



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

**Asociación de las adipocinas lipocalina-2,
resistina, leptina e interleucina-6 con la
alteración de parámetros metabólicos en
pacientes diabéticos.**

T E S I S

**Que para obtener el grado de
Maestra en Biología Experimental**

P R E S E N T A

Biol. Exp. Nancy Yuritzi Espino Rivera

Codirección:

Dra. Elsa de la Chesnaye Caraveo

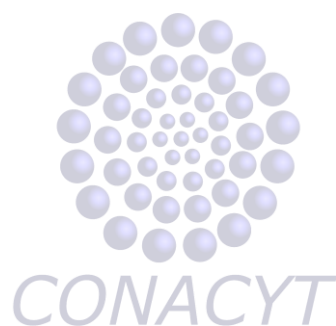
Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz

Asesoría:

Dra. Leticia Manuel Apolinar



México D.F., 2012.



**EL APOYO OTORGADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y
TECNOLOGÍA (CONACYT), SE TRADUCE EN LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE
PROYECTO [No. de becario: 24862], EL CUAL FUE REALIZADO EN VINCULACIÓN
CON EL HOSPITAL DE CARDIOLOGÍA Y ESPECIALIDADES DE CENTRO MÉDICO
NACIONAL, S.XXI, IMSS .**

Comité Tutoral

Codirector Externo

Dra. Elsa de la Chesnaye Caraveo

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Metabólicas

Hospital de Cardiología.

C.M.N., S.XXI, IMSS

Codirector Interno

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz

Departamento de Ciencias de la Salud, DCBS

UAM-I

Asesor

Dra. Leticia Manuel Apolinar

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endócrinas

Hospital de Especialidades.

C.M.N., S.XXI, IMSS

DEDICATORIA

Al pilar de mi vida y quien llegó a ilumina mi camino...

Nuez y Max

A quienes día a día con su amor, paciencia y entusiasmo constante, navegaron a mi lado...

Familia y amigos

A quienes me brindaron confianza y apoyo, impulsándome a crecer atreves de su calidez humana y excelencia profesional...

Elsa, Lety, Conchita

y

Equipo de trabajo

A quienes me permitieron capturar una sonrisa durante ésta trayectoria, enriqueciendo y permitiéndome culminar una meta tan especial en mi vida...

What is a scientist after all?

It is a curious man looking through a keyhole,

the keyhole of nature, trying to know what's going on....

*Jacques-Yves Cousteau **

RESUMEN

Introducción

La prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) ha incrementado a nivel mundial en la última década. Así mismo, es reconocido, que el exceso de tejido adiposo (TA) es uno de los factores principales que contribuyen al desarrollo de esta patología, ya que participa en la homeóstasis energética y en la producción de adipocinas. Diferentes grupos de investigación han señalado que la inflamación sistémica, en la que participan los adipocitos hiperplásicos o hipertróficos y los macrófagos infiltrados, puede mediar el desarrollo de DM2; lo que ha derivado en la cuantificación de los niveles de adipocitocinas en sangre y su asociación con el desarrollo de esta patología.

Estudios recientes han reportado el aumento de los niveles séricos de una adipocina denominada Lipocalina 2 (LCN2) en personas obesas y con DM2; sin embargo, no existen estudios al respecto en la población mexicana que confirmen esta asociación; por lo tanto, consideramos relevante caracterizar la asociación que existe entre la alteración de los niveles de esta proteína en el plasma con la presencia de DM2.

Objetivo

Cuantificar y analizar su asociación de los niveles plasmáticos de LCN2 con leptina, resistina, interleucina-6 (IL-6) y adiponectina en sujetos sanos y pacientes diabéticos.

Sujetos y Métodos

Se incluyeron 107 sujetos adscritos al Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, agrupados en casos (prediabéticos y diabéticos) y controles.

De cada paciente se obtuvieron mediciones antropométricas (peso, talla) y una muestra de sangre periférica y a partir del plasma, se determinaron mediante ensayo inmuno-enzimático (ELISA), los niveles de LCN2, leptina, interleucina-6 y resistina, mientras que por radioinmunoensayo (RIA) se cuantificaron los niveles de adiponectina e insulina. Además, a cada paciente se le cuantificó los parámetros antropométricos como índice de masa corporal (IMC) y parámetros metabólicos

correspondientes a glucosa, hemoglobina glucosilada (Hb_{A1C}), Triglicéridos (TGL), Lipoproteína de alta densidad (HDL), Lipoproteína de baja densidad (LDL) y colesterol (COLT).

Resultados

Los niveles plasmáticos de LCN2 en los grupos de estudio fueron: 70.81 ng/mL (C); 65.8 ng/mL (Pd) y 42.36 ng/mL (Db); asimismo, se observaron diferencias de dichos niveles entre géneros (C: ♂100.41 ng/mL vs ♀50.54 ng/mL) y (Db: ♂26.77 ng/mL vs ♀39.7 ng/mL).

Los niveles de LCN2 en Db presentaron una correlación negativa con el IMC*, Hb_{A1C}*, TGL**, HOMA-IR**, LDL**, COL** e Insulina***; mientras que en C y Db la correlación entre LCN2 con HDL** y edad**, fue positiva. Por último, en ambos grupos de estudio, la LCN2 se asocia negativamente con leptina*, IL-6 y resistina, y positivamente con adiponectina*, (*p<0,05, **p<0,01 y ***p< 0,001), respectivamente.

Conclusiones

Los niveles de LCN2 disminuyen significativamente en pacientes diabéticos; la concentración de LCN2 presenta un dimorfismo sexual, siendo mayor el nivel de esta proteína en el plasma en hombres que en mujeres sanos. Las alteraciones metabólicas relacionadas con la DM2, como son la resistencia a insulina, Hb_{A1C} y glucosa se asocian negativamente con la LCN2, asimismo con las adipocinas pro-inflamatorias y con IMC. Debido a que los niveles de Adiponectina al igual que los de LCN2 disminuyeron en pacientes diabéticos y más aún, la correlación positiva observada, nos permiten sugerir que la LCN2 actúa como molécula anti-inflamatoria.

ABSTRACT

Introduction

The prevalence of type 2 diabetes mellitus (T2DM) has increased, it is known that increased adipose tissue mass is one of the main factors that contributes to the development of this disease, where energy homeostasis and adipocytokines production are present. Different research groups have shown that systemic inflammation, in which hyperplastic adipocytes and infiltrated macrophages participate, can mediate the development of T2DM; which in fact has led to the quantification of adipocytokines levels in blood and the association of such levels with the development of this pathology.

Recent studies have reported increased levels of a serum adipocytokine called lipocalin 2 (LCN2) in obese and T2DM subjects; however, no studies on this subject have been done in the Mexican population, therefore, we considered relevant to characterize the association between increased altered levels of this protein in the plasma in T2DM patients.

Objective

To determine plasma levels of lipocalin 2 (LCN2) and to assess its association with metabolic parameters and plasma levels of leptin, resistin, interleukin-6 and adiponectin in control subjects and diabetic patients.

Methods

We included 107 adult patients assigned to the Cardiology Hospital from Centro Médico Nacional Siglo XXI, grouped in cases (diabetic (Db) & prediabetic (Pd)) and controls (C). For each patient, a sample (5 ml) of peripheral blood was drawn and from plasma, LCN2, leptin, interleukin-6 and resistin levels were determined by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Otherwise, adiponectin and insulin concentrations were quantified by Radio Immuno Assay (RIA).

Results

The mean of circulating Lipocalin-2 concentration in the control population (C) was higher than the one in diabetic patients (Db) (70.81 ng/mL vs 42.36 ng/mL); we also observed differences between genders (C: ♂100.41 ng/mL vs ♀50.54 ng/mL) y (Db: ♀39.7 ng/mL vs ♂26.77 ng/mL). In Db patients, we observed a strong negative correlation between LCN2 levels and BWI*; Hb_{A1C}*; Triglycerides**; HOMA-IR**; LDL **; CHOL **; Insulin***, while LCN2 in both groups (C and Db) had a positive correlation with HDL cholesterol** and Age**.

Finally, in both groups of study, lipocalin-2 concentrations were negatively correlated with the proinflammatory adipocytokines (Leptin*, Interleukin-6, Resistin) and BMI, whereas that Adiponectin* (an anti-inflammatory protein) correlated positively, (*p<0,05, **p<0,01 y ***p< 0,001) respectively.

Conclusions

LCN2 plasma levels significantly decreased in diabetic subjects; LCN2 concentration shows a sexual dimorphism, being higher in men than women in control subjects and conversely in diabetics. The metabolic changes associated with T2DM, demonstrated to be crucial in balancing the levels of this protein. Otherwise, the negative association of LCN2 with pro-inflammatory adipocytokines suggests that LCN2 may act as an anti-inflammatory protein, data confirmed by observing a decreased level of Adiponectin and LCN2 in diabetic patients and the positive correlation between them.

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

ABREVIATURAS..... 17

UNIDADES DE MEDICIÓN CUANTITATIVA..... 19

INTRODUCCIÓN

1. Diabetes..... 20

2. Factores ambientales y genéticos..... 21

3. Factores de riesgo..... 22

4. Etiología de la Diabetes mellitus tipo 2..... 23

5. Relación Diabetes y Obesidad..... 24

5.1 Mecanismo de la resistencia a la insulina..... 25

6. Participación de las citocinas en el proceso de
Inflamación..... 26

7. Adipocinas

7.1 Leptina..... 28

7.2 Resistina.....	30
7.3 Interleucina 6.....	31
7.4 Adiponectina.....	31
7.5 Lipocalina 2.....	32
7.5.1 LCN2 y resistencia a la insulina.....	34
7.5.2 Estudios Clínicos sobre LCN2 y su relación con la obesidad.....	35
JUSTIFICACIÓN.....	37
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	38
MÉTODOS	
PACIENTES	
1. Criterios de inclusión	
1.1 Casos y Controles.....	39
2. Criterios de exclusión y eliminación.....	40
3. Definición de Variables.....	42

4. Muestreo y procedimientos.....	43
-----------------------------------	----

TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

1. Ensayo inmuno-enzimático(ELISA).....	45
1.1 Cuantificación de LCN2.....	47
1.2 Cuantificación de adipocinas pro-inflamatorias.....	50
1.3 Cuantificación de IL-6, Resistina, Leptina.....	52
2. Radioinmunoanálisis (RIA).....	53
2.1 Cuantificación de insulina y adiponectina.....	54

ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... 56

RESULTADOS

1. Evaluaciones antropométricas y bioquímicas.....	57
2. Cuantificación de niveles plasmáticos de LCN2	57
3. Comparación de los niveles de LCN2 entre género	59
4. Correlaciones de LCN2 con parámetros antropométricos y perfil lipídico.....	61

5. LCN2 y otras adipocinas.....	66
6. Correlación de LCN2 y adipocinas.....	67
DISCUSIÓN.....	70
CONCLUSIÓN.....	76
REFERENCIAS.....	78

ABREVIATURAS

(ADA) Asociación Americana de Diabetes

(ADN) Ácido Desoxirribunocléico

(ARN) Acido Ribonucléico

(ARNm) Ácido Ribonubocléico Mensajero

(COLT) Colesterol

(DM2) Diabetes Mellitus tipo 2

(ELISA) ensayo inmuno-enzimático

(Hb_{A1C}) hemoglobina glucosilada

(HDL) Lipoproteína de alta densidad

(HOMA-IR) Homeostatic Model Assessment-insulin resistance

(IL-6) Interleucina 6

(IMC) Índice de masa corporal

(LCN2) Lipocalina 2

(LDL) Lipoproteína de baja densidad

(MexDiab) Estudio Mexicano para la Prevención de la Diabetes

(MMP-9) Metaloproteasa de Matriz 9

(NF- κ B) Factor Nuclear- κ B

(NGAL) Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin

(OMS) Organización Mundial de la Salud

(PCR) Proteína C-Reactiva

(PCR) Reacción en cadena de la polimerasa

(PI3-K) Inositol trifosfato cinasa

(PPAR-g) Receptor Activado por Proliferación de Peroxisomas gama

(RPB4) Proteína transportadora de retinol tipo 4

(SM) Síndrome Metabólico

(TAB) Tejido Adiposo blanco

(TGL) Triglicéridos

(TNF α) Factor de Necrosis Tumoral alfa

UNIDADES DE MEDICIÓN CUANTITATIVA

($\mu\text{g}/\text{mL}$) microgramos por mililitro

(μL) microlitros

(D.O.) Densidad Óptica

(g) gramos

(kg/m^2) kilogramo por metro al cuadrado

(mg/dL) miligramos por decilitro

(mL) mililitros

(pg/mL) picogramos por mililitro

($\mu\text{U}/\text{mL}$) microunidades por mililitro

INTRODUCCIÓN

La prevalencia de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) en México es de 10.7, en población mayor de 20 años, lo que representa que 6.8 millones de personas en nuestro país, padecen esta enfermedad (1). Asimismo, datos obtenidos del Estudio Mexicano para la Prevención de la Diabetes (MexDiab), revelaron una prevalencia tanto de la alteración de la glucosa en ayuno, como de la tolerancia a la glucosa y de la combinación de ambas de 24.6%, 8.3% y 10.3%, respectivamente en sujetos obesos. En este sentido, los autores de este estudio llegaron a la conclusión de que una alta proporción de sujetos sin sobrepeso, presentan prediabetes (2).

1. Definición de Diabetes mellitus

La DM2, se define como una enfermedad sistémica, crónico-degenerativa, de etiología múltiple, con grados variables de predisposición hereditaria y la presencia de diversos factores, principalmente la hiperglucemia crónica (3), debido a una deficiencia en la producción o acción de la insulina, lo que propicia al desarrollo de alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono, de las grasas y las proteínas, que pueden favorecer la aparición de complicaciones agudas (cetoacidosis,

hiperosmolaridad) o crónicas (micro y macroangiopatía: renal, nerviosa, cardiovascular) (4).

2. Factores genéticos y ambientales implicados en el desarrollo de DM2

Alteraciones genéticas: se conoce que cuando una persona es diabética, la posibilidad de un familiar directo de heredar ésta patología es del 90%. Aunado a lo anterior, se han identificado alteraciones descritas como anomalías de la insulina asociadas con diferentes cromosomas como el 7, el 12 y el 20 (5). Lo anterior constituye una herencia poligénica o multifactorial, que en conjunto con factores exógenos como la dieta, el sobrepeso y el sedentarismo conducen al desarrollo de diversas patologías del metabolismo. Un claro ejemplo de lo anterior es el síndrome metabólico (SM), el cual se considera una enfermedad poligenética, en la que, diferentes alelos susceptibles a ciertos factores de riesgo, actúan de forma sinérgica para alterar procesos metabólicos que conllevan al desarrollo de dicha patología (5).

Insulinorresistencia: se refiere a una menor captación de glucosa en los tejidos periféricos mediada por la insulina. De igual forma, la secreción de insulina mediada por glucosa disminuye (5, 6).

