



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

TÍTULO

**ASOCIACIÓN DE LOS HAPLOTIPOS PAV Y AVI DEL GEN TAS2R38 CON
DIABETES TIPO 2 EN POBLACIÓN MEXICANA**

**TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS**

(BIOQUÍMICA CLÍNICA)

PRESENTA

MARÍA LLASBETH HERNÁNDEZ CALDERÓN

TUTORA: DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE
LA SALUD**

Ciudad Universitaria, CD. MX., septiembre de 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo fue realizado con el apoyo de los proyectos UNAM **PIAPI 1856** titulado: **Genotipificación de los polimorfismos rs713598: A/P, rs1726866: A/V, rs10246939: I/V del gen *TAS2R38*, en células del epitelio de la cavidad oral de pacientes con diabetes tipo 2.** Y el proyecto **PAPIME PE206518** titulado: **Fortalecimiento de la enseñanza de la farmacogenómica en la FES-Cuautitlán.**

Ambos bajo la dirección de la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo.

DEDICATORIAS

*Con todo mi amor a mi pequeña Amaya,
Por enseñarme que mientras exista 1% de posibilidad habrá 99% de esperanza.
Gracias por ser la alegría de todos mis días.
Te amo mi pequeña guerrera.*

*Con todo mi amor a Salvador,
por hacer de mis sueños los tuyos.
Este logro es todo tuyo.
Te amaré por siempre.*

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A mi querida **Universidad Nacional Autónoma de México**, por ser mi casa todo este tiempo y darme las mejores experiencias de mi vida.

Con especial cariño a la **Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo**, por confiar en mí y creer que podría llevar a término este proyecto. Por ser la mejor maestra, compartir todos sus conocimientos conmigo y apoyarme en los momentos más difíciles. Le estaré agradecida siempre.

Con todo mi amor a mis **padres**, por ser en todo momento el pilar de vida y un modelo de perseverancia y compromiso. Soy afortunada de ser su hija. Los amo.

A mis **hermanitos: Irene, Juan y Ana** por cuidar de mi cuando yo no podía hacerlo y animarme siempre a alcanzar mis metas. Son lo mejor que me ha dado la vida. Los amo.

A mi querida Profesora **Rosalba Bonilla Sánchez**, por ser todo un ejemplo de superación, dedicación, amor y compromiso. Gracias por todo su apoyo.

A mis **estimados estudiantes: Ana, Jessica, Abi, Alan, Javi y David** por su entusiasta colaboración y ganas de aprender.

A todas los participantes de este estudio que con la donación de sus muestras apoyan el desarrollo de la ciencia y hacen posible la búsqueda de estrategias que mejoren la calidad de vida de las personas que padecen diabetes en nuestro país.

Finalmente, a los miembros del **comité tutorial** y **miembros del Jurado** por su colaboración para mejorar este proyecto.

CRÉDITOS

- Al comité tutorial que llevó el seguimiento y revisión del presente proyecto y que fue conformado por los Doctores en Ciencias **Ramón Mauricio Coral Vázquez** (Escuela Superior de Medicina, IPN), **Salvador Fonseca Coronado** (Laboratorio de Inmunología de Enfermedades Infecciosas, FES-Cuautitlán) y **Sandra Díaz Barriga Arceo** (Laboratorio de Genética y Toxicología, FES-Cuautitlán)

- El desarrollo experimental y todas las determinaciones en las muestras del presente proyecto se realizó en el **Laboratorio de Citogenética Humana** de la **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán**, campo 1, bajo la dirección de la **Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo**.

- La genotipificación llevada a cabo en el presente proyecto se realizó en el **Laboratorio de Inmunología de Enfermedades Infecciosas de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria** de la FES-Cuautitlán bajo la dirección del **Dr. Salvador Fonseca Coronado** y con la colaboración de la **M en C. Ali Berenice Posada Reyes** y la **Lic. En Farmacia Ixchel Méndez Sosa**.

- El análisis estadístico se realizó con el apoyo del la **M en C. Jennifer Alcántara Blancarte**.

RESUMEN

Introducción: T2R38 es un receptor perteneciente a la familia T2R cuyas variantes polimórficas determinan la variabilidad a la respuesta al sabor amargo de la feniltiocarbamida (PTC). Dichas variantes dan lugar a dos haplotipos principales, PAV que corresponde al fenotipo degustador y AVI que corresponde al fenotipo no degustador. El principal sitio de expresión de T2R38 es la cavidad oral y recientemente se ha demostrado su expresión en diversos tejidos extraorales que no tienen relación directa con la percepción del sabor, tal es el caso de las células enteroendócrinas tipo L del sistema gastrointestinal, en las que al activarse este receptor se estimula la liberación del péptido GLP-1, similar a glucagón- 1, que al ser una hormona incretina disminuye los valores plasmáticos de glucosa.

Objetivo: El presente trabajo tuvo como objetivo principal determinar si existe asociación entre los haplotipos PAV y AVI del gen *TAS2R38* con diabetes tipo 2 en población mexicana.

Población y Métodos: se realizó un estudio de casos y controles, transversal y retrospectivo en el cual se analizó un grupo de 85 pacientes diagnosticados con diabetes tipo 2 y 115 controles a los que se les realizaron las determinaciones bioquímicas de glucosa, colesterol y triacilglicéridos en sangre capilar, se les tomaron medidas antropométricas y una muestra de saliva a partir de la cual se aisló DNA y se genotipificaron los polimorfismos rs713598, rs1726866 y rs10246939 del gen *TAS2R38* por medio de la técnica de discriminación alélica con sondas TaqMan en PCR tiempo real.

Resultados: En la población analizada se identificaron 3 haplotipos principales (PAI, PAV y AVI) de los cuales el más frecuente en población diabética fue el haplotipo PAV (37%) y cuatro haplotipos raros con frecuencias menores al 5% en ambos grupos de estudio (PVI, AVV, PVV y AAI). El análisis mostró una asociación de riesgo entre el haplotipo PAV en heterocigosis con PAI (PAV/PAI) y diabetes tipo 2 (OR=2.514, IC95= 1.131-5.590, $p=0.027$).

Conclusión: el haplotipo PAV en heterocigosis con PAI presenta asociación de riesgo con diabetes tipo 2 en población mexicana, relacionada posiblemente a preferencias alimentarias mientras que el haplotipo AVI no se encontró asociado a esta enfermedad en la población de estudio.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iii
Abreviaturas	iv
I. Introducción	1
1. Diabetes.....	1
1.1 Definición	1
1.2 Clasificación y diagnóstico.....	1
1.3 Estadísticas sobre diabetes en México y el Mundo	2
2. Sabor amargo	6
2.1 Receptores del sabor amargo	6
2.2 Mecanismo de transducción del sabor amargo	7
2.2.1 Vía canónica	7
2.2.2 Regulación autónoma celular.....	9
2.2.3 Mecanismo paracrino.....	10
3. Antecedentes	12
3.1 T2R38.....	12
3.2 Polimorfismos del gen <i>TAS2R38</i>	13
3.3 Expresión en tejidos	16
3.4 Importancia de T2R38 en el metabolismo energético y su relación con diabetes	17
II. JUSTIFICACIÓN.....	21
III. OBJETIVOS	22
a. OBJETIVO GENERAL.....	22
b. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	22
V. HIPÓTESIS.....	22
VI. DISEÑO EXPERIMENTAL	23
a. Consideraciones éticas.....	23
b. Población de estudio.....	23
c. Cálculo del tamaño de la muestra.....	24

VII.	METODOLOGÍA.....	25
a.	Determinaciones bioquímicas a partir de sangre capilar.....	25
b.	Extracción de DNA a partir de muestras de saliva	25
c.	Cuantificación del DNA.....	26
d.	Evaluación de la integridad del DNA.....	26
e.	Genotipificación	27
f.	Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	28
g.	Análisis estadístico	28
VIII.	Resultados	30
IX.	Discusión	38
X.	Conclusión	44
XI.	Perspectivas	45
	ANEXO 1	46
	ANEXO 2	47
	ANEXO 3	52
	REFERENCIAS.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Número de personas con diabetes por región, edad y su proyección al año 2045	3
Fig. 2 Prevalencia de diabetes previo diagnóstico médico por sexo y edad	4
Fig. 3 Mecanismo de transducción de señales del sabor amargo, vía canónica.....	8
Fig. 4 Modelo autónomo celular de la cascada de señalización de los T2R.....	9
Fig. 5 Modelo paracrino de la cascada de señalización de los T2R en enterocitos.....	10
Fig. 6 Modelo paracrino de la cascada de señalización de los T2R en células del intestino	11
Fig. 7 Modelado del receptor T2R38.....	12
Fig. 8 Distribución mundial de los haplotipos más frecuentes del gen TAS2R38	14
Fig. 9 Modelado de la interacción de PTC con los receptores T2R38 PAV y T2R38 AVI	15
Fig. 10 Función de las hormonas gastrointestinales en la regulación del vaciado gástrico, la ingesta energética y la glucosa post-prandial.....	17
Fig. 11 Modelo endócrino de la cascada de señalización de los T2R en células L del intestino	19
Fig. 12 Discriminación alélica con sondas TaqMan	27
Fig. 13 Integridad de muestras de DNA genómico extraído de muestras de saliva de individuos no diabéticos (S53-S55) y de individuos diabéticos (DM1-DM7)	32
Fig. 14 LD Plot para los SNPs rs713598, rs1726866 y rs10246939 del gen TAS2R38 generado en Haploview 4.2.....	34
Fig. 15 Impacto de las preferencias alimentarias en la homeostasis de glucosa mediada por T2R38	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Criterios para el diagnóstico de diabetes	2
Tabla 2 Ciudades/territorios con mayor número de diabéticos (de 20-79 años) en 2017 y su proyección al 2045	5
Tabla 3 Genes TAS2R en humanos	6
Tabla 4 SNPs del gen TAS2R38	13
Tabla 5 Principales haplotipos del gen TAS2R38 y su asociación fenotípica con la percepción al sabor de PTC	13
Tabla 6 Frecuencia de los haplotipos del gen TAS2R38 en diferentes poblaciones	14
Tabla 7 Expresión y función de T2R38 en órganos extraorales	16
Tabla 8 Criterios de inclusión y exclusión para el grupo control	23
Tabla 9 Criterios de inclusión y exclusión para el grupo de pacientes con DT2	24
Tabla 10 Sondas TaqMan para los polimorfismos rs713598, rs1726866 y rs10246939 del gen TAS2R38 ..	27
Tabla 11 Componentes de la reacción para PCR	28
Tabla 12 Condiciones de reacción para la PCR en tiempo real	28
Tabla 13 Características antropométrica y bioquímicas de las poblaciones de estudio	31
Tabla 14 Equilibrio de Hardy-Weinberg para la población control	32
Tabla 15 Modelos genéticos de asociación de los polimorfismos en estudio con diabetes tipo 2 en población mexicana	33
Tabla 16 Desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos del gen TAS2R38	33
Tabla 17 Frecuencia de los haplotipos del gen TAS2R38 encontrados en casos y controles de la población mexicana	34
Tabla 18 Frecuencia de los diplotipos del gen TAS2R38 encontrados en población mexicana	35
Tabla 19 Asociación de los diplotipos del gen TAS2R38 con diabetes tipo 2 en población mexicana	36
Tabla 20 Cálculo del poder estadístico y recálculo de la n poblacional	37
Tabla 21 Comparación de las frecuencias de los polimorfismos rs713598, rs1726866 y rs10246939 del gen TAS2R38 en población mexicana	40

