A, Olivares J. Mecanismos Moleculares de la Resistencia a la Insulina: Una Actualización. *Gac Med Mex*. 2017; 153: p. 214-28.
68. Rönn T, Lin C. DNA methylation as a diagnostic and therapeutic target in the battle against Type 2 diabetes. *Epigenomics*. 2015; 7(3): p. 451–460.
69. Min-Ae S, Thomas E, Tiirikainen. Methylation of imprinted IGF2 regions is associated with total, visceral, and hepatic adiposity in postmenopausal women. *Epigenetics*. 2018; 13(8): p. 858–865.
70. Walaszczyk , Luijten, M, Annemieke M.. DNA methylation markers associated with type 2 diabetes, fasting glucose and HbA1c levels: a systematic review and replication in a case–control sample of the Lifelines study. *Diabetologia*. 2018 61; 61(2): p. 354–368.
71. B. Glier M, Green T, M A. Methyl nutrients, DNA methylation, and cardiovascular disease. *Mol. Nutr. Food Res*. 2014; 58: p. 172–182.
72. Hall E, Dekker M, Volkov P. The effects of high glucose exposure on global gene expression and DNA methylation in human pancreatic islets. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2018 September; 472: p. 57-67.
73. Ataíde Lima RP, Ramalho Ribe , Querino de Farias Lima. Methylation Profile of the ADRB3 Gene and Its Association With Lipid Profile and Nutritional Status in Adults. *Biol Res*. 2019 Apr; 52(1): p. 21.
74. Tzu-Ching Y, Chen YJ, Chang SF. Malondialdehyde mediates oxidized LDL-induced coronary toxicity through the Akt-FGF2 pathway via DNA methylation. *J Biomed Sci*. 2014 Feb; 21(1): p. 11.
75. Ma , Cheng , Wang. No Association Between IRS-1 Promoter Methylation and Type 2 Diabetes. *Mol Med Rep*. 2013 Sep; 8(3): p. 949-53.
76. Dorantes MR, Tellez-Ascencio N, A MC. Metilación del ADN: un fenómeno epigenético de importancia médica. *Revista de Investigación Clínica*. 2004 Enero-Febrero; 56(1): p. 56-71.
77. Zorita SG, Urdampilleta A. El GLUT4: efectos de la actividad física y aspectos nutricionales en los mecanismos de captación de glucosa y sus aplicaciones en la diabetes tipo 2. *Avances en diabetología*. 2012 Marzo; 28(19-26).

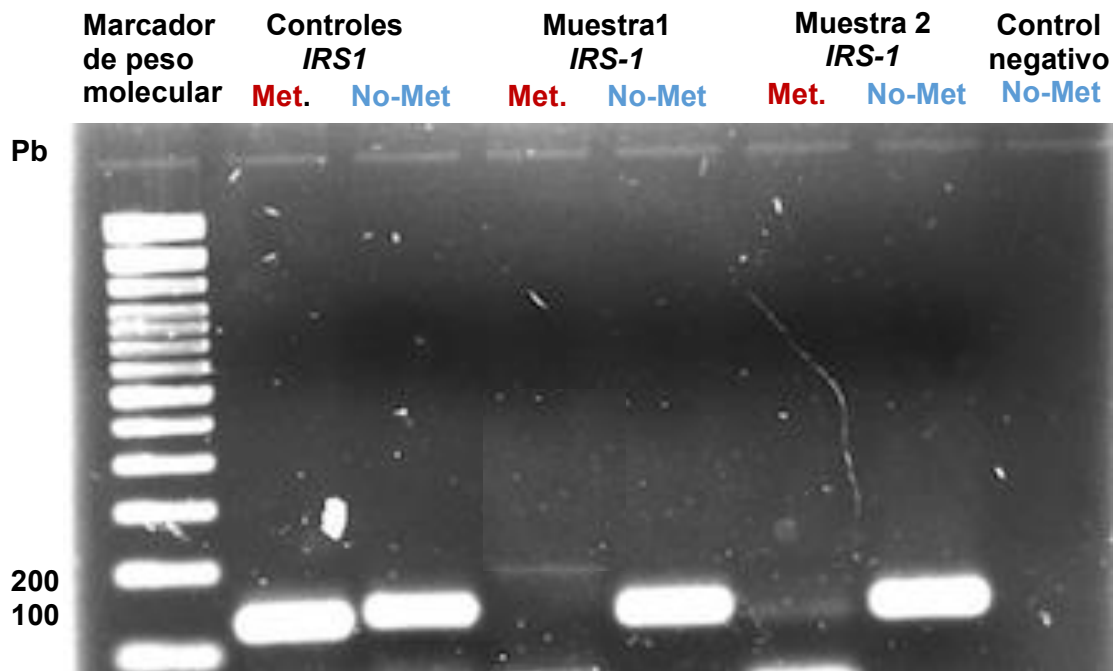
78. Esteves JV, Enguita FJ, Machado UF. MicroRNAs-Mediated Regulation of Skeletal Muscle GLUT4 Expression and Translocation in Insulin Resistance. Journal of Diabetes Research. 2017 February.
79. Dans A, Villarruz M, Jimeno C. The effect of Momordica charantia capsule preparation on glycemic control in type 2 diabetes mellitus needs further studies. J Clin Epidemiol. 2007; 60(6): p. 554-559. doi:10.1016/j. j.