3. Factores de riesgo

Dentro de los factores de riesgo que se asocian con la DM2 y que permiten determinar, la probabilidad de desarrollar esta patología o de sus complicaciones, son (6):

- ✓ Antecedentes familiares de diabetes en parientes en primer grado: padres, hijos.
- ✓ Sobrepeso u obesidad [índice de masa corporal (kg/m^2) ≥ 25].
- ✓ Alteración de los niveles de glucosa en ayuno ($> 126 \text{ mg}/\text{dL}$).
- ✓ Intolerancia a la glucosa: hiperglucemia 2 horas después de la prueba oral de tolerancia a glucosa ($> 200 \text{ mg}/\text{dL}$).
- ✓ Hipertensión ($\geq 140/90 \text{ mmHg}$).
- ✓ Dislipidemia [HDL colesterol ($< 35 \text{ mg}/\text{dL}$) y/o triglicéridos ($> 250 \text{ mg}/\text{dL}$)].
- ✓ Ovario poliquístico.

4. Etiología de la Diabetes mellitus tipo 2

La Fisiopatología de la DM2 es compleja e implica la interacción de factores ambientales y genéticos, aunque existen tres alteraciones constantes (7):

- Resistencia a la acción de la insulina en los tejidos periféricos: músculo esquelético, tejido adiposo e hígado.
- La Secreción alterada de la insulina en respuesta al estímulo con glucosa.
- Aumento en la producción de glucosa hepática.

Considerando lo anterior y que en la actualidad, los cambios en los estilos de vida, principalmente en la alimentación y el sedentarismo, están favoreciendo la presencia de la obesidad y la dislipidemia (8), que si bien tienen aspectos genéticos subyacentes, la influencia del medio ambiente es innegable.

Lo anterior se refleja en los datos provenientes de la Encuesta Nacional de Salud 2006, los cuales, muestran una situación alarmante en cuanto al aumento de la obesidad en nuestro país. México ocupa el primer lugar a nivel mundial, siendo el índice de obesidad en adultos de 29.3%, mientras que el sobrepeso asciende a casi el 40%, lo que implica que 7 de cada 10

adultos ya tienen sobrepeso. Más preocupante aún, son los índices de obesidad entre la población infantil y en los adolescentes. Lo anterior permite pronosticar que en un futuro cercano, habrá un aumento en los índices de obesidad en adultos y consecuentemente en las patologías asociadas, incluyendo DM2 (8).

5. Relación Diabetes y Obesidad

El humano ha evolucionado bajo condiciones de estrés en las que era ventajoso ser capaz de ahorrar energía (9). La obesidad es una respuesta de nuestra biología al confrontarla a un estilo de vida moderno obesogénico, con hábitos alimenticios poco saludables junto a un aumento en el sedentarismo. Esto último ha surgido con rapidez inusitada al abrigo del desarrollo de la tecnología, que incluso ha propiciado una actitud negativa hacia la actividad física, sin que haya sido posible una adaptación evolutiva a la par del desarrollo creado por el propio ser humano (10).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en el mundo hay más de 1,000 millones de personas con sobrepeso, de las cuales 300 millones son obesos. Asimismo, este organismo, ha declarado a la obesidad como el mayor problema crónico de salud entre los adultos, cuya relevancia a nivel mundial, superará a la desnutrición (11,12).

En la actualidad, la mayoría de los estudios han demostrado que la obesidad central representa un factor de riesgo importante para el desarrollo de DM2 y/o cardiopatías, al promover la resistencia a la insulina (13).

5.1 Mecanismo de la resistencia a la insulina

A nivel biológico, la activación de la lipólisis en el tejido graso visceral, conlleva al incremento en plasma de los niveles de triglicéridos (TGL) y de ácidos grasos libres (AGL); dicho incremento promueve el transporte de los mismos vía portal, hacia diferentes tejidos no grasos, como el hígado, el corazón y el páncreas (14). El incremento en la concentración de triglicéridos y ácidos grasos libres, constituye un factor importante en el desarrollo de la resistencia a la insulina, que al disminuir la acción de esta hormona tanto en el músculo esquelético como en el hígado, inhibiendo en el primero la utilización de la glucosa y estimulando en el segundo, la producción de la misma ocasiona de forma subsecuente, el incremento de la gluconeogénesis en el hígado y la disfunción de las células β del páncreas (9); esto último conlleva a una disminución en la producción de insulina y por tanto a la hiperglucemia crónica que precede a un estado prediabético, lo que a su vez conduce al desarrollo de DM2 (14, 15).

El mecanismo principal de la resistencia a la insulina en pacientes diabéticos, es la alteración del transporte de glucosa que se caracteriza por

defectos de la expresión de enzimas intracelulares y de la translocación de GLUT4 (*receptor transportador de glucosa*, por sus siglas en inglés) por alteraciones en la actividad del receptor de insulina (RI), los sustratos de RI (IRS)-1 e (IRS)-2 y la cinasa de fosfoinositol trifosfato (PI3-K, por sus siglas en inglés) (19).

Estudios realizados en humanos y en modelos animales han demostrado una relación estrecha entre la obesidad y un estado de inflamación crónica de bajo grado, esta última, caracterizada por la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo y un aumento en las concentraciones plasmáticas de proteínas pro-inflamatorias (16-18).

En el estado pro-inflamatorio asociado con la obesidad, la expansión del tejido adiposo desempeña un papel determinante, debido a que los adipocitos y macrófagos que migran a dicho tejido, producen y secretan una gran variedad de mediadores biológicamente activos (adipocinas), los cuales se considera contribuyen al desarrollo de la resistencia a insulina, DM2 y enfermedades cardiovasculares (13).

6. Participación de las citocinas en el proceso de Inflamación

El tejido adiposo y el adipocito tienen un papel fundamental en este proceso de inflamación, mediante la producción de múltiples adipocinas, algunas clásicas y otras de reciente descripción, de las que hasta ahora empieza a dilucidarse su función en medio del complejo panorama de

interacciones fisiopatológicas conducentes al desarrollo de resistencia a la insulina y del complejo desequilibrio metabólico que conlleva un sinnúmero de complicaciones clínicas (18). Un grupo de estas adipocinas (IL-6 o bien TNF α) tiene claros efectos pro-inflamatorios, mientras que otras pueden clasificarse como anti-inflamatorias (adiponectina), las cuales contrarrestan en cierta medida y hasta cierto punto las acciones de las pro-inflamatorias. Cuando esta homeostasis se rompe, es decir hay un desequilibrio en la síntesis de cada molécula, se presenta la inflamación crónica, la cual desencadena la resistencia a la insulina que inicia con el desarrollo del síndrome metabólico a partir de la obesidad, que a su vez genera alteraciones de la respuesta del adipocito a diferentes estímulos. Esto, sumado a los efectos de otros elementos, configura un complejo cuadro de factores que es necesario tener en cuenta para el abordaje correcto de la obesidad y las patologías asociadas. En la actualidad se trabaja en la identificación y evaluación de marcadores circulantes, precisos en el diagnóstico, durante fases tempranas del SM o la DM2, cuando los cambios fisiológicos pueden ser reversibles (13). Entre los marcadores que se ha hipotetizado podrían asociarse a la obesidad o síndrome metabólico se incluyen citocinas pro-inflamatorias, moléculas de adhesión celular y adipocinas.

7. Adipocinas

En la actualidad se conoce que diferentes citocinas sintetizadas por los adipocitos (denominadas adipocinas o adipocitocinas), tales como leptina, resistina, IL-6, TNF- α , adiponectina y la proteína transportadora de retinol tipo 4 (RBP4) pueden inducir resistencia a la insulina (21, 22), debido a que uno de los principales efectos de las adipocinas es la homeostasis metabólica ya sea sensibilizando o desensibilizando la acción de la insulina en los diferentes tejidos blanco. De acuerdo a su activación, estas moléculas se clasifican como pro-inflamatorias y anti-inflamatorias (23).

7.1 Leptina

La leptina es una de las adipocinas que se sintetiza y secreta en el tejido adiposo, cuya concentración plasmática es directamente proporcional a la masa del tejido adiposo. Asimismo algunas células inmuno-competentes y endoteliales también secretan leptina, aunque en menor proporción (24, 25).

Inicialmente, la leptina se describió como la hormona de la obesidad porque sus niveles plasmáticos se correlacionan estrechamente con la cantidad de grasa corporal del individuo (26) y con la circunferencia abdominal (27); sin embargo, la investigación en torno a esta hormona ha definido su participación en diversos procesos, desde la regulación de la inmunidad hasta la modulación del eje hormonal reproductivo (28, 38).

Por otro lado, se conoce que la leptina regula la secreción de otras adipocinas como IL-6 y TNF- α (29). Se ha observado que en el tejido adiposo de roedores y de humanos, TNF α , citocina producida por las células del sistema inmune y por el tejido adiposo, estimula la expresión de la leptina y ésta a su vez retroalimenta la producción de TNF α y éste estimula la producción de IL-6 y la inhibición de PPAR γ (receptor activado por proliferadores de peroxisomas tipo gamma), que es el regulador de adiponectina, produciendo un aumento en las citocinas pro-inflamatorias y un descenso en las anti-inflamatorias (adiponectina) (30). PPAR γ se expresa principalmente en el tejido adiposo donde constituye un regulador principal de la diferenciación adipocitaria y participa en la homeostasis glucídica (31, 32). Sin embargo, también se expresa en riñón y vasos sanguíneos por lo que se le ha supuesto un papel en la regulación del tono vascular (33). Algunas de las variantes alélicas y mutaciones caracterizadas en el gen PPAR γ humano se han asociado con la obesidad, la hipertensión arterial y la hipertensión arterial relacionada con la obesidad (34-36).

Las citocinas desreguladas por la leptina participan en la generación de resistencia a la insulina. TNF α produce una fosforilación en el receptor de insulina y en los IRS (por sus siglas en inglés insulin receptor substrates), provocando alteraciones en la unión de insulina con su receptor y en la señalización que desencadena esta unión, concluyendo con resistencia a la

insulina (32). Asimismo, la leptina, estimula la lipólisis en el adipocito y la liberación de ácidos grasos a tejidos periféricos, músculos e hígado donde se oxidan. Por último, estimula la termogénesis en el TA al inducir la expresión de la proteína desacopladora mitocondrial UCP-1, la cual actúa como un transportador de protones, provocando la generación de calor; asimismo, se ha propuesto que ésta proteína participa en el control del gasto energético (39).

7.2 Resistina

Es una proteína que se secreta en el tejido adiposo blanco (TAB), también conocida como ADSF (siglas en inglés de Adipose Tissue Specific Secretory Factor) (39), se sintetiza en células inmunocompetentes (40, 41) y principalmente en macrófagos (41, 42). Su expresión se correlaciona con la resistencia a la insulina; se ha reportado que en ratones tratados con resistina recombinante disminuyeron la sensibilidad a la insulina. El tratamiento de adipocitos de la línea celular 3T3-L1 con resistina también disminuye el transporte de glucosa estimulado por la insulina (43). Asimismo, estudios recientes han demostrado que tanto la expresión de la resistina en el TAB como sus concentraciones séricas se encuentran aumentadas en individuos obesos y con DM2 (44, 45). Sin embargo, el mecanismo mediante el cual la resistina provoca esta RI tanto *in vivo* como *in vitro* aún se desconoce (46).

7.3 Interleucina-6

La interleucina 6 (IL-6) es una adipocitocina pro-inflamatoria que secretan diversos tejidos, entre ellos el tejido adiposo, principalmente el visceral, siendo este último responsable de la secreción del 15% a 30% del total de esta adipocina en el organismo, lo cual fundamenta el que la obesidad abdominal constituya un factor de riesgo para el desarrollo de síndrome metabólico. Asimismo, se considera un factor de riesgo cardiovascular y sus niveles también se encuentran elevados (de la misma forma que IL-8 y TNF α), en individuos resistentes a la insulina, sean obesos o no (47). IL-6 induce hipertrigliceridemia en la obesidad al aumentar las VLDL y está implicada en la inducción de resistencia hepática a la insulina (48, 49).

La IL-6 tiene un efecto directo sobre la sensibilidad a la insulina por varios mecanismos; después de que el TAB la secreta a los depósitos viscerales, esta adipocina llega al hígado y estimula la secreción hepática de TGL y la gluconeogénesis (50).

7.4 Adiponectina

La adiponectina, que también se conoce como adipoQ, ACRp30, apM1, o GBP28 (51), se sintetiza principalmente en el adipocito (52) y lleva a cabo diversas acciones metabólicas en los tejidos (músculo esquelético e hígado), las cuales consisten en el incremento de la oxidación de AGL y la reducción

de la gluconeogénesis (53). Estas acciones se realizan a través de dos receptores denominados adipoR1 y adipoR2, el primero de expresión general y el segundo primordialmente de expresión hepática (54).

Sus efectos están mediados por el incremento de la actividad de la PKA (proteína cinasa dependiente de AMP cíclico) (53). La activación de la PKA induce la expresión de PPAR γ (55), así como de las enzimas de la cascada de la oxidación de ácidos grasos y de otras proteínas involucradas en la captación de glucosa, lo cual explica el incremento de la actividad de insulina inducido por esta hormona (56). Tiene actividad insulina-sensibilizante, anti-inflamatoria y anti-aterogénica (33). Recientemente se han descubierto además, funciones cardio y hepatoprotectoras. De manera contrastante con las otras adipocinas, la expresión de adiponectina y sus concentraciones en el plasma no se encuentran aumentadas sino más bien disminuidas tanto en la resistencia a la insulina como la obesidad (57, 58).

7.5 Lipocalina 2

Entre las adipocinas que son de reciente investigación se encuentran varias proteínas pertenecientes a la familia de las lipocalinas. Esta familia incluye más de 20 proteínas solubles de bajo peso molecular. La mayoría de ellas transportan a otras proteínas o moléculas (principalmente de carácter hidrofóbico) entre las que se encuentran, hormonas lipídicas como las

hormonas tiroideas, las vitaminas lipídicas (complejo vitamínico A), ácidos grasos, ácidos biliares, así como feromonas y hierro (59). Algunas lipocalinas, participan en, la coloración críptica en invertebrados, la olfacción, la síntesis de prostaglandinas, la regulación de la respuesta inmune (59, 60).

Aún cuando existe una baja homología entre las secuencias de nucleótidos correspondientes a las diversas proteínas que comprenden esta familia (sólo 20%), la mayoría de ellas presentan tres sitios proteínicos conservados, los cuales conforman una estructura en forma de barril compuesta por ocho cadenas beta-plegadas anti-paralelas, unidas covalentemente entre sí. Esta estructura anti-paralela, forma una cavidad semejante a un cáliz, a la cual se unen una gran variedad de moléculas que definen la actividad biológica de las lipocalinas (61).

La lipocalina 2 (LCN2) o lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL), (siglas en inglés para: neutrophil gelatinase associated lipocalin), también denominada siderocalina, uterocalina o 24p3 (62), es una proteína con un peso molecular de 25 kDa, cuyo gen se ubica en el cromosoma 9q34. LCN2 se identificó inicialmente en los neutrófilos humanos (63), por su unión covalente con la metaloproteasa de matriz 9 (MMP-9) presente en los mismos, cuya secreción se activa cuando se presenta un proceso inflamatorio o infeccioso (64).