Abreviaturas

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
2-h PG	Valor de glucosa en plasma 2 h
A1C	Hemoglobina glicosilada
ABCB1	Casete de unión a ATP subfamilia B miembro 1
ADA	Asociación Americana de Diabetes
AHFD	Antecedentes heredo-familiares de diabetes
ATP	Adenosin trifosfato
BK	Canales de potasio
CALHMI	Canales iónicos tipo modulador 1 de la homeostasis de calcio, dependiente de voltaje
CCK	Colecistocinina
CCK1	Receptor de colecistocinina A
CCK2	Receptor de colecistocinina B
CEE	Células enteroendócrinas
CUSI	Clínica Universitaria de Salud Integral
DAG	Diacilglicerol
DB	Benzoato de denatonio
DCCT	Ensayo de control y complicaciones de la diabetes
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPP4	Dipeptidilpeptidasa 4
DT2	Diabetes tipo 2
EHW	Equilibrio de Hardy-Weinberg
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud
FPG	Valor de glucosa en plasma en ayunas
GDM	Diabetes mellitus gestacional
GI	Gastrointestinal
GLP-1	Péptido similar a glucagón tipo 1
GLUT2	Transportador de glucosa, miembro 2
IDF	Federación Internacional de Diabetes
IL	Interleucina
ILC2	Células linfoides innatas tipo 2
IP ₃	Inositol trifosfato
IP3R	Receptor para Inositol trifosfato
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
NGSP	Programa Nacional de Estandarización de Glicohemoglobina
NO	Óxido nítrico
OGTT	Prueba de tolerancia oral a la glucosa
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIP ₂	Fosfatidilinositol bifosfato
PLC	Fosfolipasa C
PROP	6-n-propiltiouracilo
PTC	Feniltiocarbamida
PYY	Péptido YY
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SNC	Sistema nervioso central
SNPs	Polimorfismos de nucleótido único

T2R	Receptor del sabor tipo 2
T2R38	Receptor del sabor tipo 2, miembro 38
TBE	Tris-Ácido bórico-EDTA
TM	Trasmembranales
TRPM5	Receptor de potencial transitorio con características de canal catiónico, subfamilia M, miembro 5
TTS	Tritón-Tris-Sacarosa
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

I. Introducción

1. Diabetes

1.1 Definición

El término «diabetes» define alteraciones metabólicas de múltiples etiologías caracterizadas por hiperglucemia crónica y trastornos en el metabolismo de los hidratos de carbono, las grasas y las proteínas, resultado de defectos en la secreción de insulina, en la acción de esta o en ambas (Ezkurra LP, 2016).

La diabetes puede presentarse con síntomas característicos como sed, poliuria, visión borrosa, pérdida de peso y, en ocasiones, polifagia. Frecuentemente, los síntomas no son graves o pueden estar ausentes y, en consecuencia, la hiperglucemia puede provocar cambios funcionales y patológicos durante largo tiempo antes del diagnóstico. Estas patologías pueden desarrollar a medio y largo plazo complicaciones de muy diversa índole, tales como, pérdida de visión, afectación renal, insuficiencia arterial, cardiopatía isquémica y principalmente las que competen al sistema nervioso central, autónomo y periférico (Ezkurra, 2016; Tébar, 2014)

1.2 Clasificación y diagnóstico

La Asociación Americana de Diabetes (ADA) en la revisión 2019 clasifica a la diabetes en las siguientes categorías:

- a) Diabetes tipo 1: causada por la destrucción autoinmune de las células β , que generalmente conduce a una deficiencia absoluta de insulina.
- b) Diabetes tipo 2 (DT2): debido a la pérdida progresiva de la secreción de insulina de las células β con frecuencia el problema de fondo es la resistencia a la insulina.
- c) Diabetes mellitus gestacional (GDM, por sus siglas en inglés): diabetes diagnosticada en el segundo o tercer trimestre del embarazo que no fue evidente antes de la gestación.

- d) Tipos específicos de diabetes debido a otras causas, por ejemplo, síndromes de diabetes monogénica (como diabetes neonatal y diabetes de inicio en la madurez [MODY]), enfermedades del páncreas exocrino (como fibrosis quística y pancreatitis) y diabetes inducida por sustancias químicas (como el uso de glucocorticoides, en el tratamiento del VIH o después de un trasplante de órganos) (ADA, 2019)

La diabetes se puede diagnosticar en función de los criterios de glucosa en plasma, ya sea el valor de glucosa en plasma en ayunas (FPG) o el valor de glucosa en plasma 2 horas después (2-h PG) de una prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT) de 75 gr, o los criterios de Hemoglobina glicosilada (A1C) (Tabla 1).

Tabla 1 Criterios para el diagnóstico de diabetes
(ADA, 2019)

FPG	2-H PG	A1C
FPG \geq 126 mg/dL (7.0 mmol/L) *	PG de 2h \geq 200 mg / dL (11.1 mmol / L) durante el OGTT**	A1C \geq 6.5% (48 mmol / mol) ***

* El ayuno se define como no ingesta calórica por al menos 8 h.

** La prueba debe realizarse como lo describe la OMS, usando una carga de glucosa que contenga el equivalente de 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua.

*** La prueba se debe realizar en un laboratorio usando un método que esté certificado por el Programa Nacional de Estandarización de Glicohemoglobina (NGSP, por sus siglas en inglés) y estandarizado al ensayo de control y complicaciones de la diabetes (DCCT, por sus siglas en inglés)

1.3 Estadísticas sobre diabetes en México y el Mundo

La diabetes tipo dos (DT2) representa del 90 al 95% de todos los casos de diabetes a nivel mundial. La prevalencia de DT2 está aumentando en todo el mundo en gran parte debido al incremento de la obesidad y a la alta frecuencia de sedentarismo en la población. Los factores exactos que conducen al desarrollo de esta enfermedad no se han aclarado plenamente, aunque la evidencia actual se ha enfocado en cuatro grandes polos de investigación: a) resistencia a la insulina e inflamación; b) gluco-lipotoxicidad y disfunción de la célula β

pancreática; c) disfunción mitocondrial; d) plasticidad celular y memoria metabólica (Pérez, 2009).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que, en 2012, fallecieron 1.5 millones de personas como consecuencia directa de la diabetes, más del 80% de estas muertes se registraron en países de ingresos bajos y medios. Para 2014 el 9% de los adultos (18 años o mayores) tenía diabetes y según sus proyecciones esta enfermedad será la séptima causa de mortalidad en 2030 (OMS, 2015). Por otra parte, la Federación Internacional de Diabetes (IDF por sus siglas en inglés) reportó que el incremento de personas con diabetes para el año 2045, sólo en la región de Norte América (que incluye a México) será del 35%. Mientras que a nivel mundial habrá un aumento de 111 millones de afectados, pasando de 327 millones de diabéticos en el año 2017 a 438 millones de diabéticos en el año 2045 (Fig. 1) (IDF, 2017).

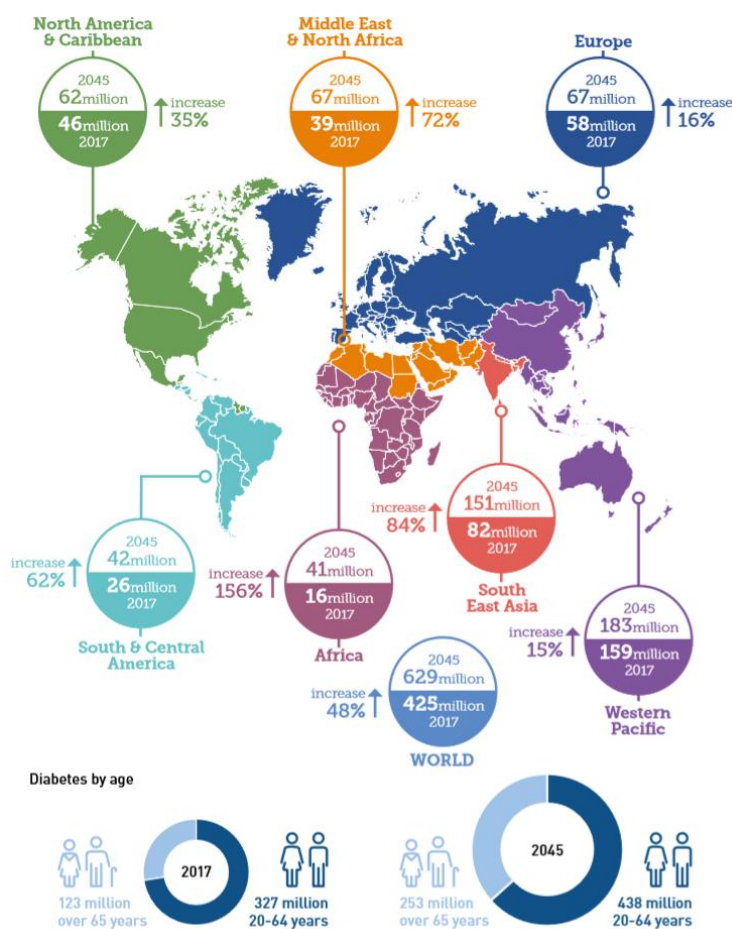


Fig. 1. Número de personas con diabetes por región, edad y su proyección al año 2045
Fuente: IDF, 2017

Por lo que compete a México, la Encuesta Nacional de Salud (ENSANUT) 2016 reportó que la prevalencia de diabetes a nivel Nacional fue del 9.4% (10.3% de las mujeres y 8.4% de los hombres), siendo el Distrito Federal, Nuevo León, Veracruz, Tamaulipas, Durango y San Luis Potosí los estados con mayor prevalencia. En comparación con la ENSANUT 2012 (9.2%) se observó un aumento del 0.2% en la prevalencia de diabetes por diagnóstico médico previo y un aumento del 2.4% con respecto a la ENSANUT 2006 (7.2%) (Fig. 2). El mayor aumento de la prevalencia de diabetes, al comparar la ENSANUT 2012 con la ENSANUT 2016, se observó entre los hombres de 60 a 69 años y entre las mujeres con 60 o más años.

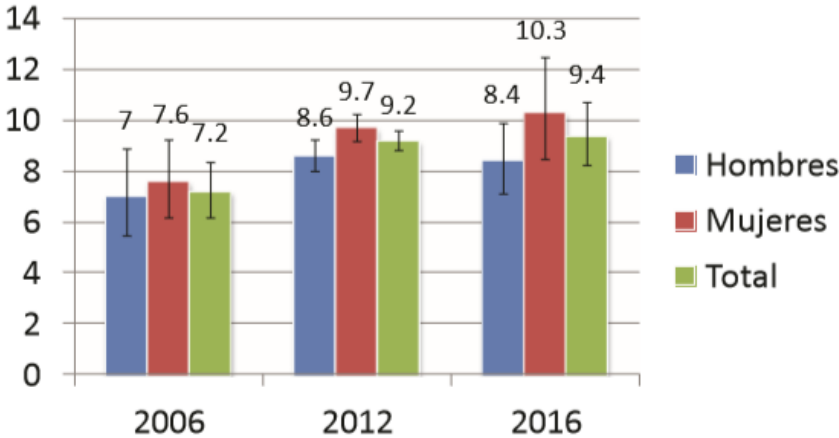


Fig. 2 Prevalencia de diabetes previo diagnóstico médico por sexo y edad
Fuente: ENSANUT, 2016

Actualmente, México ocupa el 5to lugar a nivel mundial con mayor prevalencia de diabetes (Tabla 2) presentando 12 millones de personas diabéticas y según proyecciones de la IDF para el año 2045 ocupará el 4to lugar a nivel mundial con 21.8 millones de diabéticos (IDF, 2017). En 2016 la diabetes representó la segunda causa de mortalidad en población mexicana causando 105,574 de defunciones (15.4% del total de defunciones registradas) y representa un gasto de 3,430 millones de dólares al año en su atención y complicaciones (FMD, 2017).

Tabla 2 Ciudades/territorios con mayor número de diabéticos (de 20-79 años) en 2017 y su proyección al 2045
Fuente: IDF, 2017

2017			2045		
Rank	Country/territory	Number of people with diabetes	Rank	Country/ territory	Number of people with diabetes
1	China	114.4 million (104.1-146.3)	1	India	134.3 million (103.4-165.2)
2	India	72.9 million (55.5-90.2)	2	China	119.8 million (86.3-149.7)
3	United States	30.2 million (28.8-31.8)	3	United States	35.6million (33.9-37.9)
4	Brazil	12.5 million (11.4-13.5)	4	Mexico	21.8 million (11.0-26.2)
5	Mexico	12.0 million (6.0-14.3)	5	Brazil	20.3 million (18.6-22.1)
6	Indonesia	10.3 million (8.9-11.1)	6	Egypt	16.7million (9.0-19.1)
7	Russian Federation	8.5 million (6.7-11.0)	7	Indonesia	16.7million (14.6-18.2)
8	Egypt	8.2million (4.4-9.4)	8	Pakistan	16.1 million (11.5-23.2)
9	Germany	7.5 million (6.1-8.3)	9	Bangladesh	13.7 million (11.3-18.6)
10	Pakistan	7.5 million (5.3-10.9)	10	Turkey	11.2 million (10.1-13.3)

2. Sabor amargo

2.1 Receptores del sabor amargo

En los seres humanos, se han identificado más de 30 receptores del sabor amargo (Tabla 3) todos ellos pertenecen a la familia T2R (Bering, 2013).