10. ANEXOS

Anexo 1. Cuadro de resultados de Nanodrop

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
61 final arriba	Default	06/05/2019	12:31 p.m.	653.27	13.065	7.290	1.79	1.11
61 final medio	Default	06/05/2019	12:31 p.m.	950.95	19.019	10.673	1.78	1.27
61 final fondo	Default	06/05/2019	12:32 p.m.	-619.34	-12.387	-6.797	1.82	2.01
61 final fondo	Default	06/05/2019	12:32 p.m.	-631.06	-12.621	-6.990	1.81	1.97

Anexo 2. Gel de agarosa con muestras amplificadas por MS-PCR con primers metilados y no metilados para el gen IRS-1.



Bandas de DNA de control positivo, con primers metilado y no metilado que muestran amplificación específica para condiciones metiladas y no metiladas después de la reacción en

cadena de la polimerasa del gen IRS-1 (1 pb). Resultados de dos muestras para el gen IRS-1. Control negativo con mix de no-metilación para el gen IRS-1 sin DNA. MS-PCR, Reacción en cadena de la polimerasa específica de metilación; Pb, pares de bases; IRS-1, Sustrato Receptor de la Insulina isoforma 1; Met, metilado; No-Met, no metilado.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por la Lic. Ariadna Ximena Cerón Ramírez, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10022623, y que lleva por título **“Asociación de los niveles de metilación de los genes *INS* e *IRS1* con indicadores de control metabólico y el consumo de inulina en pacientes con Diabetes Mellitus tipo II”**, ha sido revisado a satisfacción, me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

A t e n t a m e n t e
Dr. Heriberto Manuel Rivera
Presidente.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

HERIBERTO MANUEL RIVERA | Fecha:2020-11-11 09:23:33 | Firmante

WpaCFqUOGLK7ZOcZsg9lrJkzLpE+I20Sm6VZnIRjL7zDx4gN3Mdb/TvPAVzar8xdUjcFIN445omX3Qvy4RrVlTeScw0czrkZrqMifJ7gWA9pPf3687+hhgsATWEv+hsr4nSVCeM3X
aaawvevgROijewTFwENm5Owc4fy9i9NZa84g3kl2ZPbnRRc2ofVMUVDOTSZqv7lh3+FaEjOsR1ZVQr6fT8/arGvnWhyDiFtkhqfMx9830rDmqNpz3JmxTyv4ch+v9xh0dpxJ82Pm+h
MIN+vz1z5JpTf0RNHye4FRr6OFzm8ks8cko6LPiwSZ1cxt3h87e9jZFtKaTKeaPmEQ==

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



[mFoCcq](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/MBrWrp3k4cahPsiQ2S0JjOw0fiQQ9QOq>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por la Lic. Ariadna Ximena Cerón Ramírez, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10022623, y que lleva por título **“Asociación de los niveles de metilación de los genes *INS* e *IRS1* con indicadores de control metabólico y el consumo de inulina en pacientes con Diabetes Mellitus tipo II”**, ha sido revisado a satisfacción, me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

A t e n t a m e n t e
Dra. María Araceli Ortiz Rodríguez
Secretario.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

MARIA ARACELI ORTIZ RODRIGUEZ | Fecha:2020-11-18 09:34:16 | Firmante

dWe0WZrTUoeN+wxS2V2glAHDSZHaBU8adYnUmPAX8SOBKA/fhw5ZNEI9Zgm0fYABB0sp8A44JPWr0S2w4m0P1r78J9LGO80sGZ0RPcOaFuHFk3k3tk2iyP5DiZqfA3Wl/1DfbA5VT4HOetVYCjIzRzZ2yoomWzerb63YhipxVxhPtewelsetMCHuNggDFK64RCTVLw3Jy31N9MHg9bZuDP964xsbdM2owsZTVYtronp2q9VQXm49B1ckyfaEvzaLOz4W0Yn3CsPp9GuaEyoHeM1/sPdujUG8/x73oyZKUUZNoIqeqYMikDuFmHsQsEjMjZCZH+tXu/vGeJghKCmOmw==