7.5.1 LCN2 y resistencia a la insulina

Diversos estudios han reportado una concentración plasmática elevada de la proteína LCN2 en diferentes tipos de cánceres humanos como: cáncer de mama (65), colorectal (66), pancreático (67) y cáncer de ovario (68). De igual forma, se ha identificado un aumento en la concentración de esta proteína tanto en la orina como en el plasma de pacientes con daño renal agudo, secundario a la administración de agentes quimioterapéuticos o medicamentos postoperatorios (62).

Por otra parte, estudios moleculares en los que se emplearon glucocorticoides e insulina para la diferenciación de células pre-adipocíticas 3T3-L1, demostraron que la expresión relativa del gen *Lcn2* aumenta conforme progresa la diferenciación de dichas células (69). De igual forma, tejidos murinos expuestos al TNF- α , mostraron que el gen correspondiente a la LCN2 es uno de los que presenta un mayor índice de expresión. Es importante mencionar que los resultados de este estudio sugieren que la LCN2 promueve la resistencia a la insulina, ya que la degradación postranscripcional del ARNm correspondiente a *Lcn2*, mediante la transfección de adipocitos, ocasionó en las células transfectadas, un incremento en la captación de glucosa, tanto en estado basal, como posterior a la estimulación con insulina. Un efecto similar se observó en una línea celular de hepatocitos, cultivada

con LCN2 exógeno. Aunado a lo anterior, estos autores reportaron el aumento en los niveles de esta proteína en el plasma de diferentes modelos de obesidad murinos, en contraste con los niveles observados en los ratones delgados (69).

De igual forma, Zhang y cols. (2008) (70), reportaron datos similares con respecto al incremento en la expresión del ARNm para la LCN2 tanto en modelos de obesidad, como durante la diferenciación de líneas celulares de adipocitos.

7.5.2 Estudios clínicos sobre LCN2 y su relación con la obesidad

Wang y cols. (2007) (71), cuantificaron los niveles plasmáticos de LCN2 en sujetos de origen asiático, y los resultados obtenidos mostraron una concentración elevada de esta proteína en los pacientes con obesidad, en comparación con los niveles de la misma en el plasma de los sujetos delgados. Además, la concentración elevada de esta proteína en los sujetos obesos, se correlacionó positivamente ($p < 0.005$) con la presencia de hipertrigliceridemia, hiperglicemia, resistencia a la insulina y diabetes. Asimismo, las concentraciones elevadas de LCN2 tuvieron una asociación positiva con altos niveles de proteína C-reactiva (PCR), esta última considerada como un marcador de inflamación crónica.

Los mecanismos adicionales que vinculan a LCN2 con la inflamación, pueden estar relacionados con características estructurales, las cuales permitirán la unión y transporte de otras moléculas (22).

Debido a que el papel de LCN2 en la obesidad no ha sido definido, Auguet y cols. (2011) (72), cuantificaron y asociaron los niveles de LCN2 con adipocinas pro-inflamatorias en mujeres con IMC ≥ 40 kg/m²; sus resultados muestran un incremento en los niveles de la proteína en las mujeres obesas en comparación con las delgadas ($p < 0.05$); asimismo, los niveles elevados se asociaron con IMC. Sin embargo, no se mostró asociación con adipocinas pro-inflamatorias (Resistina, IL-6 y TNF α).

Aún cuando se observa en algunos estudios una relación directa de LCN2 con la inflamación, la obesidad y componentes del síndrome metabólico, el papel específico de ésta proteína aún no se ha esclarecido.

JUSTIFICACIÓN

En la población mundial, la prevalencia de los componentes del SM va en aumento; más importante aún, la prevalencia ajustada para DM2 e hipertensión arterial en la población mexicana es superior a la población estadounidense (73).

La prevención de las alteraciones metabólicas representa una alternativa para contrarrestar el impacto social y económico que estas generan. La diabetes representa una de las enfermedades de prioridad en el sector salud, por lo tanto, es importante conocer y analizar las alteraciones que se derivan del aumento del tejido adiposo. En este sentido, las adipocinas son las moléculas involucradas en el desarrollo de procesos inflamatorios, al aumentar los niveles periféricos de lípidos y con esto inducir la resistencia a insulina, además, de producir otras complicaciones cardiovasculares. Por lo tanto, analizar los niveles plasmáticos de diversas adipocinas constituye una alternativa en la predicción para desarrollar DM2.

Debido a que los estudios correspondientes a la asociación de los niveles de LCN2 con la DM2 son contradictorios; aunado a que no hay reportes científicos respecto a la asociación de esta adipocina con componentes de SM o DM2 en la población mexicana; consideramos relevante caracterizar la relación que existe entre los niveles de esta proteína en pacientes mexicanos con la presencia de DM2.

OBJETIVOS

Objetivo principal

Determinar en un grupo de la población mexicana, si existe una asociación entre la alteración de los niveles de la LCN2 con la presencia de DM2 y con adipocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias.

Objetivos específicos

A partir de pacientes pareados por género que cumplan con los criterios predeterminados, se pretende:

- ✓ Determinar los niveles plasmáticos de LCN2 en sujetos diabéticos y sanos.
- ✓ Realizar la asociación de los niveles plasmáticos de la LCN2 con el género y con diversos parámetros metabólicos de ambos grupos.
- ✓ Determinar la asociación de los niveles plasmáticos de LCN2 con los correspondientes a Leptina, Resistina, IL-6 y adiponectina en ambos grupos.

HIPÓTESIS

Los niveles plasmáticos de lipocalina 2 están alterados en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y dicha alteración se relaciona con adipocinas pro-inflamatorias y con la resistencia a insulina presentes en la diabetes.

Pacientes

En el presente trabajo, se incluyeron pacientes trabajadores del Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social; invitados a participar a través del servicio de Fomento a la Salud de dicha Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE).

Criterios de inclusión

Casos

- Pacientes agrupados por género que acepten participar en el estudio y firmen el consentimiento informado.
- Que cumplan con los criterios diagnóstico para sobrepeso u obesidad [IMC (kg/m²) \geq a 25 ó \geq a 30] respectivamente; así como para prediabetes o DM2, conforme a los criterios para los niveles de glucosa en ayuno [\geq 100 mg/dL - \leq 126 mg/dL] y para diabéticos [$>$ 127 mg/dL]; establecidos por la ADA (4).

Controles

- Sujetos de ambos géneros que acepten participar en el estudio y firmen el consentimiento informado.

- Que no tengan los criterios para sobrepeso u obesidad [IMC (kg/m^2) \geq a 18.5 y \leq a 24.99], asimismo, que no presenten alteraciones en el metabolismo de glucosa y lípidos (4).

Criterios de exclusión

- Pacientes con antecedente de otras patologías metabólicas crónicas que puedan manifestarse clínica o bioquímicamente, o bien interferir con los niveles en suero de la adipocina de estudio, como neoplasias, falla renal crónica o aguda, etc. (**Cuadro 1**).

Criterios de Eliminación

- Pacientes que retiren su consentimiento informado.
- Muestra de suero insuficiente.

Cuadro 1. Criterios de no Inclusión

<p>Causas secundarias de inflamación crónica</p>	<p>Enfermedades:</p> <p>Falla renal crónica, síndrome nefrótico, hipotiroidismo, enfermedades autoinmunes, aterosclerosis, tuberculosis, fibrosis pulmonar, cáncer, lupus, síndrome de Cushing, cualquier tipo de infección ocasionada por bacterias, virus y hongos.</p> <p>Medicamentos:</p> <p>Corticoesteroides, agentes beta bloqueadores, estrógenos, tiazidas, isotretinoína, ciclofosfamida, psicotrópicos.</p> <p>Tabaquismo mayor de 10 cigarrillos diarios, alcoholismo mayor de 30 cc diarios.</p>
<p>Otras causas de hiperglucemia</p>	<p>Enfermedades:</p> <p>DM1, acromegalia, síndrome de Cushing, glucagonoma, feocromocitoma, hipertiroidismo, somatostatina, aldosteronoma.</p> <p>Medicamentos:</p> <p>Pentamidina, ácido nicotínico, glucocorticoides, hormonas tiroideas, agonistas beta adrenérgicos, diazóxido, tiazidas, interferón alfa.</p>

Definición de las Variables

Variable	Conceptual	Operativa	Escala	Categoría
Obesidad	Enfermedad de origen multifactorial en la cual las reservas energéticas almacenadas en el tejido adiposo se incrementan hasta un punto donde esta enfermedad se asocia con otras alteraciones en la salud y con un incremento en el índice de mortalidad. Es componente del síndrome metabólico y se caracteriza por un aumento en el índice de masa corporal y en el perímetro abdominal	De acuerdo a la Asociación Americana de Diabetes, la obesidad se determina por un índice de masa corporal IMC kg /m² . igual o mayor a 30	Cuantitativa	Kg/m ²
Prediabetes	Se refiere a la alteración metabólica en donde se presentan niveles de glucosa en sangre, por encima de los valores normales establecidos por la Asociación Americana de Diabetes, sin llegar a los establecidos para el diagnóstico de diabetes mellitus	Componentes de la Prediabetes: Alteración de los niveles de glucosa en ayuno. Alteración de los niveles de glucosa posprandial. Valores de diagnóstico: glucosa en ayuno (≥100 mg/dL-≤126 mg/dL)	Cuantitativa	mg/dL
LCN2	Proteína de secreción de 25 kDa que forma parte de la superfamilia de las lipocalinas y es producida por macrófagos, adipocitos, entre otros. Actualmente, es considerada como un marcador de falla renal.	Determinación de niveles séricos de LCN 2 por técnica de ELISA	Cuantitativa	ng/dL

Muestreo

Para realizar este estudio, se colectaron muestras de sangre periférica, de 149 personas de las cuales, se seleccionaron 107 muestras agrupadas en controles, prediabéticos y diabéticos.

En el **grupo control**, se incluyeron muestras de 18 hombres y 19 mujeres con un índice de masa corporal considerado normal (IMC kg/m^2) \geq a 18.5 y \leq a 24.99 y niveles de glucosa en ayuno (≥ 70 mg/dL y ≤ 100 mg/dL); establecidos como rangos normales por la Asociación Americana de Diabetes (ADA) (4). Conforme a los datos clínicos obtenidos, se incluyeron 45 muestras de pacientes DM2 con sobrepeso u obesidad y 25 muestras de pacientes con prediabetes; cada grupo clasificado con base en los criterios establecidos por la ADA (4).

Procedimientos

Durante la consulta habitual al servicio de Fomento a la Salud del Hospital de Cardiología del CMN SXXI del IMSS, el médico especialista en Medicina del Trabajo, responsable del servicio, hizo la invitación a los pacientes a participar en el estudio quienes fueron canalizados a la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Metabólicas del mismo hospital, donde se les explicó el proyecto y se hizo lectura, así como la toma de firma del consentimiento informado. Posteriormente, con el fin de obtener el índice

de masa corporal, a cada paciente se le realizaron las mediciones antropométricas correspondientes a peso y estatura; considerándose, un IMC \geq a 25 kg/m² indicativo de sobrepeso, o bien \geq a 30 kg/m² indicativo de obesidad. Con el apoyo del laboratorio clínico, los parámetros bioquímicos correspondientes a COLT, HDL, LDL, Hb_{AC1}, y TGL se evaluaron por métodos enzimáticos y colorimétricos. A partir de la sangre colectada de cada paciente, se cuantificaron los niveles de glucosa, cuyos niveles en ayuno \geq 100 mg/dL a \leq 126 mg/dL, constituyeron el patrón de consideración para determinar a los pacientes como prediabéticos. Asimismo, se analizaron muestras de pacientes con diagnóstico de DM2. Todas las muestras de sangre se obtuvieron de la vena antecubital, de la que se extrajo un volumen de 5 ml. Posteriormente, se extrajo el plasma mediante centrifugación a 857 xg, durante 10 min a 10°C, en una centrífuga de baja velocidad (Beckman Gs-15R, Beckman Coulter, Inc.); se hicieron alícuotas de 1 mL cada una, para cuantificar los niveles de insulina, y adiponectina mediante radioinmunoanálisis (RIA) y para determinar los niveles de LCN2, leptina, resistina e Interleucina-6, empleando un ensayo inmunoenzimático (ELISA) (31). El índice de resistencia a la insulina se determinó con el modelo HOMA-IR, empleando la siguiente fórmula:

$$\text{HOMA-IR} = \text{glucosa (mg/dL)} \times \text{Insulina (\mu U/mL)} / 405$$

TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

La técnica de ELISA tiene su fundamento en el uso de anticuerpos conjugados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar el anticuerpo primario insolubilizado sobre un soporte (inmunoadsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, el anticuerpo secundario correspondiente, se revelará fácilmente mediante la adición de un substrato específico que al actuar con la enzima producirá un color detectable en el rango de espectro visible, cuantificable mediante el uso de un fotocolorímetro o un espectrofotómetro, respectivamente (74).

Existen diferentes tipos de ELISA; en este proyecto, se empleó el tipo Sándwich "DAS" (Double Antibody Sandwich). De manera general, ésta técnica consta de las siguientes etapas (**Imagen 1**):

1. Fijación de anticuerpos primarios específicos a la base de la placa.
2. Adición de la muestra problema (plasma), de tal forma que si está presente el agente patógeno de diagnóstico (antígeno), reaccionará específicamente con los anticuerpos primarios fijados a la base.

3. Adición de anticuerpos secundarios conjugados con una enzima, los cuales reconocen los antígenos fijados a los anticuerpos primarios.
4. Adición de un substrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima.
5. Finalmente para detener la reacción, se agrega una solución de “paro” y se realiza la lectura colorimétrica.

Nota: Entre cada paso, se realizan lavados para evitar unión inespecífica y eliminar residuos.

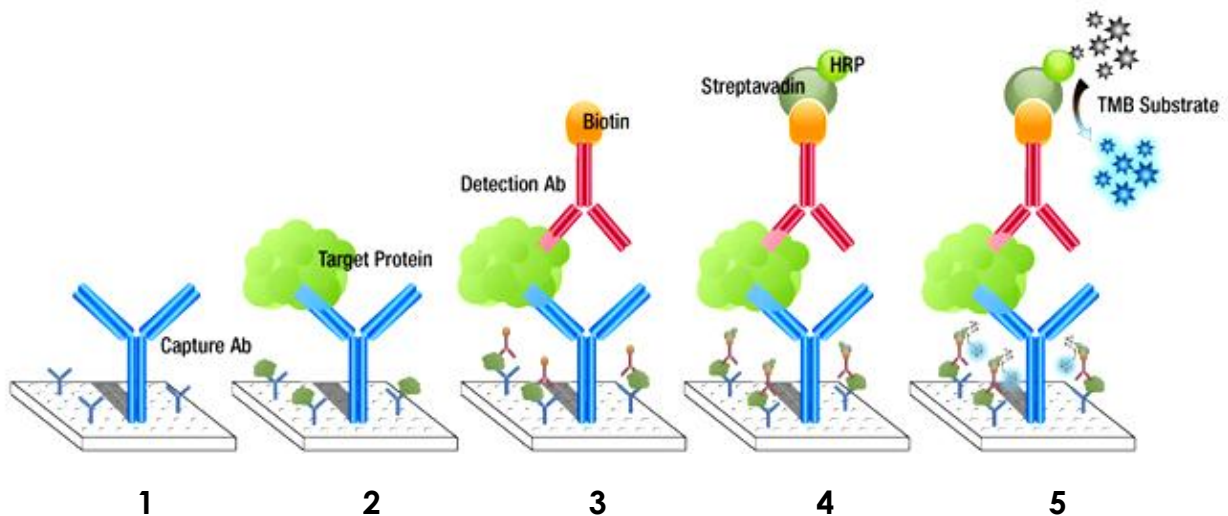


Imagen 1. Representación esquemática de las etapas secuenciales de una ELISA.