Tabla 3 Genes TAS2R en humanos
(Bachmanov y Beauchamp, 2007)

Symbol	Chromosome, cytogenetic band	Genome coordinate, bp	Aliases
TAS2R1	5p15	9,682,109	T2R1, TRB7
TAS2R2	7p21	12,497,246	T2R2, T2R02
TAS2R16	7q31	122,421,995	T2R16
TAS2R3	7q31	141,110,366	T2R3
TAS2R4	7q31	141,124,758	T2R4
TAS2R5	7q31	141,136,486	T2R5
TAS2R38	7q34	141,318,900	T2R61, PTC, phenylthiocarbamide tasting
TAS2R39	7q34	142,590,634	T2R39, T2R57
TAS2R40	7q34	142,629,294	T2R40, T2R58, GPR60
	7q34	142,844,250	T2R62, TAS2R62
TAS2R62P			
TAS2R60	7q35	142,850,668	T2R56; T2R60
TAS2R41	7q35	142,885,088	T2R41, T2R59
TAS2R7	12p13	10,845,398	T2R7, TRB4
TAS2R8	12p13	10,849,917	T2R8, TRB5
TAS2R9	12p13	10,852,960	T2R9, TRB6
TAS2R10	12p13	10,869,212	TRB2, T2R10
TAS2R12	12p13	10,938,800	T2R12, T2R26, TAS2R26
TAS2R13	12p13	10,951,792	TRB3, T2R13
TAS2R14	12p13	10,982,120	TRB1, T2R14
TAS2R15	12p13	11,008,316	T2R15
TAS2R50	12p13	11,029,827	T2R50, T2R51
TAS2R49	12p13	11,040,812	T2R49, T2R56
TAS2R48	12p13	11,065,538	T2R48
TAS2R44	12p13	11,074,274	T2R44, T2R53
TAS2R63P	12p13	11,093,122	T2R63
TAS2R46	12p13	11,105,262	T2R46, T2R54
TAS2R64P	12p13	11,122,108	T2R64, T2R64P
TAS2R43	12p13	11,135,168	T2R43, T2R52
TAS2R65P	12p13	11,203,560	T2R65; TAS2R65
TAS2R42	12p13	11,229,866	T2R24, T2R42, T2R55, TAS2R55, T2R55
TAS2R18			T2R18
TAS2R19			T2R19
TAS2R20			T2R20
TAS2R22			T2R22
TAS2R23			T2R23
TAS2R30			T2R30
TAS2R31			T2R31
TAS2R33			T2R33
TAS2R36			T2R36
TAS2R37			T2R37
TAS2R45			GPR59, T2R45, ZG24P
TAS2R47			T2R47
TAS2R6			T2R6, T2R06

2.2 Mecanismo de transducción del sabor amargo

Se han identificado al menos tres mecanismos de señalización de los T2R independientes a la vía canónica, según el tejido en el que se expresan. Estos se clasifican en regulación autónoma celular, regulación paracrina y regulación endócrina.

2.2.1 Vía canónica

La vía de señalización canónica (Fig. 3) comparte moléculas de señalización que son comunes para las moléculas amargas, dulces y umami, las cuales incluyen una proteína G heterotrimérica constituida por las subunidades α (α -gustducina), β ($G\beta$ -3) y γ ($G\gamma$ 13), una fosfolipasa C (PLC β 2), el receptor para inositol trifosfato (IP3R) y el receptor de potencial transitorio con características de canal catiónico, subfamilia M, miembro 5 (TRPM5) el cual es regulado por las concentraciones de Ca^{2+} intracelular de manera que a concentraciones bajas se activa y a concentraciones altas se inhibe.

Una vez que el T2R es activado, la proteína G disocia sus subunidades α y $\beta\gamma$, estas últimas se encargan de activar a la fosfolipasa C β 2 cuya función es catalizar la conversión de fosfatidilinositol bifosfato (PIP $_2$) (componente de la membrana celular) al segundo mensajero inositol trifosfato (IP $_3$) y diacilglicerol (DAG). El IP $_3$ viaja hasta el retículo endoplásmico donde activa a IP3R- sensible a Ca^{2+} , como consecuencia del aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) aumenta también el flujo de Na^+ a través del canal TRPM5. La entrada de Na^+ despolariza a la célula y causa la liberación de ATP como neurotransmisor, el cual sale de la célula a través de uniones gap o mediante los canales iónicos tipo modulador 1 de la homeostasis de calcio, dependiente de voltaje (CALHMI). Finalmente, el ATP activa los receptores purinérgicos en las fibras nerviosas de las papilas gustativas y el resultado es un impulso nervioso que se transmite al centro del sabor en el sistema nervioso central para iniciar la percepción del sabor amargo (Lu *et al.* 2017; Rozengurt, 2006; Kokrashvili *et al.* 2009; GeneCards, 2017).

Una característica del sabor amargo mediado por IP $_3$ es que desencadena la exocitosis del neurotransmisor desde la célula receptora hacia la neurona que la inerva sin modificar el

potencial de membrana. El calcio requerido para la liberación del neurotransmisor proviene de depósitos intracelulares y no del líquido extracelular (que es la fuente más habitual en los sistemas de segundos mensajeros que modifican las permeabilidades y, por lo tanto, el potencial de membrana de la célula receptora). Algunos sabores amargos (quinona, cafeína) se unen a receptores de membrana bloqueando canales de K^+ (Duorkin *et al.* 2010).

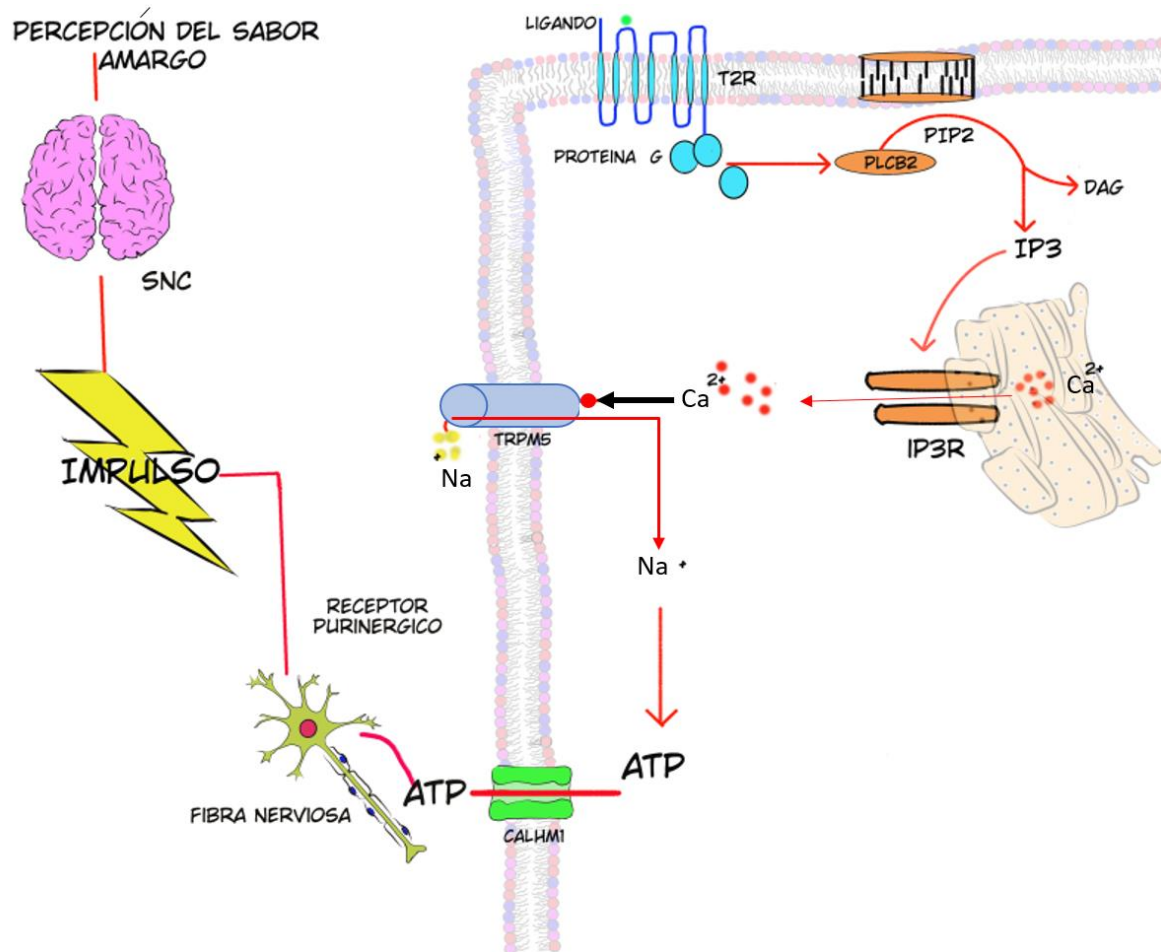


Fig. 3 Mecanismo de transducción de señales del sabor amargo, vía canónica.

Los T2R son una familia de receptores unidos a proteínas G heterotriméricas, una vez que son activados por su ligando específico la proteína G sufre un cambio conformacional que consiste en la disociación de la fracción α de la $\beta\gamma$, estas últimas se encargan de activar a la fosfolipasa $C\beta 2$ cuya función es catalizar la conversión de fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2) al segundo mensajero inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). El IP_3 viaja hasta el retículo endoplásmico donde activa a IP_3R - sensible a Ca^{2+} , como consecuencia del aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) aumenta también el flujo de Na^+ a través del canal TRPM5. La entrada de Na^+ despolariza a la célula y causa la liberación de ATP como neurotransmisor. Finalmente, el ATP activa los receptores purinérgicos en las fibras nerviosas de las papilas gustativas y el resultado es un impulso nervioso que se transmite al centro del sabor en el sistema nervioso central para iniciar la percepción del sabor amargo. Fuente: Hernández Calderón María Llasbeth, Elaboración propia.

Las tres cascadas que se presentan a continuación ocurren todas ellas en células diferentes a las gustativas y a pesar de ello comparten la parte inicial de la cascada con la vía canónica, desde la activación del receptor hasta el aumento de $[Ca^{2+}]_i$.

2.2.2 Regulación autónoma celular

Esta vía se identificó por primera vez en el epitelio ciliado de las vías aéreas humanas en las cuales los compuestos amargos causan un aumento dosis-dependiente de la $[Ca^{2+}]_i$ y como consecuencia aumenta la frecuencia del movimiento ciliar. El mecanismo a través del cual el calcio puede regular esta función no ha sido determinado, sin embargo, se cree que es posible que actúe directa o indirectamente vía nucleótido cíclico-dependiente (Fig. 4A).

Otro ejemplo de este mecanismo se produce en el músculo liso de las vías respiratorias, en el que las sustancias de sabor amargo intervienen en la relajación de las vías aéreas precontraídas. Lo que sigue siendo discutible es cómo los degustadores del sabor amargo relajan este músculo liso. Deshpande *et al.* 2010 propusieron que los saborizantes amargos activan los canales de K^+ (BK) activados por Ca^{2+} causando la hiperpolarización de la membrana y llevando a la relajación (Fig. 4B, lado izquierdo). Pero varios investigadores han determinado que al medir directamente las corrientes de los canales BK, los degustadores del sabor amargo no activan estos canales, sino que los inhiben. Investigaciones recientes muestran que las subunidades $\beta\gamma$ de la gustducina son críticas para la relajación de las vías respiratorias inducidas por el sabor amargo. Estas subunidades pueden inhibir los canales de Ca^{2+} tipo L dependientes de voltaje y disminuir $[Ca^{2+}]_i$ (que es elevada por los broncoconstrictores), llevando a la relajación (Fig. 4B, lado derecho) (Lu *et al.* 2017).