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



4R0WXL

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/TSim6IRUwS26OfyioddzQyeEKfImQSEZ>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por la Lic. Ariadna Ximena Cerón Ramírez, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10022623, y que lleva por título **“Asociación de los niveles de metilación de los genes *INS* e *IRS1* con indicadores de control metabólico y el consumo de inulina en pacientes con Diabetes Mellitus tipo II”**, ha sido revisado a satisfacción, me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

A t e n t a m e n t e
Dra. Ollin Celeste Martínez Ramírez
Suplente 2.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

OLLIN CELESTE MARTINEZ RAMIREZ | Fecha:2020-09-18 16:27:39 | Firmante

d09my8wbdGvDLxbbO/Ve+cnJjQo0LOe0OPACCAQOtUCDvCAmJxPHBAwbcfb3D2OETux427PsAXq+pS6yDgmtCZcdG9K3Wxr1D6DOT3JL+X0Ypp65VfUc1CnZOcYTtB8aLhS
zcJPmRp5S6VSFtZd+wVQe0t80gNoIz92DB2T6dCeGlia4IA/3+7nWjKjck6rcdbkMWclBIN9RgfhPn/niM3V15lyQc3f+XMJb4Rhs/nTRAjDoZ4bHn7CGnQ6kvZoYs6XR1BGcFUc3
GNfDLxS/YAwlfp/dwAXVSVQvINImfvmRBdqfvTwmagjcjJKkWJnXolQfTZ1u72mhaL8BUNkdWg==

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



[bgJasz](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/KDwpXDiWZXABe23YcZeXktjqWn8W9tj>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por la Lic. Ariadna Ximena Cerón Ramírez, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10022623, y que lleva por título **“Asociación de los niveles de metilación de los genes *INS* e *IRS1* con indicadores de control metabólico y el consumo de inulina en pacientes con Diabetes Mellitus tipo II”**, ha sido revisado a satisfacción, me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

A t e n t a m e n t e
Dra. Dolores Azucena Salazar Piña
Suplente 1.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

DOLORES AZUCENA SALAZAR PIÑA | Fecha:2020-10-06 19:13:26 | Firmante

LbTAvJjzvtS3tI0NjyZH9YKg8OEH2fTcLsD+PpUAxvOVKPLmCsXSD7X7r3+ELzRs1/pQ8vwCGHjxgVIU3akmQJkRskkr3yU9S5TBFuiFrDx3mleNaz7DENItsa4/8jqvS6XEIZLxc3+WmcUnA0qo6x2S1OX8QRITdHCejrEHc0P997J27SEi29DRsHfnq51rox3ic60npBkN7k3y/crllovM8FK7T9U+lbviBrNjrBOALfkd30O4oRNsTKcz7A2dXI7F8U93xuziBKZhy7zw+LRe/Ykw4mOT6QAyecL7q/RvZ6dGOwnOMdsSSZmttKnD9GChX+jHj8PGTGHckRNg==

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



[7yL4Ke](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/moVBR1JjczxXQ83hmNijyfMfaR9IMnJQ>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por la Lic. Ariadna Ximena Cerón Ramírez, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10022623, y que lleva por título **“Asociación de los niveles de metilación de los genes *INS* e *IRS1* con indicadores de control metabólico y el consumo de inulina en pacientes con Diabetes Mellitus tipo II”**, ha sido revisado a satisfacción, me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

A t e n t a m e n t e
Dra. América Ivette Barrera Molina
Vocal.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

AMERICA IVETTE BARRERA MOLINA | Fecha:2020-09-16 20:25:10 | Firmante

NclwWCQBtbMnzhbQ5Pxcu5TIEIS0b4VttA1EylGoUx5OZiy2ad3X6QleoTHoKGMymFSLatZpL0Qc2QZDb1PSeYEF8FvZYpmQzvmvWHNDHKvSXhEaW3Zk17cp9iy4z4cfUTlxi3Zv6sqDlm5E723S3IP/ZDrNB7Vf8aT7FY+Jm5cRD+2B13FBgW+DOqbJCwCb3CiQY50a/a2CVRzulll2colmUdljsCTjta1JguY209i7i5iLGZdX/pox9GSOb6oyAKXURTtvvGtlwxTwtkY+ISofRMghCIDGNJimGOIWMoJIII+A8telqM5kpxeO4Pif60Lxk2v9SBO+YPowSSI/A==

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



Msu6H7

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/htA0GtMafvAD28vTm6CLwXg01d1xLBhJ>