Cuantificación de LCN2

Para llevar a cabo la detección de la LCN2 en el plasma de los pacientes incluidos en cada subgrupo, se empleó un Kit de ELISA para la detección de esta proteína (BioPorto Diagnostics®, Gentofte, Dinamarca)

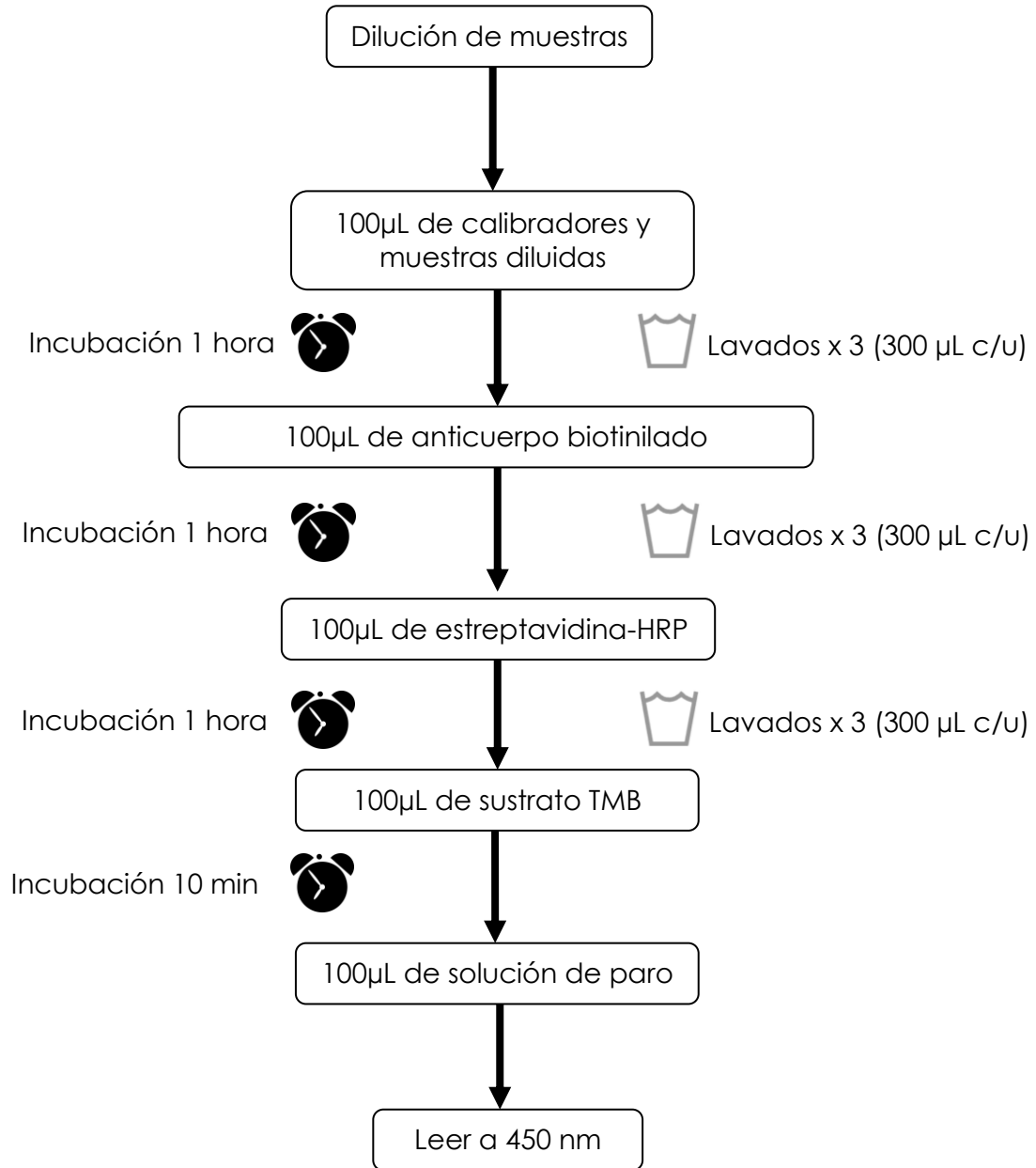
La cuantificación de la LCN2, se llevó a cabo de la siguiente forma:

Las alícuotas de las muestras se diluyeron previamente 1:20 y 1:500 con un diluyente de muestra (5x). Se colocaron 100 μ L tanto de calibradores (0 -1000 pg/ml) como de las muestras diluidas y se incubaron en una placa de poliestireno en cuyos pozos se adhiere previamente el anticuerpo primario. Posteriormente, la placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en una plataforma de agitación (200/min); luego se lavó 3 veces con 300 μ L de solución de lavado (25x). En seguida, el anticuerpo secundario biotinilado se añadió a cada pozo de ensayo y de nuevo se incubó durante 1 hora. Nuevamente se realizó la serie de lavados previamente descrita, para eliminar el anticuerpo no unido. Después para formar un complejo con el anticuerpo secundario acoplado a biotina, se agregaron 100 μ L de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP). Los conjugados que no se unieron, se eliminaron mediante la serie de lavados ya mencionados. Posteriormente, se colocó el sustrato de tetrametilbenzidina (TMB) en cada pozo y se incubó por 10 min. Lo anterior, permitió que éste

reactivo se uniera con la estreptavidina-HRP para generar una reacción colorimétrica. Finalmente, la reacción enzimática se detuvo químicamente con la solución de paro, y la intensidad del color se leyó a 450 nm en un lector de luminiscencia (Victor 3, modelo 1420, Perkin Elmer Waltham, MA, USA).

NOTA: Los resultados obtenidos de las muestras analizadas se multiplicaron por el factor de dilución (500) y se expresaron en [ng/mL].

Resumen esquemático

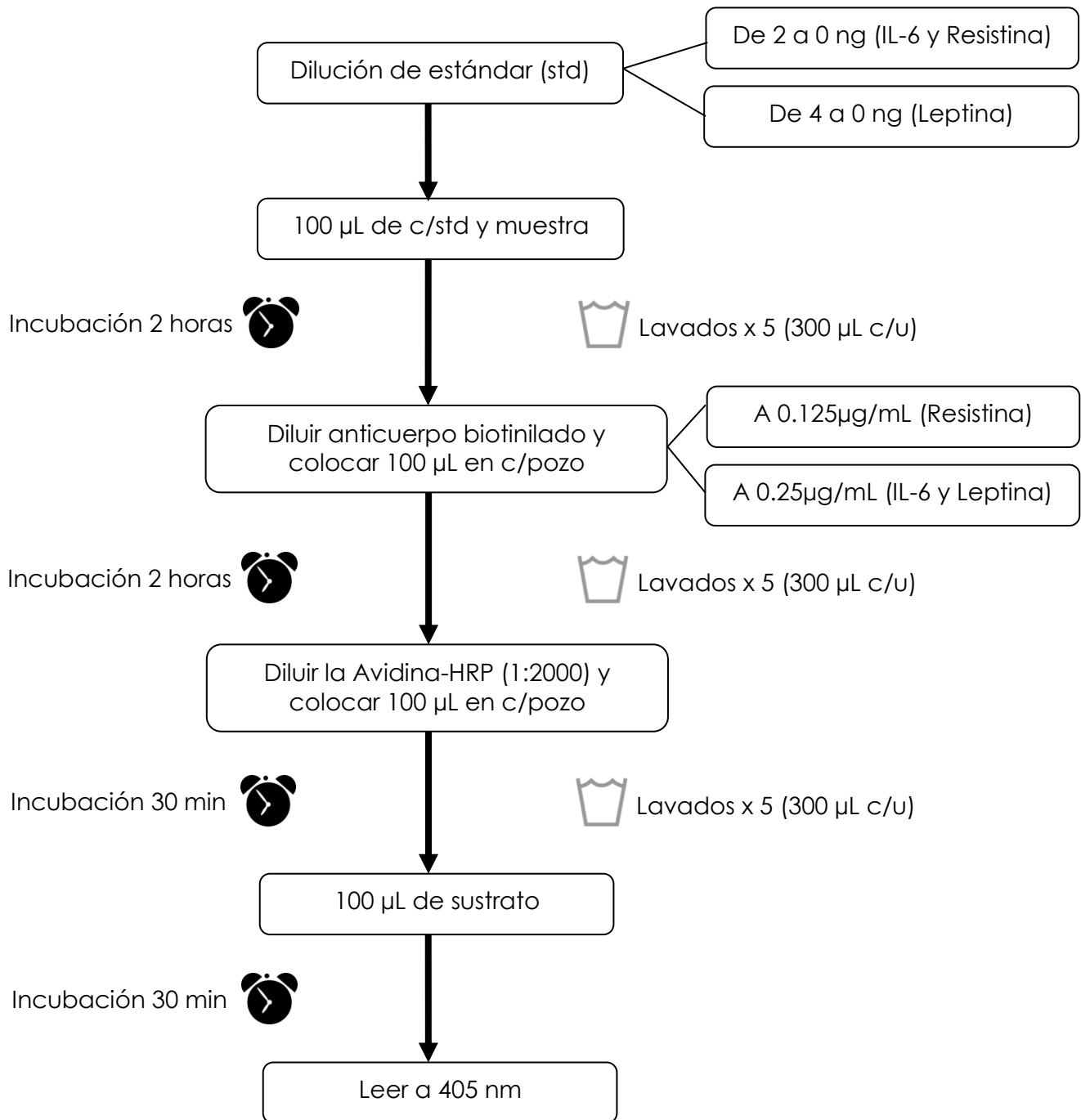


Cuantificación de adipocinas pro-inflamatorias

La cuantificación de cada adipocina pro-inflamatoria (**IL-6, Leptina y Resistina**) se realizó empleando kits comerciales para realizar ensayos de ELISA (PeproTech: Rocky Hill, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El anticuerpo de captura (según la molécula a cuantificar); se diluyó con PBS (fórmula Dulbecco (1x), pH 7.20); posteriormente, 100µL del anticuerpo se colocaron en cada pozo de la placa, ésta se selló y se incubó a temperatura ambiente durante la noche. Al día siguiente, se removi6 el anticuerpo y se realizaron 5 lavados con 300 µL de amortiguador de lavado (0.05% Tween-20 en PBS) en cada pozo. En seguida, se colocó el amortiguador de bloqueo y se incubó por 1 hora, se repiti6 la serie de lavados antes mencionados. Una vez preparada la placa, se colocaron 100 µL de estándares y muestras para ser incubadas por un periodo de 2 horas, previo a colocar los 100 µL del anticuerpo biotilinado, se realizaron los lavados correspondientes. Se colocaron 100 µL de Avidina-HRP (diluída 1:2000), se incubó por 30 minutos y posterior a los lavados, se agregó e incubó por el mismo periodo de tiempo el sustrato (ABTS, sigma Cat # A3219). Finalmente, se realizó la lectura de la placa a una longitud de onda de 405nm.

Protocolo de ELISA



Cuantificación de IL-6, resistina y leptina.

La cuantificación de IL-6 se realizó empleando el kit 900-K16 de PeproTech®, cuyo rango de detección es de 32-2000 pg/mL. Los niveles de resistina se cuantificaron siguiendo las indicaciones señaladas en el kit 900-K235 de PeproTech®, donde el rango de medición es de 16-2000 pg/mL. Finalmente, para la cuantificación de la leptina, se utilizó el kit 900-K90 de PeproTech®, cuyo rango de sensibilidad es de 63-4000 pg/mL.

Radioinmunoanálisis (RIA)

Es una técnica de alta sensibilidad, la cual permite medir las concentraciones de antígenos (en este caso los niveles de Insulina y adiponectina; adipocina anti-inflamatoria) a partir de la unión a anticuerpos específicos. A diferencia del método ELISA, donde se mide la reacción antígeno-anticuerpo mediante señales colorimétricas, el RIA, se caracteriza por que la proteína de estudio está marcada con un isótopo radiactivo, que en este caso fue yodo (I^{125}). El procedimiento de esta técnica (**Imagen 2**), consiste en una competencia entre moléculas de antígenos homólogos o semejantes entre sí, uno no marcado (Ag) y otro idéntico, marcado con un radioisótopo (Ag^*), por sitios de unión con anticuerpos específicos (Ac). Después de un periodo de incubación, donde se lleva a cabo una reacción de interacción entre antígeno-anticuerpo, hasta alcanzar el equilibrio. Una vez culminado el tiempo de incubación, se utiliza un sistema de separación de la fracción libre (moléculas no unidas).

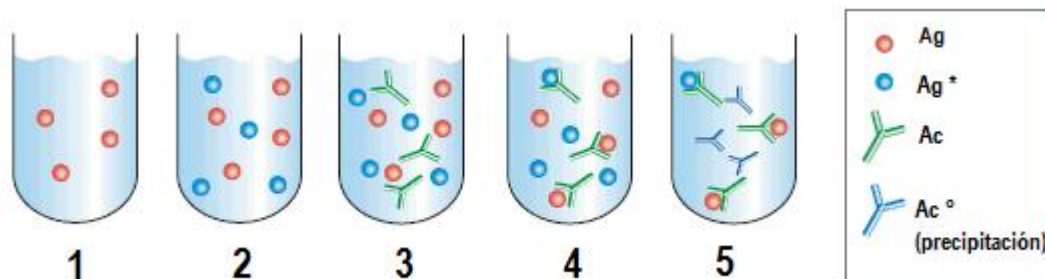


Imagen 2. Representación de las etapas de reacción secuenciales durante el RIA.

Cuantificación de Adiponectina

Para determinar los niveles de Adiponectina en las muestras de cada grupo de estudio, se empleó el Kit HADP-61HK de Millipore® (Billerica; MA, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El rango de detección del kit comercial es de 1 a 200 ng/mL, las muestras analizadas se diluyeron 1:500; para ello se utilizaron únicamente 10 µL de muestra (plasma); la dilución se realizó con el amortiguador de ensayo (1x). Los datos obtenidos se ajustaron al factor de dilución (500).

Para la curva de calibración, se emplearon 8 puntos de referencia, correspondientes a diluciones a partir del estándar concentrado (240ng/mL), como se muestra en la tabla.

# Tubo	STD [ng/mL]	Vol. de Buffer de ensayo	Vol. de Std.
1	X/2	0.5mL	0.5mL de Std. reconst
2	X/4	0.5mL	0.5mL de Tubo 1
3	X/8	0.5mL	0.5mL de Tubo 2
4	X/16	0.5mL	0.5mL de Tubo 3
5	X/32	0.5mL	0.5mL de Tubo 4
6	X/64	0.5mL	0.5mL de Tubo 5
7	X/128	0.5mL	0.5mL de Tubo 6
8	X/256	0.5mL	0.5mL de Tubo 7

Tabla 2: Pasos realizados para la cuantificación de Adiponectina.