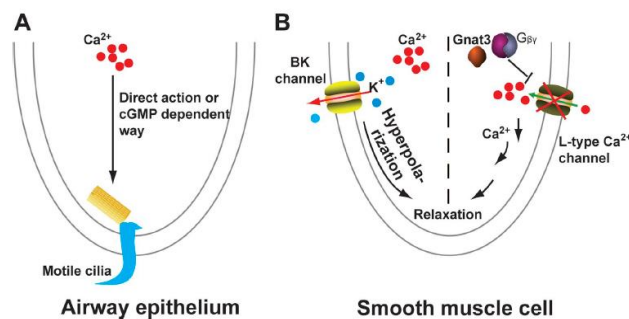


Fig. 4 Modelo autónomo celular de la cascada de señalización de los T2R
A) Incremento de la frecuencia del movimiento ciliar en vías respiratorias inducido por sustancias amargas. B) Relajación de las células del músculo liso precontraídas en degustadores del sabor amargo. Fuente: (Lu *et al.* 2017)

2.2.3 Mecanismo paracrino

En el intestino, toxinas de la dieta o compuestos amargos producidos por bacterias pueden activar T2Rs en las células enteroendócrinas (CEE) para liberar la hormona peptídica colecistocinina (CCK), que actúa a través del receptor de colecistocinina B (CCK2) en los enterocitos vecinos para promover la acción del transportador de casete de unión a ATP, familia B, miembro 1 (ABCB1) para bombear toxinas fuera de los enterocitos (Fig. 5 derecha). Alternativamente, la CCK liberada por las CEE también puede activar los receptores para colecistocinina A (CCK1) en las fibras sensoriales del nervio vago para enviar señales al cerebro para limitar la ingesta de alimentos (Fig. 5 izquierda) (Lu *et al.* 2017).

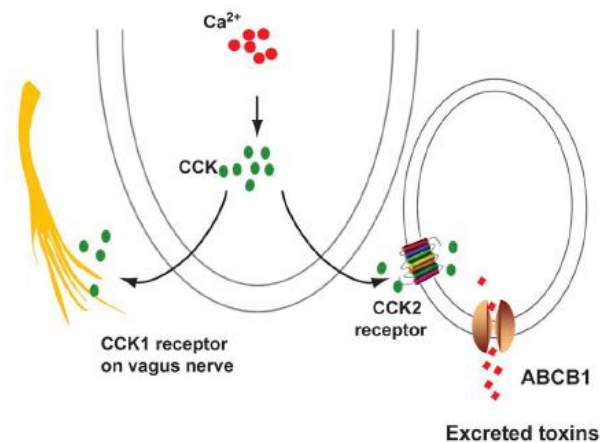


Fig. 5 Modelo paracrino de la cascada de señalización de los T2R en enterocitos

*En el intestino, las toxinas de la dieta o los compuestos amargos derivados del metabolismo de bacterias activan los T2R en las CEE para liberar la hormona peptídica CCK, que actúa a través de los receptores CCK2 en los enterocitos vecinos para promover la activación de ABCB1 encargada de bombear toxinas fuera de los enterocitos (derecha). Alternativamente, CCK liberado por EECs también puede activar los receptores CCK1 en las fibras sensoriales del nervio vago para enviar señales al cerebro para limitar la ingesta de alimentos (izquierda). Modificado de: (Lu *et al.* 2017).*

Recientemente, se demostró que las células con forma de “cepillo” (tuft cells) en el intestino activan la inmunidad tipo 2 secundaria a una infección parasitaria a través de la cascada canónica del receptor de sabor GPCR (T1R o T2R) y también forman un circuito de alimentación que da como resultado su propia hiperplasia (Fig. 6).

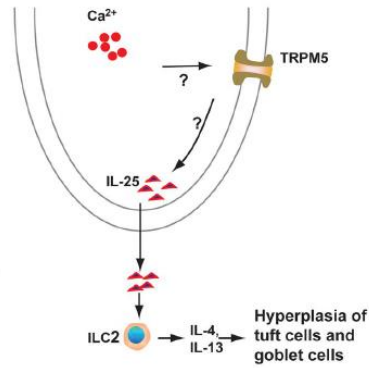


Fig. 6 Modelo paracrino de la cascada de señalización de los T2R en células del intestino
 En las células con forma de “cepillo” (tuft cells) del intestino, los parásitos activan la vía clásica de la cascada de señalización de los T2R y liberan IL-25, que a su vez aumenta el número de células linfoides innatas tipo 2 (ILC2) y aumenta la secreción de las citocinas IL-13 e IL-4; estas citocinas promueven posteriormente la hiperplasia de las tuft cells y las células caliciformes (Fig. 6) (Lu et al. 2017). Modificado de: (Lu et al. 2017).

3. Antecedentes

3.1T2R38

El receptor T2R38 es probablemente el miembro más estudiado de la familia de receptores tipo 2 de sabor amargo ya que está relacionado con la percepción de los compuestos sintéticos feniltiocarbamida (PTC, por sus siglas en inglés) y 6-n-propiltiouracilo (PROP) que se caracterizan por ser compuestos amargos (Hiroko *et al.* 2012).

El producto del gen *TAS2R38* es una proteína con función de receptor acoplado a proteínas G (Fig. 7A) que se caracteriza por poseer un extremo NH₂- terminal extracelular corto, 7 dominios transmembranales (TM) α -hélice, 3 loops extracelulares (exoloops), 3 loops citoplasmáticos (citoloops) y un segmento COOH- terminal (Rozenfurt, 2006), está constituido por 333 aminoácidos y presenta un peso molecular de 37892 Da. El gen que codifica para este receptor se encuentra localizado en la región cromosómica 7q34 (NCBI, 2016; GeneCards, 2017).

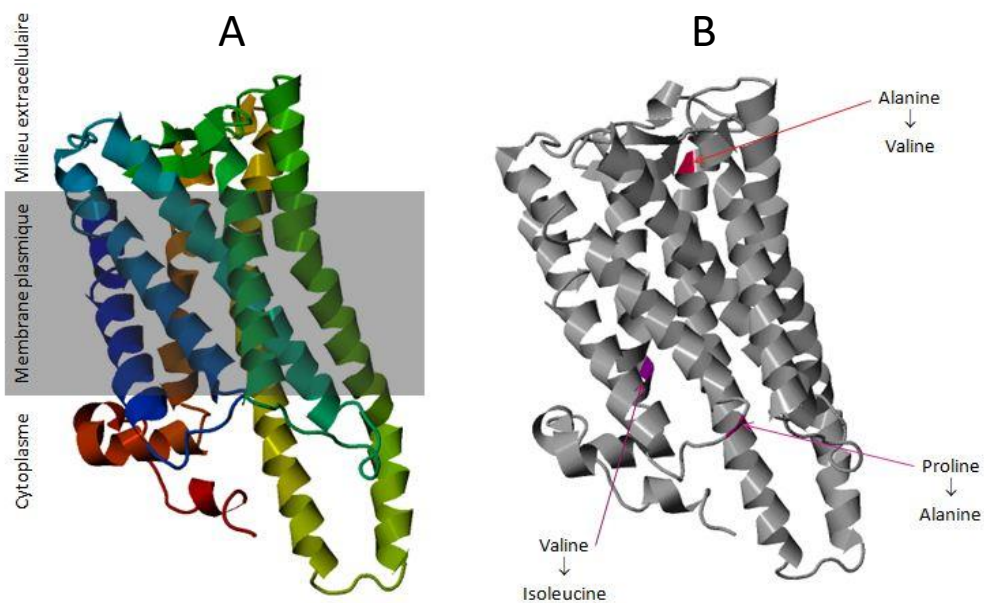


Fig. 7 Modelado del receptor T2R38

A) Modelo teórico del receptor T2R38. B) Localización de los aminoácidos variantes según los alelos. A priori, la alanina en la posición 262 estaría en el dominio extracelular, mientras que la Prolina49 y la Valina296 estarían en el lado citoplásmico. Modificado de: <http://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biologie/spip.php?article367>

3.2 Polimorfismos del gen *TAS2R38*

El gen *TAS2R38* posee tres polimorfismos de nucleótido único (SNPs) que producen las siguientes sustituciones de aminoácidos: A49P, A262V y V296I (Fig. 7B y Tabla 4) (Keller *et al.* 2013)

Tabla 4 SNPs del gen *TAS2R38*

<i>SNP</i>	<i>Posición del nucleótido</i>	<i>Cambio de base</i>	<i>Cambio en el codón</i>	<i>Posición del aminoácido</i>	<i>Cambio del aminoácido</i>
rs713598	145	C/G	GCA>CCA	49	P/A
rs1726866	785	C/T	GTT>GCT	262	A/V
rs10246939	886	G/A	ATC>GTC	296	V/I

Estos SNPs dan lugar a dos haplotipos principales (Tabla 5): PAV, la variante degustadora dominante y AVI, el no degustador recesivo. Estos polimorfismos son los principales responsables de la variabilidad individual en la percepción del sabor amargo en respuesta a PTC y PROP (Roudnitzky *et al.* 2015). Además, se han identificado dos haplotipos raros con frecuencia <5%: AAV y AAI; dos haplotipos extremadamente raros con frecuencia <1%: PAI y PVI y otros dos posibles haplotipos: AVV y PVV que sólo se han reportado individualmente en dos estudios (Risso *et al.* 2016).

Tabla 5 Principales haplotipos del gen *TAS2R38* y su asociación fenotípica con la percepción al sabor de PTC

<i>Haplotipo</i>	<i>Fenotipo</i>
PAV/PAV	Súper degustadores
PAV/AVI	Degustadores
AVI/AVI	No degustadores

La frecuencia con la que se presentan estos haplotipos a nivel mundial en diferentes poblaciones se muestra en la Tabla 6:

Tabla 6 Frecuencia de los haplotipos del gen TAS2R38 en diferentes poblaciones
(Risso et al. 2016)

Population	PAV	AVI	AAV	AVV	PAI	PVI	AAI	PVV
All	50.76%	42.70%	2.48%	0.32%	0.18%	0.07%	3.39%	0.10%
Africans	50.76%	35.18%	0.61%	0.08%	0.00%	0.15%	13.22%	0.00%
Asians	64.51%	35.31%	0.00%	0.17%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
Europeans	45.66%	49.22%	3.56%	0.49%	0.32%	0.03%	0.55%	0.17%
Americans	68.61%	26.69%	2.26%	0.00%	0.00%	0.19%	2.26%	0.00%

Como se puede apreciar en la tabla 4 los haplotipos PAV, AVI y AAI son los más frecuentes a nivel mundial, en la figura 8 se muestra su distribución a nivel mundial.