Día 1						Día 2			
Pasos	1	2 y 3	4	5	6	7	8	9	10 al 12
# Tubo	Buffer de ensayo	Std/muestra	I^{125} - Adipo	Ac	Agitar e Incubar de 20 a 24 horas a TA	Ac ^{2°}	Precipitante	Agitación e Incubación por 20 min a 4°C	Centrifugar por 20 min, Decantar, Leer
1,2	---	---	100 µL	---		---	---		
3,4	300 µL	---	100 µL	---		100 µL	1.0 mL		
5,6	200 µL	---	100 µL	100 µL		100 µL	1.0 mL		
7,8	100 µL	100µL del tubo 8	100 µL	100 µL		100 µL	1.0 mL		
9,10	100 µL	100µL del tubo 7	100 µL	100 µL		100 µL	1.0 mL		
11,12	100 µL	100µL del tubo 6	100 µL	100 µL		100 µL	1.0 mL		
13,14	100 µL	100µL del tubo 5	100 µL	100 µL		100 µL	1.0 mL		
15,16	100 µL	100µL del tubo 4	100 µL	100 µL		100 µL	1.0 mL		
17,18	100 µL	100µL del tubo 3	100 µL	100 µL		100 µL	1.0 mL		
19,20	100 µL	100µL del tubo 2	100 µL	100 µL		100 µL	1.0 mL		
21,22	100 µL	100µL del tubo 1	100 µL	100 µL		100 µL	1.0 mL		
23,24	100 µL	100µL del Std Reconst.	100 µL	100 µL		100 µL	1.0 mL		
25,26	100 µL	100µL de Control 1	100 µL	100 µL		100 µL	1.0 mL		
27,28	100 µL	100µL de Control 2	100 µL	100 µL		100 µL	1.0 mL		
29,n	100 µL	100µL de muestra	100 µL	100 µL	100 µL	1.0 mL			

Std: Estándar

Control de calidad 1 y 2

I^{125} -Adiponectina: Adiponectina marcada con Yodo 125

Centrifugación a 3000rpm a 4°C (excepto tubo 1 y 2)

Las muestras se leyeron en el contador de partículas radiactivas gamma

Análisis Estadístico

Para el análisis de los resultados se utilizó estadística descriptiva con medidas de tendencia central y de dispersión paramétrica, de acuerdo a la distribución del grupo.

Para valorar las diferencias entre los grupos independientes, se empleó el análisis de varianza de una vía mediante la prueba de ANOVA, la prueba comparativa entre grupos de Tukey y en el caso de comparación múltiple con control, la prueba de Dunnett.

La comparación de significancia estadística entre los grupos de estudio, se calculó mediante la prueba de T-Student.

Para evaluar la correlación entre las variables cuantitativas, se utilizó el coeficiente de Pearson y empleando un modelo lineal se pudo evaluar la influencia de los parámetros bioquímicos y antropométricos con LCN2.

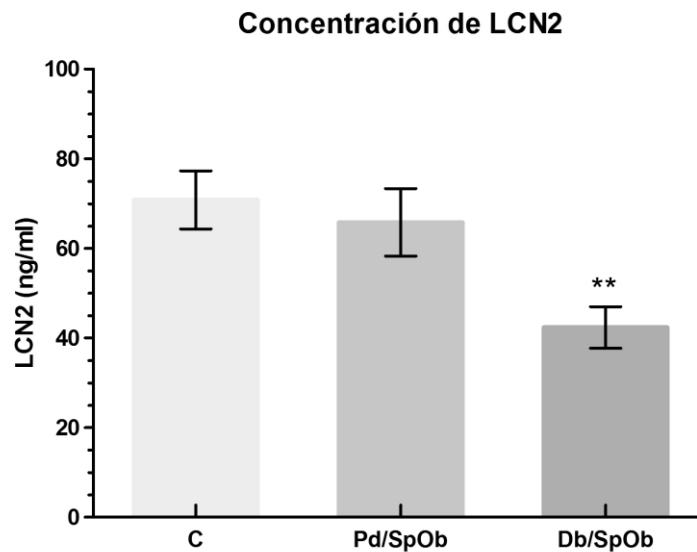
Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a una $p < 0.05$. Todos los análisis se realizaron empleando el programa GraphPad Prism, versión 5.1.

RESULTADOS

Se trabajó con un total de 107 muestras de un lote de 149 colectadas, las cuales reunían las características necesarias para ser agrupadas como: Control (C), Diabéticos (Db) y Prediabéticos (Pd). En el **Tabla 3**, se muestran las características basales de la población de estudio seleccionada.

2. Cuantificación de niveles plasmáticos de LCN2

Los niveles de LCN2 se analizaron mediante técnicas inmunoquímicas previamente descritas (**Gráfica 1**), correspondiendo 37 de ellas a C (18♂ y 19♀); 45 a Db (11♂ y 34♀) y 25 a Pd (10♂ y 15♀).



Análisis estadístico de ANOVA ($p < 0.05$)
Comparación múltiple de Dunnett ** $p < 0.01$

Gráfica 1: Evaluación de los niveles de LCN2 (promedio \pm error estándar) en C: 70.81 ± 6.50 ; Pd/SpOb: 65.8 ± 7.53 y Db/SpOb: 42.36 ± 4.66 . El análisis estadístico correspondiente, permite observar que la disminución es significativa en los diabéticos (** $p < 0.01$).

Tabla 3. Evaluaciones antropométricas y bioquímicas

Características antropométricas y bioquímicas de la población de estudio (C, Db/Sp u Ob, Pd/Sp u Ob), expresados como promedio \pm error estándar.

Parámetros Poblacionales	Grupos de Estudio					
	Control		Prediabéticos		Diabéticos	
	Masculino	Femenino	Masculino	Femenino	Masculino	Femenino
	Media \pm EEM	Media \pm EEM	Media \pm EEM	Media \pm EEM	Media \pm EEM	Media \pm EEM
Género	18	19	10	15	11	34
Edad (años)	39.78 \pm 2.02	32.47 \pm 2.05	37.50 \pm 3.60	43.92 \pm 3.06	55.4 \pm 1.78	44.35 \pm 2.003
IMC (Kg/m ²)	23.78 \pm 0.21	22.75 \pm 0.41	32.47 \pm 2.64	31.21 \pm 1.33	30.28 \pm 1.63	33.01 \pm 1.44
Glucosa (mg/dL)	86.89 \pm 2.58	88.68 \pm 1.30	106.5 \pm 1.36	107.7 \pm 2.10	181.0 \pm 9.92	144.2 \pm 9.51
Insulina (μ U/mL)	10.55 \pm 0.61	8.72 \pm 0.61	18.10 \pm 2.39	21.00 \pm 5.55	24.23 \pm 5.64	24.95 \pm 2.96
HOMA-IR	2.29 \pm 0.17	1.90 \pm 0.13	4.79 \pm 0.67	5.79 \pm 1.61	9.01 \pm 2.27	9.25 \pm 1.52
Hb _{A1C} (%)	—	—	—	—	7.94 \pm 0.53	7.48 \pm 0.22
HDL (mg/dL)	47.70 \pm 1.65	51.97 \pm 1.58	31.53 \pm 2.49	40.89 \pm 3.45	32.74 \pm 1.35	44.87 \pm 1.91
LDL (mg/dL)	98.08 \pm 4.17	92.86 \pm 3.34	128.3 \pm 8.52	114.8 \pm 6.71	116.0 \pm 12.29	133.9 \pm 7.70
COLT (mg/dL)	167.3 \pm 3.13	162.8 \pm 4.07	193.4 \pm 7.66	191.5 \pm 8.99	196.1 \pm 16.73	214.8 \pm 9.39
TGL (mg/dL)	120.2 \pm 6.85	95.89 \pm 7.55	142.0 \pm 14.60	179.5 \pm 16.74	236.4 \pm 31.31	180.3 \pm 11.78
Tratamiento	—	—	—	—	100%	100%
Hipertensión	—	—	—	—	81.81%	70.58%

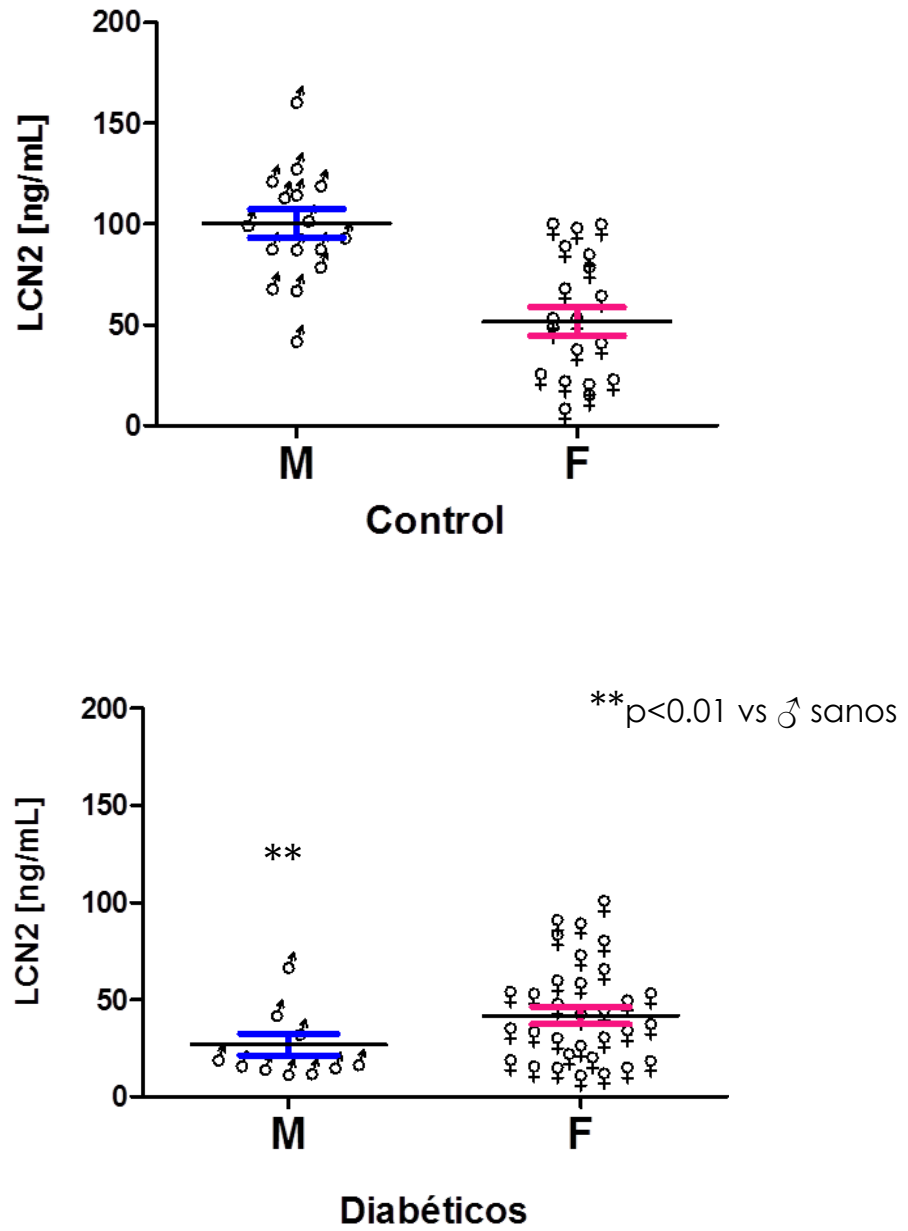
3. Comparación de los niveles de LCN2 entre género

Se realizó una comparación de los niveles plasmáticos de LCN2 entre géneros; los resultados obtenidos muestran un dimorfismo sexual tanto en C como en Db; de esta forma, se denota una disminución considerable de los niveles de ésta proteína en el plasma de los hombres diabéticos con respecto de los niveles detectados en los hombres sanos; mientras que en las mujeres con DM2 se observa que la reducción de los niveles plasmáticos de LCN2 no es tan drástica como ocurre con los niveles de LCN2 en los hombres diabéticos. Asimismo, a pesar de presentar una disminución de esta proteína en el plasma de mujeres diabéticas, con respecto de las mujeres sanas, la diferencia no es significativa (ns) (**Tabla 4, Figura 1**).

Tabla 4. Comparación del promedio de los niveles de LCN2 entre género de sujetos sanos y pacientes diabéticos (♀: mujeres y ♂: hombres).

LCN2 (ng/mL)	♂	♀
Controles	100.41	50.54
Diabéticos	26.77 **	39.7
p	<0.01	ns

Figura 1: Niveles de LCN2 entre géneros (♀: mujeres y ♂: hombres).



4. Correlaciones de LCN2 con parámetros antropométricos y perfil lipídico

Tanto en los controles, como en diabéticos, los niveles de LCN2 se correlacionaron con las características antropométricas y bioquímicas correspondientes (**Tabla 5**). De esta forma, se obtuvo una correlación negativa de la LCN2 con todos los parámetros evaluados excepto con HDL; sin embargo, sólo las correlaciones para IMC, Insulina y TGL fueron significativas estadísticamente (** $p < 0.001$ y * $p < 0.05$) (**Figura 2**).

En el análisis que se realizó para el grupo de diabéticos (**Tabla 5**), se observó una correlación negativa estadísticamente significativa de los niveles plasmáticos de LCN2 con: IMC, Hb_{A1C}, Insulina, HOMA-IR, HDL, COLT, TGL (**Figura 3**). Por otro lado, LCN2 se correlacionó positivamente con la edad y los niveles de HDL (** $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$ y * $p < 0.05$) (**Figura 6**).

Tabla 4. Coeficiente de correlación de Pearson entre LCN2 y parámetros antropométricos y bioquímicos en grupo control.

Parámetros	Controles		
	Pearson (r)	P	
Edad	-0.07	0.70	ns
IMC	-0.48	0.007	**
Insulina	-0.39	0.04	*
HOMA-IR	-0.02	0.90	ns
HDL	0.01	0.94	ns
LDL	-0.16	0.40	ns
COLT	-0.22	0.22	ns
TGL	-0.40	0.03	*

Tabla 5. Coeficiente de correlación de Pearson entre LCN2 y parámetros antropométricos y bioquímicos en diabéticos

Parámetros	Diabéticos		
	Pearson (r)	P	
Edad	0.49	0.002	**
IMC	-0.41	0.04	*
Hb _{A1C}	-0.34	0.03	*
Insulina	-0.61	0.0002	***
HOMA-IR	-0.44	0.01	*
HDL	0.56	0.001	**
LDL	-0.48	0.004	**
COLT	-0.50	0.009	**
TGL	-0.45	0.01	*

Figura 2. Correlaciones entre LCN2 y el IMC, TGL e Insulina del grupo control.