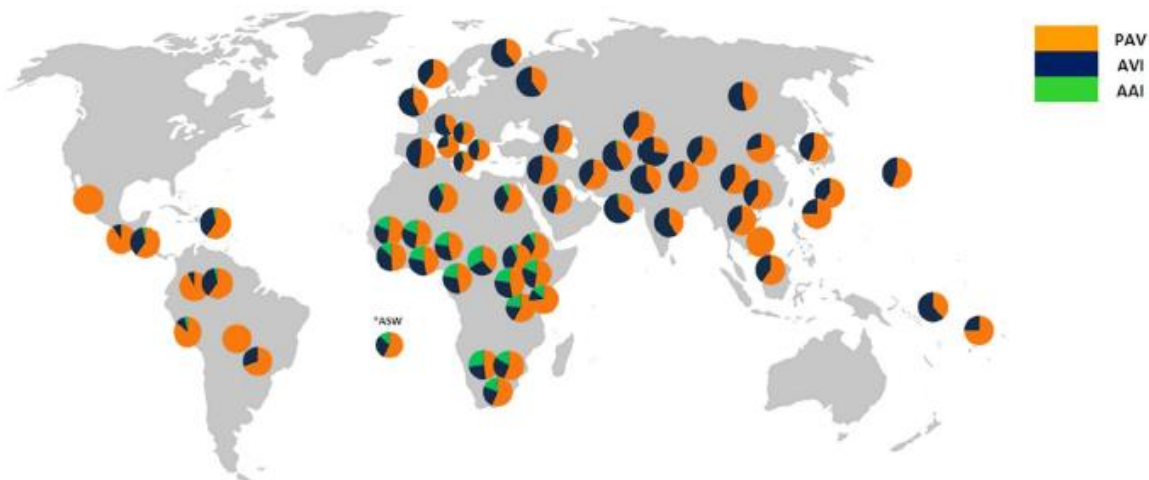


Fig. 8 Distribución mundial de los haplotipos más frecuentes del gen TAS2R38
Se puede observar que para el caso particular de México el haplotipo que predomina es el PAV. Fuente: Risso et al. 2016

Los conocimientos sobre la estructura y función de T2R38 aunado los modelados dinámicos moleculares han permitido hacer una asociación entre la estructura del receptor, su ligando (PTC) y los diferentes haplotipos. Se ha propuesto que para la variante catadora (haplotipo PAV) el sitio de unión de PTC a su receptor estaría entre los dominios TM 3, 5 y 6 de manera que la PTC establecería puentes de hidrógeno con Alanina 262 de TM6 y Tirosina 199 de TM 5, esto daría lugar a una ligera modificación de la estructura del receptor provocando su activación (Fig. 9a). En la variante no catadora (haplotipo AVI) la estructura se modifica

sustituyendo la Alanina 262 por una Valina, lo que impide la unión estable de la PTC al receptor y por lo tanto su activación (Fig. 9b).

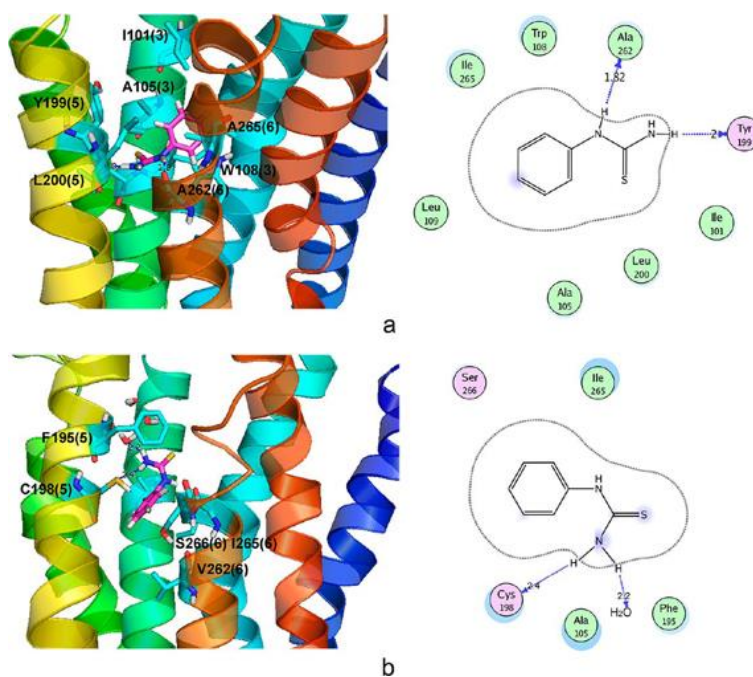


Fig. 9 Modelado de la interacción de PTC con los receptores T2R38 PAV y T2R38 AVI
Fuente: Abrol et al. 2015

3.3 Expresión en tejidos

El principal sitio de expresión de los T2R en mamíferos son las células receptoras del gusto localizadas en las papilas caliciformes, foliadas, amígdalas palatinas y epiglotis y en menor proporción en las papilas fungiformes (Bachmanov y Beauchamp, 2007), sin embargo, a partir del descubrimiento de los receptores T2R en los botones gustativos se ha demostrado que estos se expresan ampliamente en otros órganos y tejidos que no tienen relación directa con la percepción del sabor y en su mayoría no están en contacto con alimentos. En la tabla 7 se resumen los órganos y tejidos en los que se ha encontrado expresado el receptor T2R38.

Tabla 7 Expresión y función de T2R38 en órganos extraorales

ÓRGANO/SISTEMA	TEJIDO/CÉLULA	FUNCIÓN	REFERENCIAS
SNC	Cerebelo	Desconocida	Pham <i>et al.</i> 2016; Lee y Cohen, 2016 Wölfle <i>et al.</i> 2016
PIEL	Queratinocitos, mastocitos, fibroblastos, membranas mucosas de lengua y paladar	-Aumento del flujo de calcio -Estimulación de proteínas de diferenciación -Mejora de la barrera epidérmica mediante la modulación de la síntesis de lípidos	Wölfle <i>et al.</i> 2015 A; Wölfle <i>et al.</i> 2015B; Wölfle <i>et al.</i> 2016; Wölfle <i>et al.</i> 2017
PLACENTA	Epitelio amniótico, sincitiotrofoblasto y células deciduales	Posible función endócrina	Wölfle <i>et al.</i> 2016
GASTROINTESTINAL	Íleon, ciego, colon, recto, esófago, estómago, páncreas e intestino delgado (células enteroendócrinas)	Secreción de hormonas	Dotson <i>et al.</i> 2008; Hiroko <i>et al.</i> 2012 Keller <i>et al.</i> 2013; Kim <i>et al.</i> 2014 Yunli <i>et al.</i> 2015; Pham <i>et al.</i> 2016 Lee y Cohen, 2016; Wölfle <i>et al.</i> 2016
ENDÓCRINO	Tiroides, paratiroides	Posible función endócrina	Yamaki <i>et al.</i> 2017; Wölfle <i>et al.</i> 2016
RESPIRATORIO	Vías respiratorias altas: células quimiosensibles solitarias de la cavidad nasal Vías respiratorias bajas: células ciliadas y de músculo liso de los pulmones	-Broncodilatación - Activación de la respuesta inmune innata mediante la síntesis de NO y el aumento de la frecuencia del latido ciliar	Lee y Cohen, 2016; Hiroko <i>et al.</i> 2012; Ortega <i>et al.</i> 2016; Wölfle <i>et al.</i> 2016; Deshpande <i>et al.</i> 2010;
UROGENITAL	Riñones, testículos, próstata, exocervix, endocervix, pro-endometrio	Activación de la respuesta inmune innata	Lee y Cohen, 2016; Wölfle <i>et al.</i> 2016
HEMATOLÓGICO	Sangre: neutrófilos, fagocitos, monocitos, linfocitos	Activación de la respuesta inmune innata	Lu <i>et al.</i> 2017; Ortega <i>et al.</i> 2016; Maurer <i>et al.</i> 2015

3.4 Importancia de T2R38 en el metabolismo energético y su relación con diabetes

La superficie del epitelio del tracto gastrointestinal (GI) cuenta con una maquinaria molecular para la detección de los componentes de la dieta y de los metabolitos del microbioma intestinal. Muchos tipos de células enteroendócrinas (CEE) han sido identificadas y clasificadas principalmente por el tipo de transmisores endócrinos que poseen. Ejemplos de células clave son las CEE-I que contienen colecistocinina (CCK) y las CEE-L que contienen el péptido similar a glucagón tipo 1 (GLP-1) y el péptido YY (PYY). La liberación de estos péptidos al torrente sanguíneo resulta de la interacción de receptores del sabor situados en la superficie luminal de las células con nutrientes o factores ambientales del contenido intestinal. Cada una de estas células tiene una función específica y necesaria que incluyen tanto al metabolismo local como al sistémico (Fig. 10) (Pham *et al.* 2016). La importancia de estos péptidos intestinales se expone a continuación.

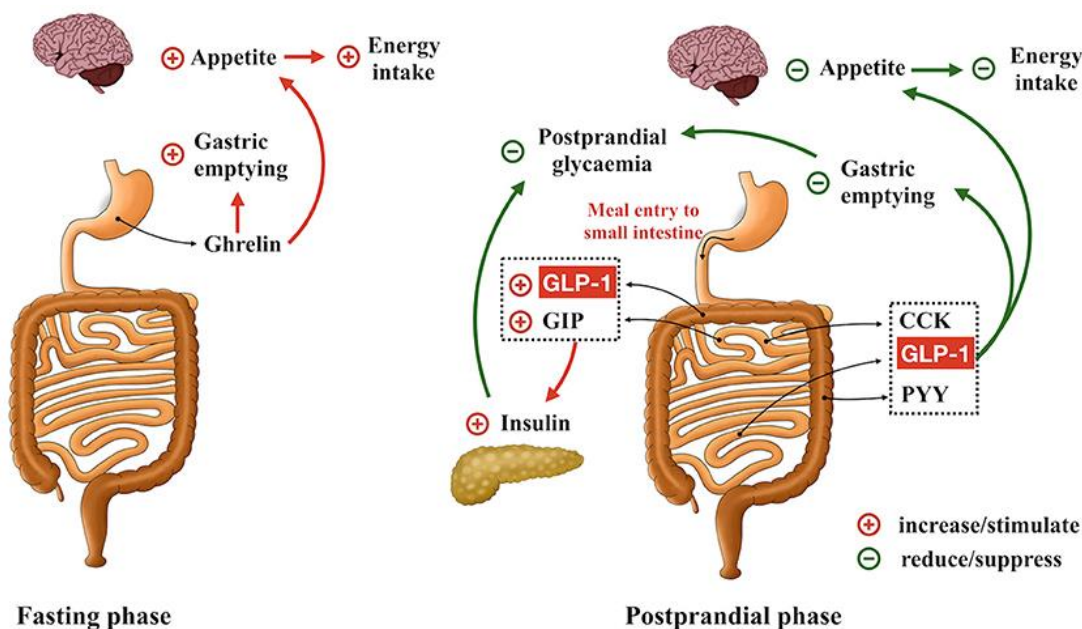


Fig. 10 Función de las hormonas gastrointestinales en la regulación del vaciado gástrico, la ingesta energética y la glucosa post-prandial.

La grelina se secreta durante el ayuno y actúa para acelerar el vaciado gástrico, promover el apetito e impulsar la ingesta de energía. GLP-1, GIP y PYY se liberan en la fase post-prandial. GLP-1 y GIP son las hormonas incretinas, que estimulan la secreción de insulina de una manera dependiente de la glucosa. GLP-1, CCK y PYY también forman retroalimentación intestinal para retrasar el vaciado gástrico y suprimir la ingesta de energía. Fuente: Xie *et al.* 2018

GLP-1 se deriva del producto de transcripción del gen proglucagon (gen *GCG*). Las formas biológicamente activas de GLP-1 son GLP-1- (7-37) y GLP-1- (7-36) NH₂. Una vez en la circulación, el GLP-1 tiene una vida media de menos de 2 minutos debido a la rápida degradación por la enzima dipeptidil peptidasa-4 (DPP4). GLP-1 es una potente hormona anti-hiperglucémica, que induce una estimulación de la secreción de insulina, dependiente de la glucosa, mientras que suprime la secreción de glucagón. Dicha acción dependiente de la glucosa es particularmente importante porque cuando la concentración de glucosa en plasma se encuentra en el rango de ayuno normal, el GLP-1 ya no estimula la insulina para causar hipoglucemia. El GLP-1 restaura la sensibilidad a la glucosa de las células β pancreáticas, utilizando un mecanismo que implica el aumento de la expresión de GLUT2 y glucocinasa. GLP-1 también inhibe la apoptosis de las células β pancreáticas, estimula la proliferación y diferenciación de las células β secretoras de insulina, e inhibe la secreción gástrica y la motilidad. Esto retrasa el vaciamiento gástrico, lo que promueve la saciedad y la pérdida de peso. Las células L también liberan dos formas circulantes de PYY; PYY1-36 y PYY3-36. La última forma se considera la predominante tanto en estado de ayuno como en alimentación, y se produce por la escisión de los residuos Tyr-Pro N-terminales de PYY1-36 por la enzima peptidasa DPP4. PYY inhibe la ingesta de alimentos a través de los receptores PYY-2 expresados en las neuronas del núcleo arqueado del hipotálamo. Otras acciones de PYY incluyen la disminución del vaciamiento gástrico y la disminución de la motilidad del intestino delgado (Abrol *et al.* 2015).