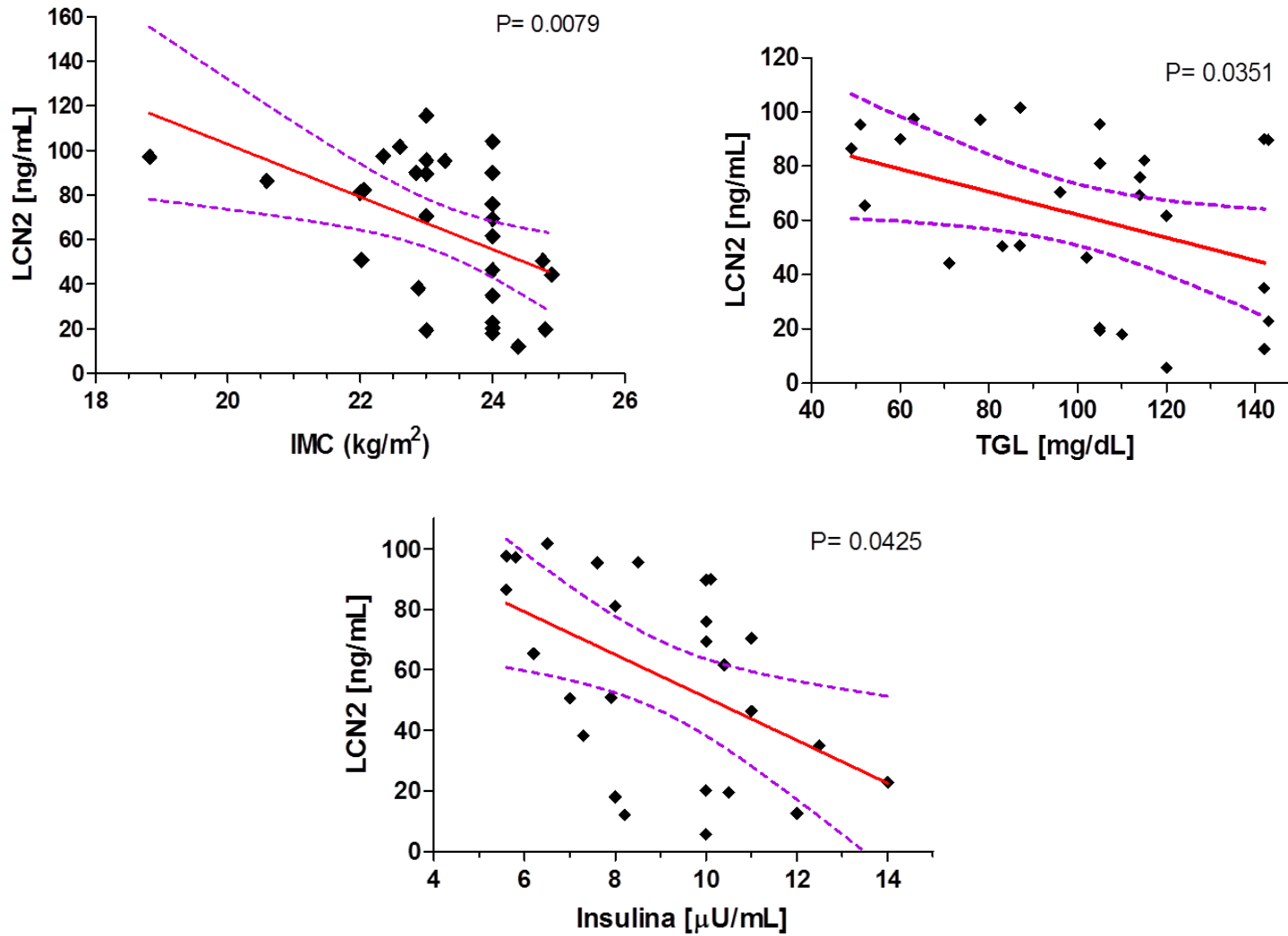


Figura 3: Correlaciones negativas de los niveles plasmáticos de LCN2 en el grupo de diabéticos con parámetros bioquímicos (insulina, HbA_{1C} y HOMA-IR) y antropométricos (IMC) con significancia estadística.

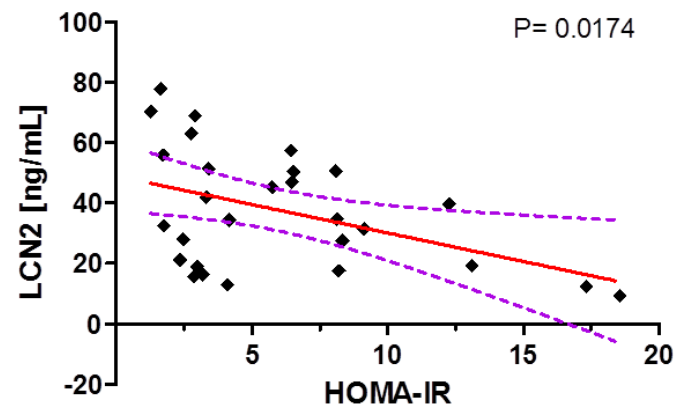
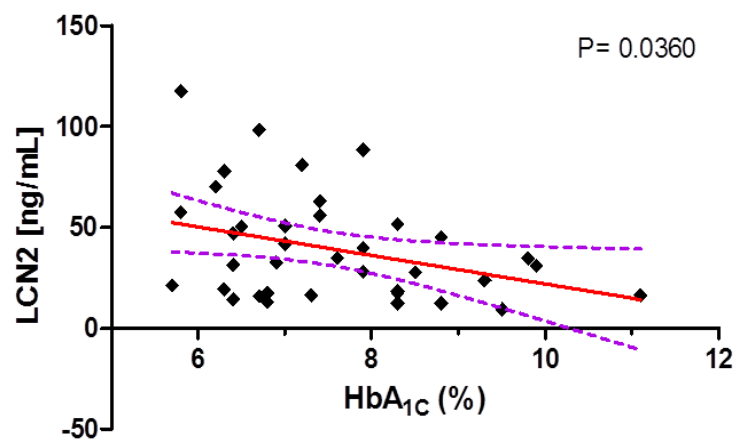
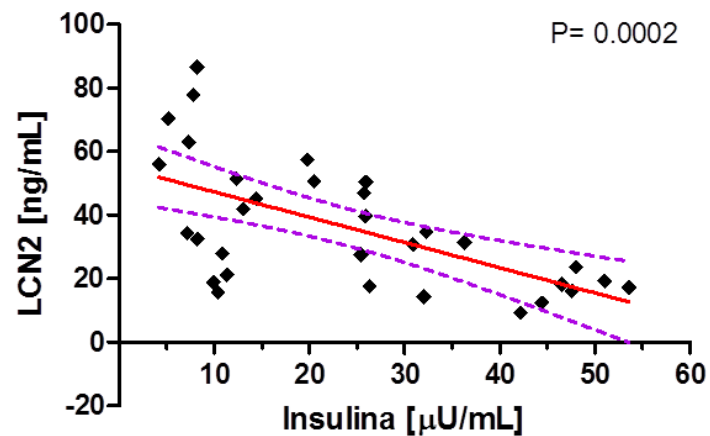
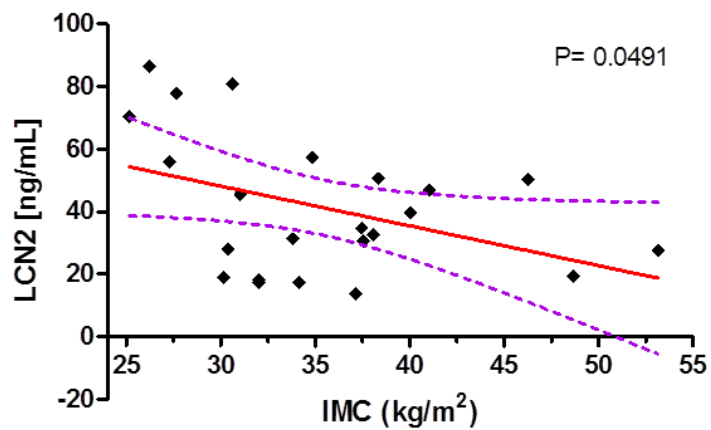
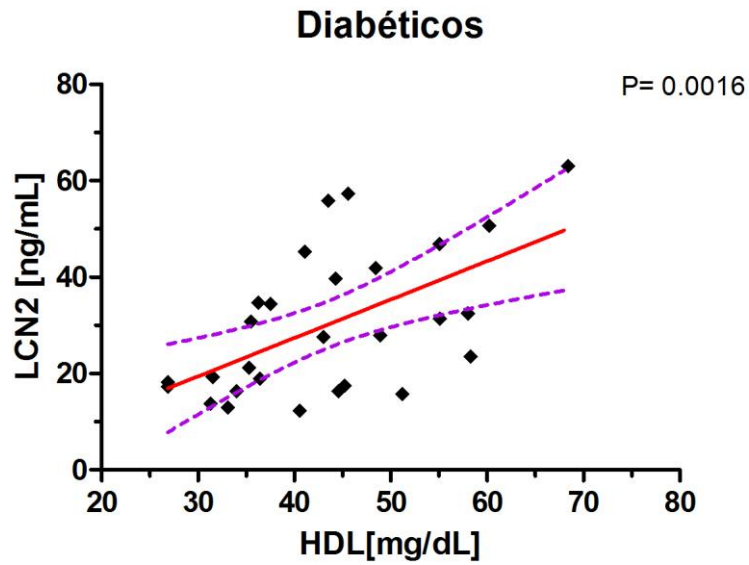
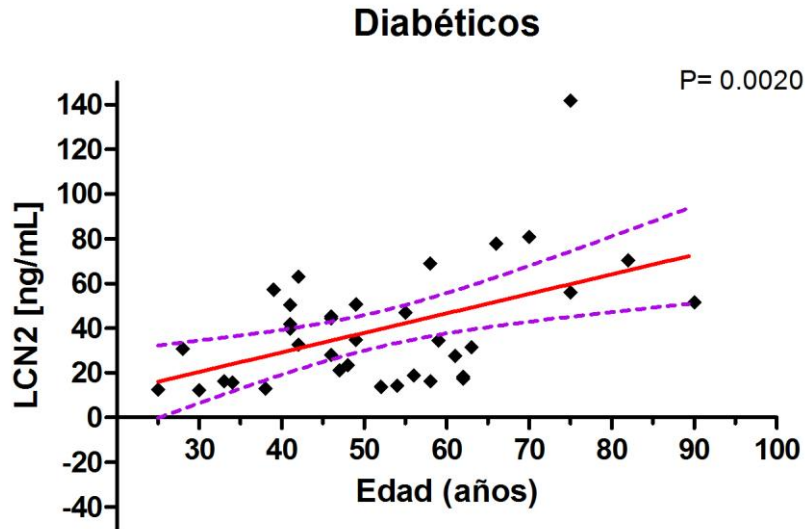


Figura 4: Gráficos correspondientes a las correlaciones positivas con significancia estadística de LCN2 con edad y HDL en el grupo de diabéticos.



5. LCN2 y otras adipocinas

Para definir el comportamiento de LCN2 como proteína pro- o anti-inflamatoria, se realizó la cuantificación de IL-6, resistina y leptina (adipocinas pro-inflamatorias), así como de adiponectina (adipocina anti-inflamatoria) y se correlacionaron con los niveles plasmáticos de LCN2 en pacientes diabéticos. Inicialmente, se observó que los niveles de las cuatro adipocinas (IL-6, resistina, leptina y adiponectina), están alterados en el grupo de diabéticos (**Figura 5**), encontrando un incremento en las adipocinas pro-inflamatorias: resistina (108.82%); IL-6 (127.01%); leptina (549.57%), mientras que hubo una disminución tanto de adiponectina (-69.52%) como de LCN2 (-56.07%), con respecto al grupo control.

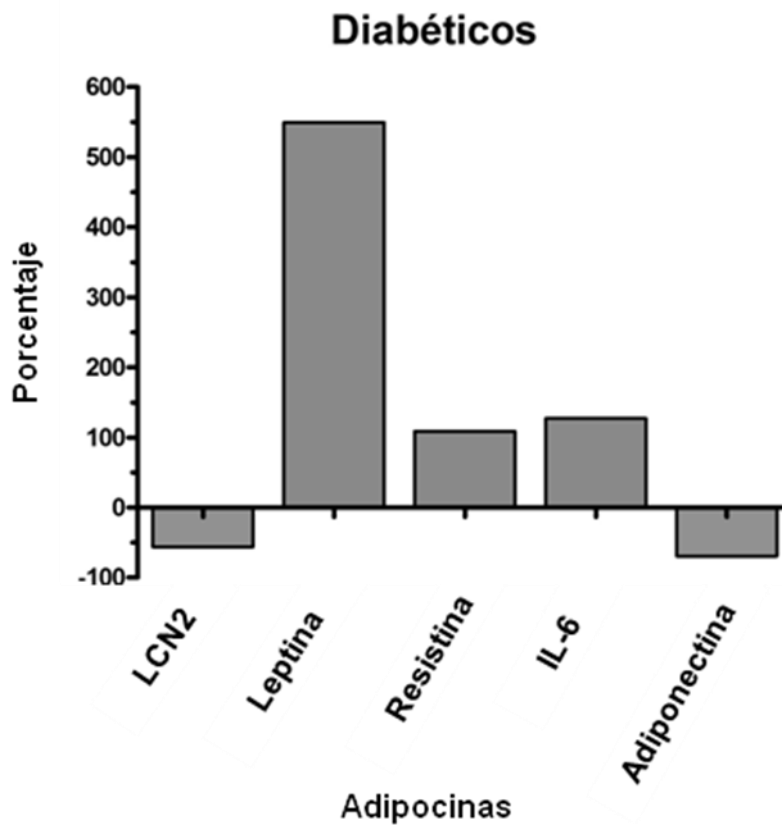


Figura 5: Nivel porcentual de adipocitocinas en diabéticos.

6. Correlación de LCN2 y adipocinas

A partir de los resultados obtenidos, mediante un análisis de Pearson, se observó que LCN2 se correlaciona negativamente con leptina, IL-6 y resistina; es decir, mientras los niveles plasmáticos de éstas incrementan, los de LCN2 disminuyen (**Figura 6 y 7**). Lo anterior, se observó tanto en controles como en diabéticos.

Por otro lado, LCN2 se correlacionó positivamente con adiponectina, sin embargo, el análisis estadístico señala una asociación débil en el grupo de diabéticos (**Figura 8**).