Los estudios sobre los receptores del sabor amargo y su importancia en el tracto GI han sido clave para comprender el papel que juegan los receptores del sabor en la compleja modulación de cascadas de señalización que llevan a la liberación de hormonas peptídicas. En el caso específico de T2R38, se sabe es uno de estos receptores del sabor amargo que se expresan en el tracto GI (Kokrashvili *et al.* 2009) y que, al ser activado por compuestos amargos como el nasturio o el denatonio, liberan tanto el PYY (Schiess *et al.* 2017) como GLP-1 (Kim *et al.* 2014)

Como se mencionó en el capítulo 2, son varios los mecanismos por los cuales T2R38 puede actuar, existe un cuarto tipo al cual Lu *et al.* 2017 han denominado *mecanismo endócrino*

(Fig. 11). Este mecanismo ocurre en células y tejidos en los que la activación de los T2R causa la liberación de hormonas que circulan a través del torrente sanguíneo (Lu *et al.* 2017).

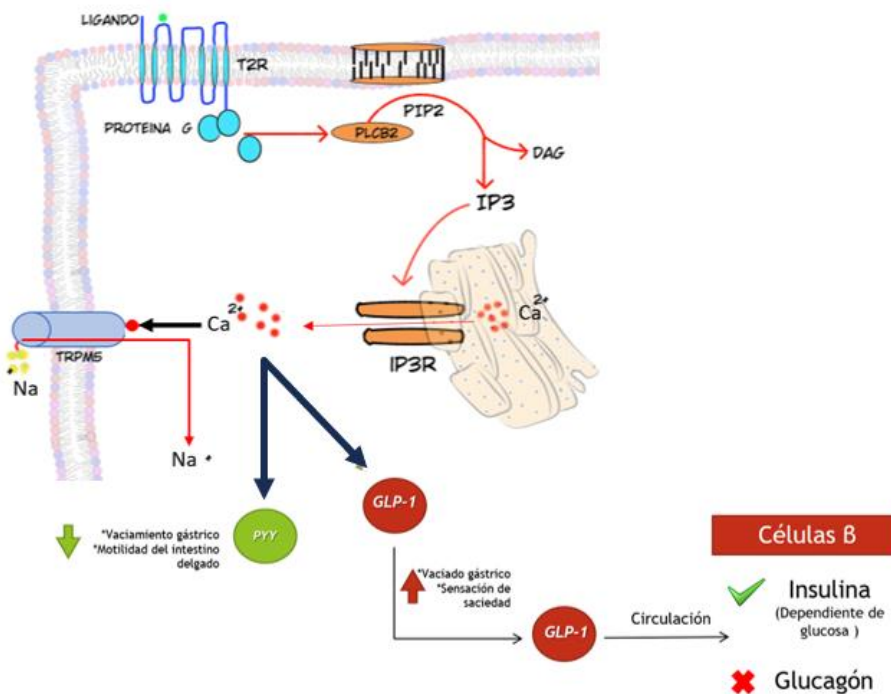


Fig. 11 Modelo endócrino de la cascada de señalización de los T2R en células L del intestino
 En este modelo las CEE secretan los péptidos PYY y GLP-1 secundaria a la activación del T2R, los cuales difunden a través de los fluidos extracelulares y entran a circulación. En el caso del péptido PYY este participa en la disminución del vaciamiento gástrico y motilidad del intestino delgado lo que contribuye a aumentar la sensación de saciedad, razón por las cuales se cree que receptores como T2R38 pueden ser un blanco terapéutico contra obesidad y sobre peso. Por otra parte, GLP-1 se encarga de inducir la liberación de insulina de las células β pancreáticas y con ello contribuye a la regulación de la homeostasis de la glucosa en plasma. Hernández Calderón, María Llasbeth. Elaboración propia

Un número creciente de estudios preclínicos y clínicos han evaluado los efectos de los agonistas de receptores del sabor amargo en la secreción de péptidos intestinales, sin embargo, la evaluación del impacto de estos receptores en diabetes tipo 2 no se ha investigado a fondo y la información sobre la secreción de GLP en respuesta a la estimulación de estos receptores es limitada.

Los modelos preclínicos indican que la estimulación de los T2R intestinales tiene el potencial de mejorar el control de la glucosa en sangre. En ratones de tipo silvestre, la administración intragástrica de benzoato de denatonio (DB), PTC o una mezcla de compuestos amargos redujo el vaciamiento gástrico significativamente. Mientras que la administración oral de DB (1 mg/kg) o 300 mg/kg de extracto de raíz de *Gentiana scabra* (planta herbácea perenne con

rizoma herbáceo, pequeño tamaño, con varias tallos y numerosas raíces. Las hojas son ovado-lanceoladas con ápice agudo y con tres venas principales. Las flores son de color azul oscuro, tubulares y se presentan en la parte superior del tallo en las hojas superiores. Esta planta contiene varios compuestos amargos como el ácido logánico, gentiopicrina y rindósido) en ratones db/db se asoció con un mayor nivel sérico de GLP-1 y menor de glucosa en sangre.

En ratones alimentados con una dieta alta en grasas, la administración oral de extracto de calabaza amarga antes de una carga de glucosa oral o intraperitoneal también dio como resultado niveles más altos de GLP-1 e insulina y respuestas de glucosa en sangre más bajas. La magnitud de la reducción de la glucemia se atenuó sustancialmente por la administración concurrente del antagonista del receptor de GLP-1, exendina, lo que pone en evidencia la importancia de GLP-1 en la reducción de la glucosa inducida por sustancias amargas (Xie *et al.* 2018)

Existe evidencia de que los polimorfismos de los genes que codifican a receptores de sabor amargo pueden estar asociados con cambios en la ingesta de alimentos y la desregulación de la glucosa en sangre. Por ejemplo, las mujeres con diabetes gestacional exhibieron una menor frecuencia del polimorfismo rs3741845 del gen *T2R9* y consumieron más carne, productos lácteos y bebidas dulces en comparación con las mujeres embarazadas sin diabetes gestacional. De manera similar, *T2R9* se ha asociado con mayor respuesta de glucosa en sangre e insulina a una prueba de tolerancia oral a la glucosa en individuos Amish con y sin diabetes tipo 2. En individuos alemanes sin diabetes tipo 2, también se reporta que las variaciones en el gen *TAS2R38* (rs713598, rs1726866 y rs10246939) tienen asociaciones significativas con la composición corporal (IMC, porcentaje de grasa corporal y relación cintura-cadera) en mujeres y la respuesta glucémica a la glucosa oral en hombres (Keller *et al.* 2013).

Con base a la información disponible se piensa que este conocimiento llevará a encontrar nuevas vías terapéuticas para el tratamiento de diabetes tipo 2 y se vislumbra al receptor T2R38 como un novedoso blanco terapéutico no sólo para diabetes sino para otros desórdenes metabólicos.

II. JUSTIFICACIÓN

La diabetes tipo 2 es un problema de salud pública en México, actualmente, representa la segunda causa de mortalidad a nivel nacional causando 105, 574 defunciones por año y representa un gasto de 3,430 millones de dólares al año en el tratamiento y atención a sus complicaciones (FMD, 2017). Cabe mencionar que esta enfermedad puede diagnosticarse sólo cuando ya tiene varios años de evolución y han aparecido complicaciones por lo que actualmente se trabaja en la búsqueda de marcadores moleculares que permitan detectar alteraciones antes de que se produzcan cambios en la morfología celular y de que esos cambios sean clínicamente visibles.

Diversos autores han propuesto la hipótesis de que la función de los receptores del sabor expresados en las células enteroendócrinas (CEE) del intestino es la modulación de hormonas metabólicas que tienen impacto en la homeostasis de la glucosa. Se ha demostrado que una vez que se activa T2R38 en las células L del intestino causa la liberación del péptido similar a glucagón tipo 1 (GLP-1) (Lu *et al.* 2017) y del del péptido YY (PYY) (Pham *et al.* 2016) Se sabe que GLP-1 restaura la sensibilidad a la glucosa de las células β pancreáticas, utilizando un mecanismo que implica el aumento de la expresión de GLUT2 y glucocinasa. GLP-1 también inhibe la apoptosis de las células β pancreáticas, estimula la proliferación y diferenciación de las células β secretoras de insulina, e inhibe la secreción gástrica y la motilidad, es por esta razón que de existir una asociación de los haplotipos o polimorfismos del gen *TAS2R38* con DT2 se podrían usar como marcadores de predisposición a la enfermedad que al estar también relacionados con las preferencias alimentarias permitirían diseñar esquemas nutrimentales que prevengan el desarrollo de DT2 o permitan perfilar al receptor T2R38 como blanco terapéutico en el diseño de nuevos fármacos hipoglucemiantes.

III. OBJETIVOS

a. OBJETIVO GENERAL

Determinar si existe asociación entre los haplotipos PAV y AVI del gen *TAS2R38* con diabetes tipo 2 en población mexicana.

b. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar si existe asociación entre los polimorfismos rs713598, rs1726866 y rs10246939 del gen *TAS2R38* con diabetes tipo 2 en población mexicana.
- ✓ Determinar las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos rs713598, rs1726866 y rs10246939 del gen *TAS2R38* en población mexicana.
- ✓ Realizar la caracterización Bioquímica de todos los individuos de estudio por determinación de glucosa sérica, hemoglobina glicosilada, colesterol y triglicéridos.

IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La presencia de los haplotipos PAV y AVI del gen *TAS2R38* está asociada a diabetes tipo 2 en población mexicana?

V. HIPÓTESIS

La presencia del haplotipo AVI del gen *TAS2R38* se asocia a diabetes tipo 2 en población mexicana.

VI. DISEÑO EXPERIMENTAL

a. Consideraciones éticas

El presente proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM (Anexo 1) Todos los participantes que aceptaron ingresar al estudio firmaron el correspondiente consentimiento informado (Anexo 2) el cual se estructuró acorde con las disposiciones de la Secretaria de Salud en materia de investigación en humanos. Además, se realizó la historia clínica de cada paciente (Anexo 3).

b. Población de estudio

El presente proyecto se trata de un estudio de casos y controles, transversal y retrospectivo. Todos los individuos que conforman el grupo control, así como el grupo de pacientes diabéticos son individuos que acudieron por convocatoria al laboratorio de Citogenética de la FES-Cuautitlán, Campo 1. Los criterios de inclusión y exclusión se muestran en las tablas 8 y 9.

Tabla 8 Criterios de inclusión y exclusión para el grupo control

<i>Criterios de inclusión</i>	<i>Criterios de exclusión</i>
<ul style="list-style-type: none">• Individuos femeninos y masculinos• Individuos mayores de 30 años• Sin diagnóstico clínico de diabetes• Mujeres, no haber padecido diabetes gestacional• Valores de glucosa sérica menores de 125 mg/dL en ayuno• Que no se encuentren en tratamiento farmacológico de ningún tipo• Firma de consentimiento informado	<ul style="list-style-type: none">• Individuos menores de 30 años• Que tengan diagnóstico clínico de diabetes.• Que se encuentren en algún tipo de tratamiento farmacológico• Valores de glucosa sérica mayores de 125 mg/dL en ayuno• No haber firmado consentimiento informado

Tabla 9 Criterios de inclusión y exclusión para el grupo de pacientes con DT2

<i>Criterios de inclusión</i>	<i>Criterios de exclusión</i>
<ul style="list-style-type: none">• Individuos femeninos y masculinos• Mayores de 30 años• Diagnóstico clínico de diabetes tipo 2, controlados (glucosa<140 mg/dL) y no controlados (glucosa>140 mg/dL)• Sin límite en el tiempo de evolución de la enfermedad• Con o sin tratamiento farmacológico (hiperglucemiantes clásicos)• Firma de consentimiento informado	<ul style="list-style-type: none">• Individuos menores de 30 años• Que no tengan diagnóstico clínico de diabetes• No haber firmado consentimiento informado

c. Cálculo del tamaño de la muestra

Calcular la n muestral con el programa Quanto v1.2.4 para un estudio de casos y controles considerando:

- ✓ Frecuencia de los alelos de riesgo: rs713598 G=0.67, rs1726866 T= 0.31 y rs10246939 A=0.32 (HapMap, 2018)
- ✓ Prevalencia de DT2 en población mexicana: 9.4% (ENSANUT, 2016)
- ✓ Poder estadístico = 80%
- ✓ Riesgo genético= 1.7 (Ramos *et al.* 2015)

VII. METODOLOGÍA

a. Determinaciones bioquímicas a partir de sangre capilar

- i. Determinar glucosa, triacilglicéridos y colesterol en ayuno de 8 horas en sangre capilar mediante la técnica de fotometría de reflectancia con el equipo Accutrende Plus (Roche) tal como lo indica el inserto y con los correspondientes controles de calidad.

b. Extracción de DNA a partir de muestras de saliva

Técnica de Covarrubias modificado de Buffone y Darlington; Millar y Polesky; Maniatis y Fritsch (Soriano, 2019).

- i. Realizar limpieza bucal previa a la recolección de la muestra de saliva utilizando exclusivamente agua y realizar enjuagues por lo menos 3 veces.
- ii. Recolectar en un tubo cónico, 10 mL de saliva, realizando movimientos circulares de la boca con la finalidad de estimular la salivación.
- iii. Centrifugar la muestra a 5000 rpm durante 5 minutos y decantar cuidadosamente el sobrenadante.
- iv. Agregar al botón 1 ml de amortiguador TTS (Tritón-Tris-Sacarosa). Re suspender el botón y pasar a un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Agitar hasta homogenizar.
- v. Centrifugar a 14000 rpm durante 6 minutos a 4°C. Decantar el sobrenadante y añadir 1 ml de amortiguador TTS, re suspender.
- vi. Centrifugar a 14000 rpm durante 6 minutos a 4°C (repetir de dos a tres veces el paso anterior).
- vii. Al botón limpio, agregar 570 µL de NaCl 5mM. Agitar durante 2 minutos y colocar 30 µL de SDS al 10%. Agitar durante 5 minutos y agregar 200 µL de NaCl saturado. Agitar durante 10 minutos.
- viii. Centrifugar a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Decantar el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 ml y agregar 600 µL de cloroformo/alcohol isoamílico (49:1),

mezclar suavemente por inversión durante 10 minutos, centrifugar a 14000 rpm a 4°C durante 15 minutos.

- ix. Tomar la fase superior y pasarla a un tubo eppendorf de 1.5 ml. Agregar el doble del volumen de etanol absoluto frío para precipitar el DNA con agitación suave.
- x. Centrifugar a 11000 rpm por 10 minutos a 4°C y decantar sin perder el botón.
- xi. Agregar 500 μ L de etanol al 70% frío, resuspender el botón y centrifugar a 11000 rpm a 4°C durante 10 minutos. Decantar (Repetir este paso una vez más).
- xii. Secar el botón de DNA y resuspender en un máximo de 200 μ L de agua estéril a 37°C, incubar a 37°C por una hora.

c. Cuantificación del DNA

- i. Medir la concentración y pureza de las muestras de DNA por espectrofotometría empleando el equipo Epoch (BioTek) y el programa GEN 5. Utilizar como blanco agua inyectable.
- ii. Diluir con agua inyectable cada muestra para obtener una concentración final de 20 ng/ μ L en un volumen final de 50 μ L.

d. Evaluación de la integridad del DNA

- i. Evaluar las muestras de DNA mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. Correr 2 μ L de muestra con 1 μ L de buffer de carga y 1 μ L del colorante GELRED a 120V durante 20 minutos en buffer de TBE (Tris-Ácido bórico-EDTA)
- ii. Analizar los geles de agarosa en el fotodocumentador SmartView Pro UVCI-1000 empleando el software analizador de imagen de Major Science.

e. Genotipificación

Realizar el análisis de genotipos por discriminación alélica con sondas TaqMan, empleando las sondas que se muestran en la tabla 10. La figura 12 muestra un ejemplo de la dispersión de genotipos que se puede observar en un análisis de Scatter Plot. Para el caso del equipo Stratagene Mx3000P qPCR System, Agilent Technologies utilizar el canal HEX para las lecturas del fluorocromo VIC, ya que este equipo no lo presenta y la longitud de onda es muy similar entre ellos.

Tabla 10 Sondas TaqMan para los polimorfismos rs713598, rs1726866 y rs10246939 del gen TAS2R38
 Fuente: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home.html>

SNP	SECUENCIA	VIC	FAM
rs713598	AGCACACAATCACTGTTGCTCAGTG[C/G]CTGCCTCTTCACTACATCCCAAAAA	C	G
rs1726866	CAGTAGGGGCACAGAGATGAAGGCA[A/G]CACAGGATGATATCACAAAGAAGCA	A	G
rs10246939	AACTTGGCATTGCCTGAGATCAGGA[CT]GGCTGCATGCCAGAGGGACAAGCT	C	T

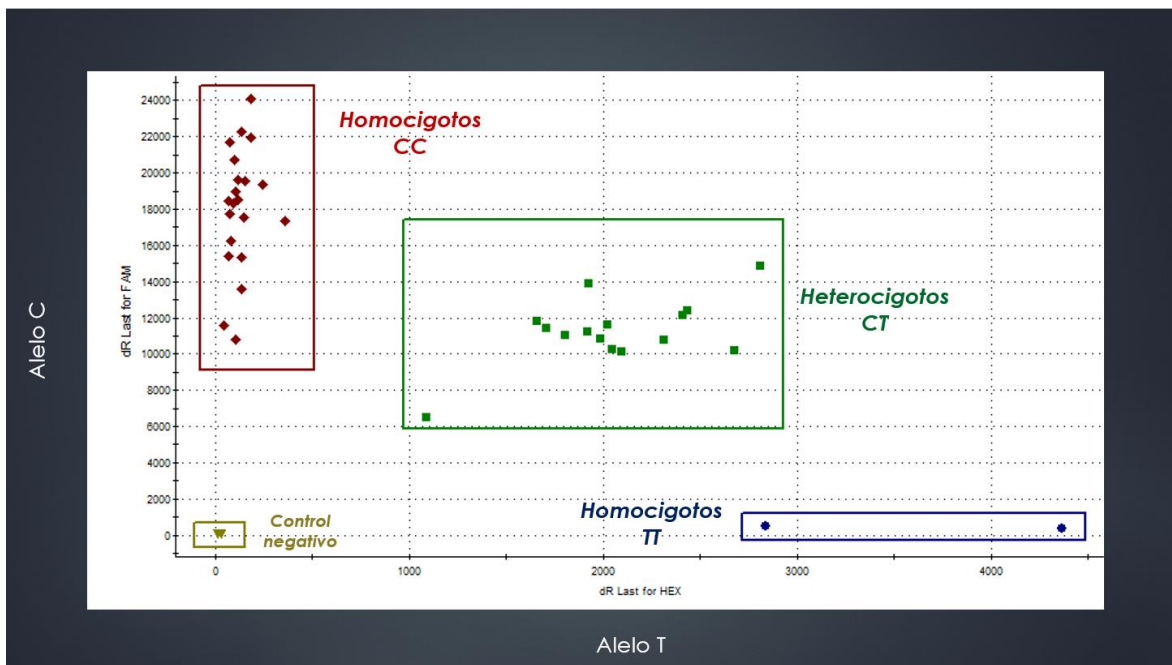


Fig. 12 Discriminación alélica con sondas TaqMan
 Se muestra el gráfico que arroja el análisis de Scatter Plot para el SNP rs1726866 del gen TAS2R38 en el que se agrupa la población en clusters según el genotipo que presentan.

Para las reacciones de qPCR seguir el siguiente protocolo

- i. Preparar cada reacción de qPCR para la genotipificación con sondas TaqMan como se indica en la tabla 11:

Tabla 11 Componentes de la reacción para PCR

Reactivo	Cantidad (uL)
Master Mix 2X	5
Sonda TaqMan 20X	0.5
DNA (20 ng/uL)	6

- ii. Colocar la placa de reacción en el termociclador (Stratagene Mx3000P qPCR System, Agilent Technologies) utilizando el protocolo para discriminación alélica y procesar bajo las condiciones mostradas en la tabla 12:

Tabla 12 Condiciones de reacción para la PCR en tiempo real

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	# de ciclos
Activación de sondas	95	10 minutos	1
Desnaturalización	90	15 segundos	40
Hibridación /extensión	60	1 minuto	

- iii. Analizar los resultados empleando el TaqMan Genotyper Software.

f. Equilibrio de Hardy-Weinberg

- i. Verificar en la página ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl que las poblaciones en estudio cumplen con el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW).

g. Análisis estadístico

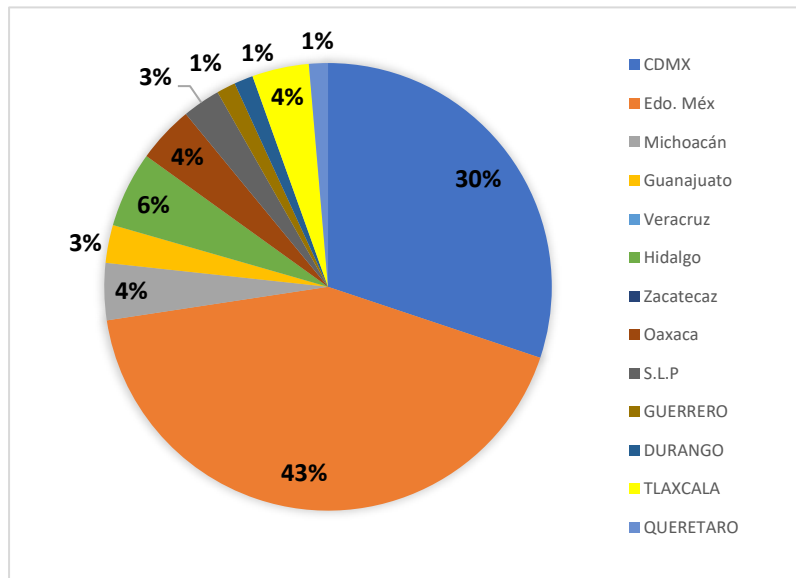
Realizar la estadística descriptiva para las variables numéricas y aplicar la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Para las variables que se ajusten a una distribución normal analizar la comparación entre variables mediante la prueba t de Student mientras que para las variables que no lo hagan analizarlas mediante U- de Mann-Whitney. En cuanto a las variables categóricas analizarlas con la prueba de χ^2 . Realizar el análisis del desequilibrio

de ligamiento con el programa Haploview 4.2 (Barrett *et al.* 2005). El análisis de asociación se realizó en función del cálculo de los OR y el IC 95% Todo el análisis estadístico se realizó con el programa estadístico SPSS (IBM, 2017).

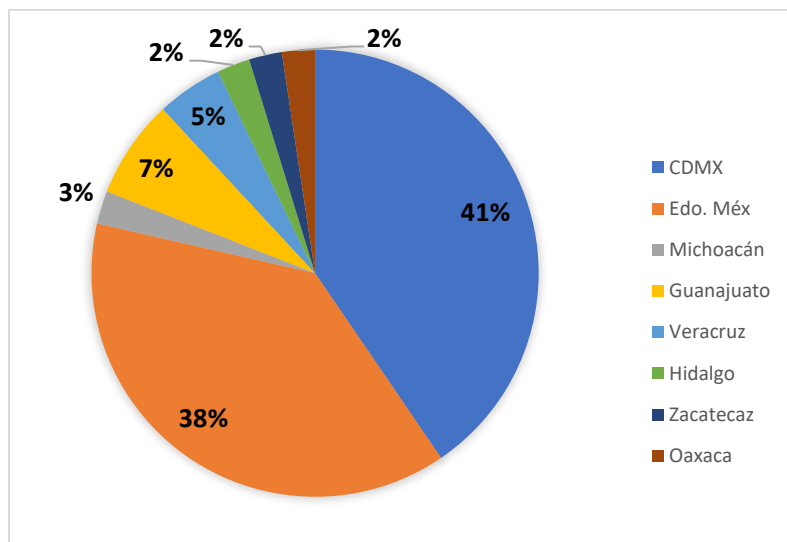
VIII. Resultados

Características demográficas, antropométricas y bioquímicas de las poblaciones de estudio

En el siguiente apartado se describen las características demográficas, antropométricas y bioquímicas de los grupos de estudio cuyos datos fueron recabados a través de la historia clínica (Anexo 3) Las gráficas 1 y 2 muestran la procedencia de los grupos de estudio.