Figura 6. Correlaciones en controles y diabéticos de LCN2 con leptina e IL-6

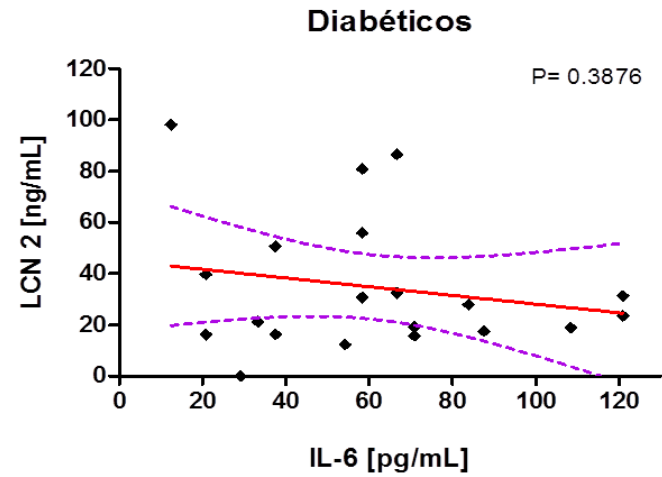
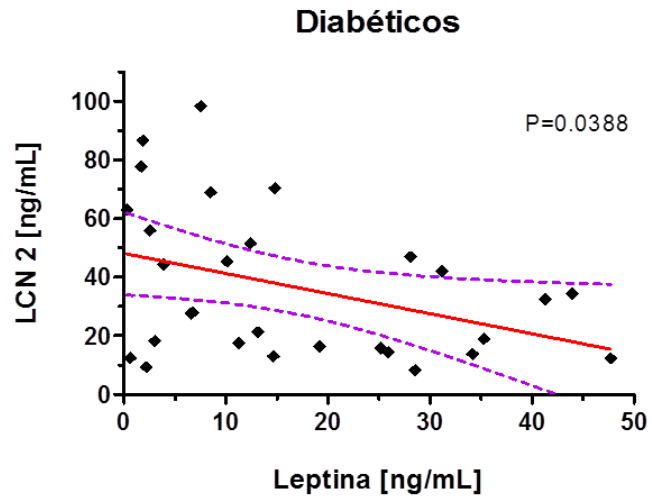
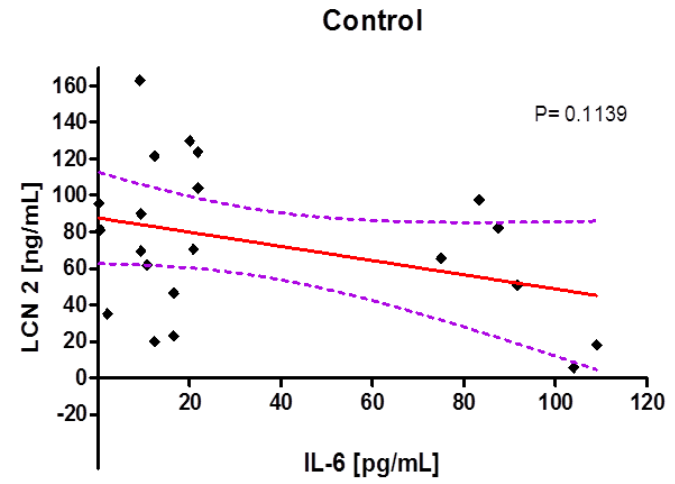
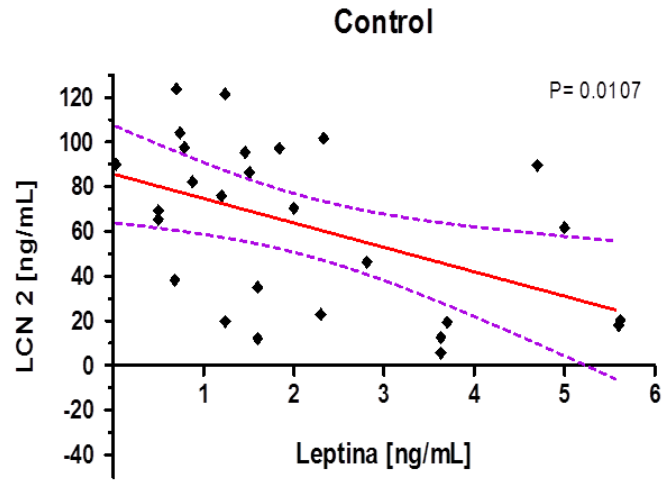


Figura 7. Correlaciones en controles y diabéticos de LCN2 con Resistina

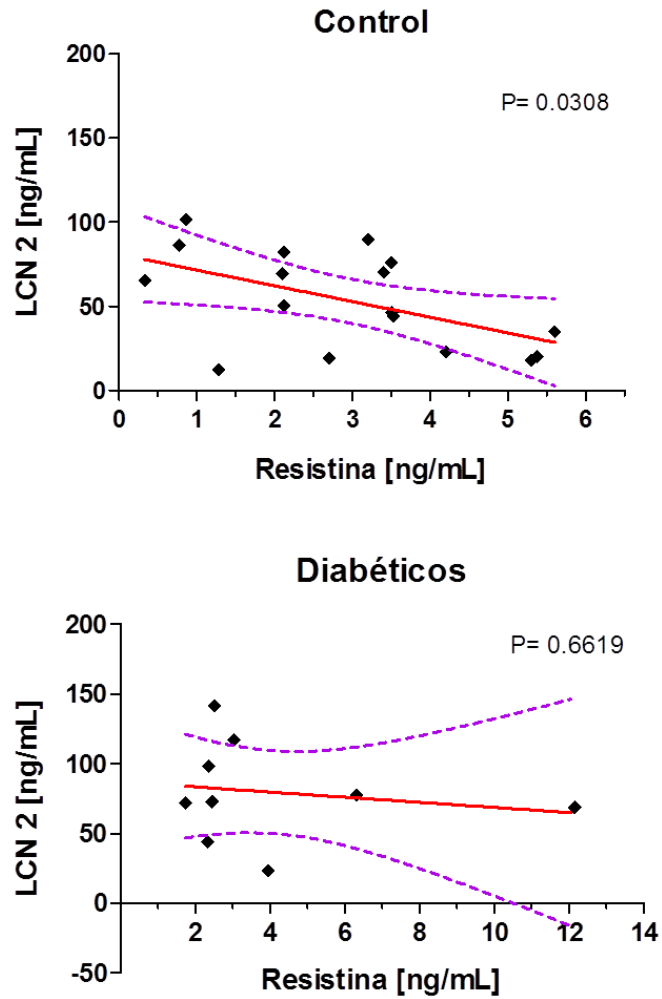
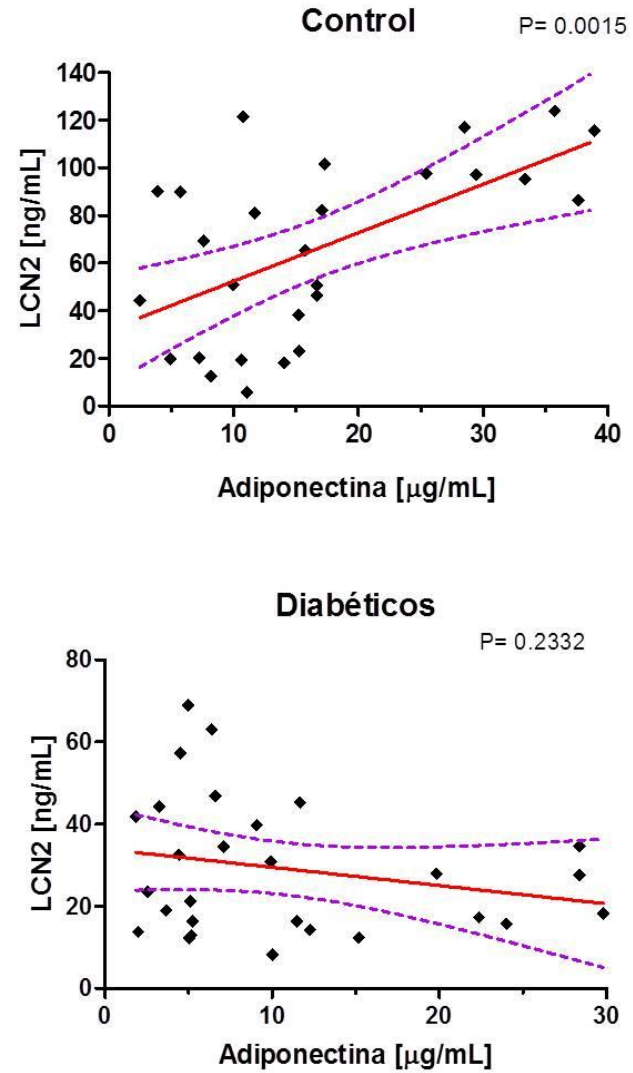


Figura 8. Correlaciones en controles y diabéticos de LCN2 con Adiponectina



DISCUSIÓN

La LCN2 es una adipocina implicada en diversas funciones biológicas como: la comunicación, proliferación y diferenciación celular, la apoptosis, el transporte de hierro y el metabolismo. Se localiza en varios tejidos, incluyendo los neutrófilos, el hígado, el riñón, los macrófagos y los adipocitos (71). Con base en esto último, diversos estudios han demostrado que la concentración de esta proteína es alta tanto en el tejido adiposo, como en células pre-adipocíticas en cultivo. Del mismo modo, se ha reportado una asociación del aumento en la concentración plasmática de LCN2, con la presencia de diversos componentes del síndrome metabólico, como la obesidad, la dislipidemia, la resistencia a la insulina, o bien con la diabetes mellitus tipo 2 (69); sin embargo, a pesar de que la LCN2 se identificó hace más de una década, existe controversia entre los diversos reportes científicos respecto a su participación en la sensibilidad o la resistencia a la insulina (70).

Por lo anterior, aunado a que no existen reportes sobre los niveles de concentración de LCN2 en sujetos mexicanos, sanos o bien con diabetes mellitus tipo 2, llevamos a cabo el presente estudio, para evaluar los niveles de LCN2 en un grupo de la población mexicana y determinar, la concentración en plasma de esta proteína en sujetos sanos y comparar dicha concentración con la correspondiente en sujetos con diabetes mellitus

tipo 2 a partir de su asociación con parámetros bioquímicos y antropométricos.

Se cuantificaron mediante ELISA, los niveles de LCN2 en cada grupo de estudio (sujetos sanos, prediabéticos y diabéticos). Se encontró que los niveles de esta proteína, disminuyen tanto en pacientes prediabéticos como en diabéticos, con respecto a los niveles presentes en sujetos sanos. El valor correspondiente a los pacientes diabéticos es estadísticamente significativo al compararse con el grupo control (** $p < 0.01$); siendo los primeros resultados reportados desde etapa de prediabetes en población mexicana, además, de relacionarlos con alteraciones metabólicas como es IMC, perfil de lípidos y adipocinas. Sin embargo, nuestros resultados difieren con diversos estudios en los que se ha reportado un aumento de los niveles circulantes de esta proteína en personas con obesidad y/o diabetes mellitus tipo 2 y una correlación de dicho aumento con diferentes parámetros metabólicos e inflamatorios, postulando que LCN2 induce resistencia a la insulina. En el 2007, Wang y cols., reportaron que los niveles circulantes de LCN2 aumentan tanto en ratones *db/db* como en seres humanos obesos y diabéticos (71). Otro estudio realizado en el mismo año por Yan y cols., reporta que el bloqueo de LCN2 en cultivos celulares, produce sensibilidad a la insulina; datos que corroboran lo reportado por Wang y cols., sobre la directa relación entre ésta molécula y la homeostasis de la glucosa (69). A nivel clínico, Wang y cols.,

reportan que los niveles circulantes de LCN2, se asocian con parámetros bioquímicos y metabólicos (TGL, HDL, COLT, Insulina y HOMA-IR) (71). Por el contrario, en este estudio, los niveles de LCN2 de los pacientes diabéticos, se correlacionan negativamente con los parámetros antes mencionados, además de IMC, LDL y Hb_{A1C}, y positivamente con HDL y edad (**Tabla 5**). Asimismo, Zhang y cols. (2008), reportaron datos similares con respecto al incremento en la expresión del ARN mensajero (ARNm) para la lipocalina 2 tanto en modelos murinos de obesidad, como durante la diferenciación de líneas celulares procedentes de adipocitos. Sin embargo, los resultados obtenidos a partir de los experimentos moleculares, difieren con los resultados descritos por Wang y Yan. En este estudio, los experimentos en los que se silenció el ARNm para la lipocalina 2, redujeron consecuentemente la expresión del factor de transcripción PPAR γ , así como la expresión de los genes blanco de este último; i.e., adiponectina, leptina, FASN y LPL, los cuales controlan la adipogénesis, regulan el metabolismo celular y la inflamación. A partir de lo anterior, los autores sugieren que la lipocalina 2 ejerce un efecto protector contra la inflamación y la resistencia a la insulina (70). En el 2010, Cho KW, y cols., reportan que la resistencia a la insulina se asocia con la reducción de los niveles circulantes de LCN13 (molécula perteneciente a la superfamilia de lipocalinas) en murinos *ob/ob* y *db/db*. Asimismo, señalan que la deficiencia de ésta, contribuye a la resistencia a la insulina, la

hiperglucemia y la intolerancia a la glucosa en adipocitos y hepatocitos. Aún cuando el mecanismo de acción de LCN13 es desconocido, los autores señalan que LCN13 actúa similar a LCN2 y debido a que estructuralmente, ambas proteínas, transportan moléculas hidrofóbicas, éstas pueden regular el metabolismo de glucosa así como la sensibilidad a la insulina (76). Por lo tanto, a través de los estudios antes mencionados, podemos inferir que la hiperlipidemia y falta de sensibilidad a la insulina, son factores que desencadenaron la disminución de los niveles de LCN2 en la población de nuestro estudio.

Por otro lado, Thraikill K, y cols., en el 2010, al realizar un estudio sobre (NGAL), también considerado un biomarcador de lesión renal, y su asociación con MMP-9, cuya desregulación está asociada con nefropatía, observaron que tanto los niveles de MMP-9 en plasma y orina, así como las concentraciones de NGAL fueron significativamente mayores en mujeres que en hombres (82). Una de las recientes funciones asignada a la LCN2, es la reportada por Guo y cols., quienes señalan que LCN2 modula la producción y acción de estrógenos (75). Lo anterior, permite comprender el dimorfismo sexual encontrado en la población de estudio y el porqué los niveles de la proteína en las mujeres diabéticas no disminuyen significativamente como en los hombres bajo la misma condición. Sin embargo, sería interesante estudiar

cómo LCN2 y los niveles de estrógeno se relacionan con la inflamación y la obesidad.

Como se mencionó en la introducción, estudios realizados en humanos y en modelos animales han demostrado una relación estrecha entre la obesidad, y un estado de inflamación crónica en bajo grado, caracterizado por la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo y una alteración del equilibrio entre proteínas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, secretadas por adipocitos hiperplásicos y macrófagos activados donde adipocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, entre las que se incluye a: IL-6, resistina, leptina y adiponectina, alteran el metabolismo de la glucosa y la acción de la insulina (23). Dichas adipocitocinas, se consideran marcadores inmunológicos importantes en diversos padecimientos. Las concentraciones en plasma de IL-6 y adiponectina se emplean como indicadores de predisposición a presentar DM2 (77, 78).

A diferencia de la leptina, la concentración sérica de la adiponectina tiene una relación inversa con la masa de grasa corporal y el grado de resistencia a la insulina. Su concentración es particularmente baja en adultos con diabetes mellitus tipo 2 (DM 2) (79). Con base en la participación ya definida de estas moléculas (leptina, resistina, IL-6 y adiponectina), fue que se determinó identificar su asociación con LCN2; encontrando correlación

negativa con IL-6, resistina y leptina y una correlación positiva con los niveles de adiponectina tanto en controles como en pacientes diabéticos. Lo anterior coincide con lo reportado por Zhang y cols. (2008) (70) y sugiere que LCN2 actúa como adipocina anti-inflamatoria. Asimismo, en este estudio, se demostró que LCN2 se correlaciona con HDL. Al comparar los resultados obtenidos con los reportes antes mencionados, inferimos que LCN2 al igual que la adiponectina, actúa como molécula cardioprotectora, ya que los niveles de adiponectina tienen una relación directa con los niveles del colesterol HDL y con el índice de captación de glucosa mediada por insulina (80). Por lo que se considera que la adiponectina tiene efectos sensibilizadores a la acción de la insulina y de protección cardiovascular (81).

Es preciso remarcar, que el descubrimiento de adipocinas ha reformado el concepto que se tenía del tejido adiposo como un depósito de almacenamiento de lípidos inerte a un órgano endocrino activo (83). Actualmente, una gran cantidad de adipocinas han sido identificadas dentro de las cuales, se espera encontrar a aquellas que potencialmente puedan cumplir el papel de los biomarcadores y biosensores para diversas patologías. Asimismo, la dilucidación, de los mecanismos moleculares que regulan el comportamiento de LCN2, será de utilidad para lograr una mayor comprensión de las alteraciones en la homeostasis de la glucosa y en la función de la insulina, que conllevan al desarrollo de la DM2.

CONCLUSIONES

1. En pacientes diabéticos existe una disminución significativa en los niveles de LCN2.
2. Se observó un dimorfismo sexual en las concentraciones de LCN2, siendo la disminución de esta proteína en los hombres diabéticos mayor que la correspondiente en mujeres con DM2.
3. Las alteraciones metabólicas relacionadas con la DM2 (dislipidemia), se asocian con desequilibrio de los niveles de LCN2.
4. LCN2 presenta una relación directamente proporcional al incremento de HDL, la cual, evita el acumulo de colesterol en la pared vascular. Lo anterior permite inferir que LCN2 puede actuar también como molécula cardioprotectora.
5. LCN2 se asocia negativamente con adipocinas pro-inflamatorias e IMC.
6. En contraste, se observó que los niveles de LCN2 y Adiponectina disminuyen en pacientes diabéticos; asimismo, se observó que en sujetos sanos LCN2 es directamente proporcional a los niveles de Adiponectina, misma tendencia observada en pacientes diabéticos, lo que permite considerar que LCN2 se actúa como molécula anti-inflamatoria. Sin embargo, para definir la posible actividad anti-inflamatoria propuesta,

sugerimos realizar otros estudios de asociación, donde se evalúen los niveles de LCN2 con otros marcadores de inflamación como proteína C-reactiva.

REFERENCIAS:

1. Phillipa J. Miranda, MD, y cols. Metabolic Syndrome: definition, pathophysiology, and mechanisms. *Am Heart J.*, 2005; 149:33-45.
2. Guerrero-Romero F, Rodríguez-Morán M, y cols. Prediabetes and its relationship with obesity in mexican adults: the mexican diabetes prevention (MexDiab) study. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 2008; 6:15-23.
3. Federación Internacional de Diabetes. *Diabetes Voice*. Mayo 2008; 53.
4. American Diabetes Association; *Diabetes Care*, 2012; 5:1.
5. Stern MP, González C, y cols. Genetic and environmental determinants of diabetes type II in Mexico city and San Antonio. *Diabetes* 1992; 41:484-92.
6. American Diabetes Association; *Diabetes Care*, 2012; 35:1.
7. John Wiley. *Curren literarute and diabetes*. *Diabetes Metabolism Research and Review*. 2010; 26(8): I-IX.
8. Villalpando, Salvador y cols. Prevalence and distribution of type 2 diabetes mellitus in Mexican adult population: a probabilistic survey. *Salud pública de México*. 2010; 52 (1):S19-S26.
9. Arner P. Regulation of adipose tissue lipolysis, importance for the metabolic syndrome. *Adv Exp Med Biol.*, 1993; 334:259-267.
10. Björntorp P. Visceral obesity: A "Civilization Syndrome". *Obesity Res.*, 1993; 1:206-222.
11. World Health Organization. *Obesity. Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity*. WHO/NUT/NCD/981, WHO. Geneva, 1998.

12. Olshansky SJ, Passaro DJ, y cols. A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. *N Engl J Med.*, 2005; 352:1138-45.
13. Fernández-Real JM, Ricart W, y cols. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev* 2003; 24(3):278-301.
14. Pimenta P, Santos M, y cols. B-cell dysfunction with normal insulin sensitivity in white brazilians with impaired glucose tolerance. *Diabetes*, 2001; 50:A520.
15. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 2004; 27(1):S4-S10.
16. Weisberg SP, McCann D, y cols. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.*, 2003; 112:176-1808.
17. Canello R, Henegar C, y cols. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery –induced weight loss. *Diabetes*, 2005; 54:2277-2286.
18. Xu H, Barnes GT, y cols. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.*, 2003; 112:1821-1830.
19. Cline GW, Petersen KF y cols. Impaired glucose transport as a cause of decrecd inulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 1999; 341: 240-6.
20. Juge-Aubry CE, Henrichot E, y cols. Adipose tissue: a regulator of inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005; 19:547-566.
21. Marette A. Mediators of cytokine-induced insulin resistance in obesity and other inflammatory settings. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2002; 5:377-383.
22. Esteve E, Ricart W, y cols. Adipocytokines and Insuline Resistance. *Diabetes Care*, 2009; 32:s362-s367.
23. Sánchez-Muñoz F, García-Macedo R, Alarcón Aguilar F. Adipocinas, tejido adiposo y su relación con células del sistema inmune. *Gac Méd Méx*, 2005 141(6).

24. Otero M, Lago R, y cols. Towards a pro-inflammatory and immunomodulatory emerging role of leptin. *Rheumatology* 2006; 45:944-950.
25. Carlo AS, Pyrsky M, y cols. Leptin sensitivity in the developing rat hypothalamus. *Endocrinology* 2007; 148:6073-6082.
26. Considine RV, Caro JF, y cols. Leptin and the regulation of body weight. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29 (11):1255-72.
27. Rueda-Clausen CF, Lahera V, y cols. The presence of abdominal obesity is associated with changes in vascular function independently of other cardiovascular risk factors. *Int J Cardiol* 2008; 139 (1):32-41.
28. Ahima RS, Flier JS, y cols. Leptin. *Annu Rev Physiol* 2000; 62:413-37.
29. Elimam A, Kamel A, y cols. In vitro effects of leptin on human adipocyte metabolism. *Horm Res* 2002; 58 (2):88-93.
30. Trujillo ME, Lee MJ, y cols. Tumor necrosis factor alpha and glucocorticoid synergistically increase leptin production in human adipose tissue: Role for p38 mitogen-activated protein kinase. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:1484-1490.
31. Iglesias P, Diez JJ. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists in renal disease. *Eur J Endocrinol* 2006; 154:613-621.
32. Semple RK, Chatterjee VK, y cols. PPAR gamma and human metabolic disease. *J Clin Invest* 2006; 116:581-589.
33. Guan Y, Breyer MD, y cols. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): novel therapeutic targets in renal disease. *Kidney Int* 2001; 60:14-30.
34. Barroso I, Gurnell M, y cols. Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 1999; 402:880-883.
35. Jaziri R, Lobbens S, y cols. The PPARG Pro12Ala polymorphism is associated with a decreased risk of developing hyperglycemia over 6 years and combines with the

- effect of the APM1 G-11391A single nucleotide polymorphism: the Data From an Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syndrome (DESIR) study. *Diabetes* 2006; 55:1157-1162.
36. Rodriguez-Esparragon FJ, Rodriguez-Perez JC, y cols. Hipertensión arterial, riñón y PPAR-gamma. *FMC: Nefrología e Hipertensión* 2006; 2:43-49.
 37. Zamora-Valdés D, Chávez-Tapia NC, y cols. Mecanismos moleculares de resistencia a la insulina. *Medica Sur MG* 2004; 11:149-156.
 38. Almanza-Pérez Julio C., Blancas-Flores Gerardo y cols. Leptina y su relación con la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2. *Gac Méd Méx* 2008; 144(6).
 39. Steppan CM, Bailey ST, y cols. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001; 409(6818):307-312.
 40. Milan G, Granzotto M, y cols. Resistin and adiponectin expression in visceral fat of obese rats: effect of weight loss. *Obes Res* 2002; 10(11):1095-1103.
 41. Savage DB, Sewter CP, y cols. Resistin/Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes* 2001; 50(10):2199-2202.
 42. Nagaev I, Smith U, y cols. Insulin resistance and type 2 diabetes are not related to resistin expression in human fat cells or skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285(2):561-564.
 43. Steppan CM, Bailey ST, y cols. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001; 409: 307-12.
 44. Wang H, Chu WS, y cols. Human resistin gene: molecular scanning and evaluation of association with insulin sensitivity and type 2 diabetes in caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(6):2520-2524.
 45. Vidal-Puig A, O'Rahilly S. Resistin: a new link between obesity and insulin resistance?. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001; 55(4):437-8.

46. Nogueiras R, González CR, y cols. Resistina: una nueva hormona expresada en el tejido adiposo. *Rev Esp Obes* 2005; 3(4):194-211.
47. Bruun JM, Lihn AS, y cols. Higher production of IL-8 in visceral vs. subcutaneous adipose tissue. Implication of nonadipose cells in adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 286 (1):E8-13.
48. Rotter V, Nagaev I, y cols. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem* 2003; 278 (46):45777-84.
49. Tilg H, Moschen AR. Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease. *Trends Endocrinol Metab* 2008; 19 (10):371-9.
50. Nonogaki K, Fuller GM, y cols. Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats. *Endocrinology* 1995; 136(5):2143-2149.
51. Pajvani UB, Du X, y cols. Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/ adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem* 2003; 278(11):9073-9085.
52. Berg AH, Combs TP, y cols. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13 (2):84-9.
53. Yamauchi T, Kamon J, y cols. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002; 8 (11):1288-95.
54. Vasseur F. Adiponectin and its receptors: partners contributing to the «vicious circle» leading to the metabolic syndrome? *Pharmacol Res* 2006; 53 (6):478-81.
55. Yamauchi T, Nio Y, y cols. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med* 2007; 13(3):332-9.
56. Yoon MJ, Lee GY, y cols. Adiponectin increases fatty acid oxidation in skeletal muscle cells by sequential activation of AMP-activated protein kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Diabetes* 2006; 55(9):2562-70.

57. Lindsay RS, Funahashi T, y cols. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet* 2002; 360(9326):57-58.
58. Spranger J, Kroke A, y cols. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 2003; 361(9353):226-228.
59. Flower DR. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J.*, 1996; 318: 1-14.
60. Goetz DH, Willie ST, y cols. Ligand preference inferred from the structure of neutrophil gelatinase associated lipocalin. *Biochem J.*, 2000; 39:1935-1941.
61. Schmidt-Ott KM, Mori K, y cols. Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol*, 2007; 18:407-413.
62. Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: new paths for an old shuttle. *Cancer Ther.*, 2007; 5(B):463-470.
63. Kjeldsen L, Johnsen AH, y cols. Isolation a primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem.*, 1993; 268:10425-10432.
64. Kjeldsen L, Bainton DF, y cols. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel matrix protein of specific granules in human neutrophils. *Blood*, 1994; 83:799-807.
65. Bauer M, Eickhoff JC, y cols. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is a predictor of poor prognosis in human primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2008; 108:389-397.
66. Nielsen BS, Borregaard N, y cols. Induction of NGAL synthesis in epithelial cells of human colorectal neoplasia and inflammatory bowel diseases. *Gut*, 1996; 38:414-420.
67. Furutani M, Arii S, y cols. Identification of a neutrophil gelatinase-associated lipocalin mRNA in human pancreatic cancers using a modified signal sequence trap method. *Cancer Lett.*, 1998; 122:209-214.
68. Bartsch S, Tschesche H. Cloning and expression of human neutrophil lipocalin cDNA derived from bone marrow and ovarian cancer cells. *FEBS Lett.*, 1995; 357: 255-259.

69. Yan QW, Yang Q, y cols. The adipokine lipocalin 2 is regulated by obesity and promotes insulin resistance. *Diabetes*, 2007; 56:2533-2540.
70. Zhang J, Wu Y, y cols. The role of lipocalin 2 in the regulation of inflammation in adipocytes and macrophages. *Mol Endocrinol*, 2008; 22:1416-1426.
71. Wang Y, Lam KS, y cols. Lipocalin-2 is an inflammatory marker closely associated with obesity, insulin resistance and hyperglycemia in humans. *Clin Chem.*, 2007; 53:34-41.
72. Auguet T, Quintero Y, y cols. Lipocalin 2 in Adipose Tissues of severely obese women: Positive relationship with proinflammatory cytokines. *Obesity*, 2011; 19:2295-2300.
73. Miranda PJ, DeFronzo RA, y cols. Metabolic Syndrome: definition, pathophysiology, and mechanisms. *Am Heart J*. 2005; 149:33-45.
74. ELISA principle ©Mabtech AB. <http://www.mabtech.com/Main/Page.asp?PageId=26>, consulta Agosto, 2012.
75. Kjeldsen L, Bainton DF, y cols. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel matrix protein of specific granules in human neutrophils. *Blood* 1994; 83:799–807.
76. Guo H, Zhang Y, y cols. Lipocalin 2 deficiency alters estradiol production and estrogen receptor signaling in female mice. *Endocrinology* 2012; 153:1183-1193.
77. Fasshauer M, Paschke R. Regulation of adipocytokines and insulin resistance. *Diabetologia* 2003; 46:1594-1603.
78. Cruz M, García-Macedo R, García-Valerio Y, Gutiérrez M, Medina-Navarro R, Durán G, y cols. Low adiponectin levels predict type 2 diabetes in Mexican children. *Diabetes Care* 2004; 27:1451-1453.
79. Domínguez Reyes Carlos A. Adiponectina: El tejido adiposo más allá de la reserva inerte de energía. *Revista de Endocrinología y Nutrición* Vol. 15, No. 3 Julio-Septiembre 2007; 149-155.

80. Yingfeng Deng, Philipp E. Scherer, Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic síndrome. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2012; 1212:E1-E19.
81. Díez JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormona adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol* 2003; 148:293-300.
82. Thraikill K, Moreau CS, y cols. Disease and gender specific dysregulation of NGAL and MMP-9 in type 1 diabetes mellitus. *Endocrine*, 2010; 37:336-343.
83. Ahima, R.S., S.Y. Osei. Adipokines in obesity. *Front. Horm. Res.* 2008; 36:182-197.

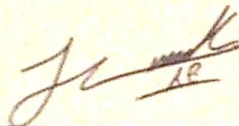
MIEMBROS DEL JURADO

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

"Asociación de las adipocinas lipocalina-2, resistina, leptina e interleucina-6 con la alteración de parámetros metabólicos en pacientes diabéticos", que presentó

NANCY YURITZI ESPINO RIVERA

El día 03 de Diciembre del año 2012



Presidente

Dr. Almanza Pérez Julio César

Laboratorio de Farmacología.

Depto. Ciencias de la Salud. UAM-I



Secretario

Dra. García Macedo Rebeca

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica.

Hospital de Especialidades, C.M.N., S. XXI, IMSS



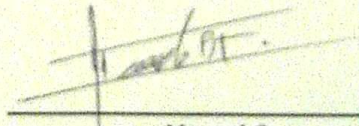
Vocal 1

Dra. Manuel Apolinar Leticia

Unidad de Investigación Médica en

Enfermedades Endócrinas.

Hospital de Especialidades, C.M.N., S. XXI, IMSS



Vocal 2

Dr. Blancas Flores Gerardo

Laboratorio de Farmacología,

Depto. Ciencias de la Salud, DCBS UAM-I