Gráfica 1 Procedencia de la población control



Gráfica 2 Procedencia de la población con DT2

En la tabla 13 se muestran las características antropométricas y bioquímicas de los grupos de estudio. Para las variables categóricas se reporta el porcentaje de cada caso mientras que para las variables numéricas se reporta la media y desviación estándar para aquellas que presentan una distribución normal y la mediana y rango para las que no presentan una distribución normal.

Tabla 13 Características antropométrica y bioquímicas de las poblaciones de estudio

Variable	Grupo control	Grupo de pacientes con DT2	p
n	115	83	NA
Sexo	n (%)	n (%)	0.010*
Femenino	68 (59)	64 (77)	
Masculino	47 (41)	19 (23)	
Edad	48 (30-73)	55 (30-89)	<0.001*
IMC	28.10 (21.77-44)	28.54 (22-48.64)	0.275
Glucosa (mg/dl)	90 (41-114)	120 (73-349)	<0.001*
TAG (mg/dl)	185 (75-486)	201 (57-584)	0.752
Colesterol (mg/dl)	201.71 ± 29.65	210.02 ± 40.79	0.143
Con AHFD (%)	60.25	85.7	0.070

*Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

NA, no aplica; IMC, índice de masa corporal; TAG, triacilglicéridos; AHFD, antecedentes heredo familiares de diabetes tipo 2.

▪ **Análisis de las muestras de DNA**

Se recolectaron un total de 127 muestras de saliva de individuos no diabéticos y 88 muestras de saliva de individuos diagnosticados con DT2 a las cuales se les extrajo y cuantificó el DNA. Debido a la variación en la concentración de DNA se realizó un stock de 20 ng/μL de cada muestra (cantidad recomendada por el fabricante para realizar genotipificación por PCR tiempo real con sondas TaqMan). Dado que el termociclador tiempo real empleado para este experimento tiene la capacidad de detectar una concentración mínima de 10 ng/μL las muestras que se encontraban por debajo de esta concentración fueron descartadas, por lo que la n final para el grupo control fue de 115 y para el grupo de pacientes con DT2 de 83.

Las muestras analizadas se encuentran en condiciones de pureza de óptimas a aceptables. Se evaluó la integridad de las muestras mediante electroforesis en geles de agarosa, en la Fig. 13 se muestra un ejemplo del corrimiento electroforético de las muestras.

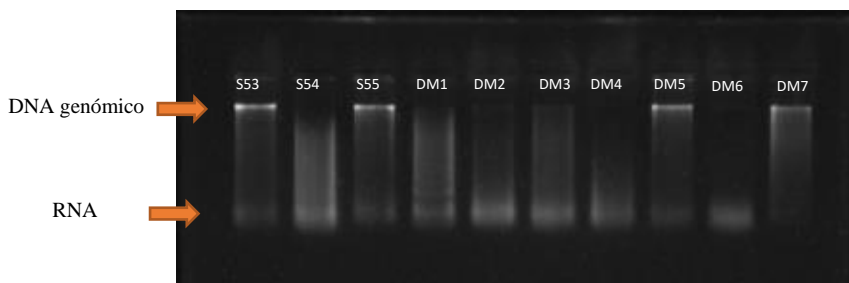


Fig. 13 Integridad de muestras de DNA genómico extraído de muestras de saliva de individuos no diabéticos (S53-S55) y de individuos diabéticos (DM1-DM7)

En la parte superior del pozo se indica el ID de la muestra. Corrimiento en gel de agarosa al 1%, tinción con Gel Red, 100 V, 30 minutos, 40 ng/uL de DNA. Se observa diferentes grados de degradación del DNA en todas las muestras, así como variable contaminación.

A continuación, se muestran los resultados derivados de la genotipificación de los SNPs rs713598, rs1726866 y rs10246939 del gen *TAS2R38*.

▪ **Análisis de asociación de los polimorfismos rs713598, rs1726866 y rs10246939 del gen *TAS2R38* con diabetes tipo 2 en población mexicana**

En la tabla 14 se muestra la evaluación del equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) para cada uno de los polimorfismos evaluados tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes diabéticos. Los tres SNPs evaluados presentan $p > 0.05$ por lo que cumplen con el EHW.

Tabla 14 Equilibrio de Hardy-Weinberg para la población control

SNP	Cambio de a.a.	Población	n	Genotipos n (%)				FAM	EHW
				CC	CG	GG	G		
rs713598	A49P	Control	115	67 (58.3)	45 (39.1)	3 (2.6)	0.222	0.187	
		DT2	83	52 (62.7)	30 (36.1)	1 (1.2)	0.193	0.283	
rs1726866	V262A	Control	115	53 (46.1)	55 (47.8)	7 (6.1)	0.300	0.183	
		DT2	83	43 (51.8)	36 (43.4)	4 (4.8)	0.265	0.404	
rs10246939	I296V	Control	115	42 (36.5)	61 (53.0)	12 (10.4)	0.370	0.165	
		DT2	83	22 (26.5)	49 (59.0)	12 (14.5)	0.440	0.117	

SNP, Polimorfismo de Nucleótido Único; a.ác, aminoácido; n, número de individuos; EHW, equilibrio de Hardy-Weinberg; A, alanina; P, prolina; V, valina; I, isoleucina. DT2, diabetes tipo 2. FAM, frecuencia alélica menor.

Una vez que se comprobó que los SNPs cumplían con el EHW se procedió a realizar el análisis de asociación genotípico planteando tres diferentes modelos genéticos: dominante, recesivo y aditivo. Se muestran las frecuencias genotípicas, así como la razón de momios (OR) con un intervalo de confianza del 95%, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en estudio (Tabla 15).

Tabla 15 Modelos genéticos de asociación de los polimorfismos en estudio con diabetes tipo 2 en población mexicana

SNP	n	MODELO					
		DOMINANTE		RECESIVO		ADITIVO	
		OR (95% IC)	<i>p</i>	OR (95% IC)	<i>p</i>	OR (95% IC)	<i>p</i>
rs713598							
Control	115						
DT2	83	0.832 (0.466-1.485)	0.559	0.455 (0.047-4.456)	0.641	0.500 (0.050-5.036)	1.00
rs1726866							
Control	115	0.795 (0.452-1.400)	0.472	0.781 (0.221-2.760)	0.479	0.873 (0.238-3.198)	1.00
DT2	83						
rs10246939							
Control	115	0.689 (0.293-1.621)	0.509	0.589 (0.316-1.098)	0.122	0.610 (0.320-1.161)	0.150
DT2	83						

SNP, Polimorfismo de Nucleótido Único; OR, Odds ratio; IC, intervalo de confianza; n, número de individuos; DT2, individuos con diabetes tipo 2.

Posteriormente se realizó el análisis del desequilibrio de ligamiento empleando el programa Haploview 4.2. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 16 y la Fig. 14.

Tabla 16 Desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos del gen TAS2R38

SNP1	SNP2	D'	r ²
rs10246939	rs713598	0.859	0.292
rs1726866	rs713598	0.806	0.432
rs10246939	rs1726866	0.782	0.364

SNP, Polimorfismo de Nucleótido Único. D', desequilibrio de ligamiento; r², coeficiente de correlación

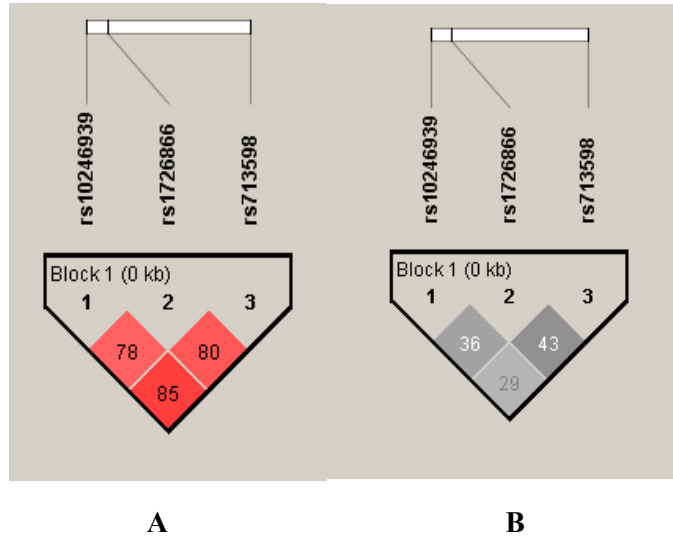
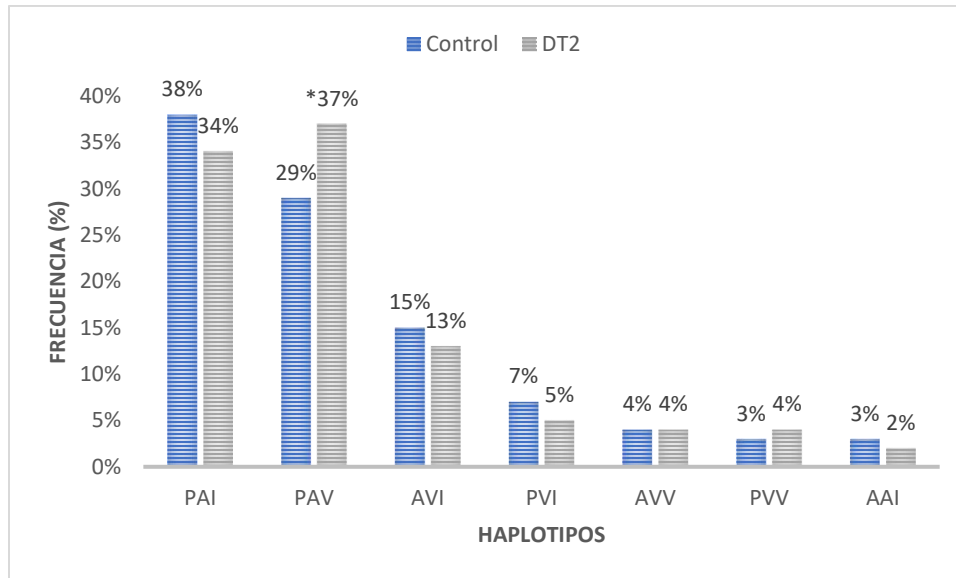


Fig. 14 LD Plot para los SNPs rs713598, rs1726866 y rs10246939 del gen TAS2R38 generado en Haploview 4.2.
A) En cada rombo se muestra el valor de D' X100, mientras mayor es la intensidad del color el valor de D' es más cercano a 1 y por lo tanto mayor el desequilibrio de ligamiento. B) en cada rombo se muestra el valor de r^2 X100, conforme aumenta la intensidad de color es mayor el valor de r^2 de manera que el color blanco indica que no hay correlación entre los SNPs y el color negro el máximo valor de correlación. Las distancias de los SNPs se tomaron de la base de datos de NCBI.

En la Tabla 17 y gráfica 3 se muestran los principales haplotipos del gen *TAS2R38* presentes en la población de estudio y su asociación con diabetes tipo 2 en población mexicana. La prueba exacta de Fisher muestra una $p < 0.05$ para el haplotipo PAV que es el más frecuente en la población diabética.

Tabla 17 Frecuencia de los haplotipos del gen TAS2R38 encontrados en casos y controles de la población mexicana

HAPLOTIPO	FRECUENCIA	
	Control	DT2
PAI	0.38	0.34
PAV	0.29	0.37
AVI	0.15	0.13
PVI	0.07	0.05
AVV	0.04	0.04
PVV	0.03	0.04
AAI	0.03	0.02



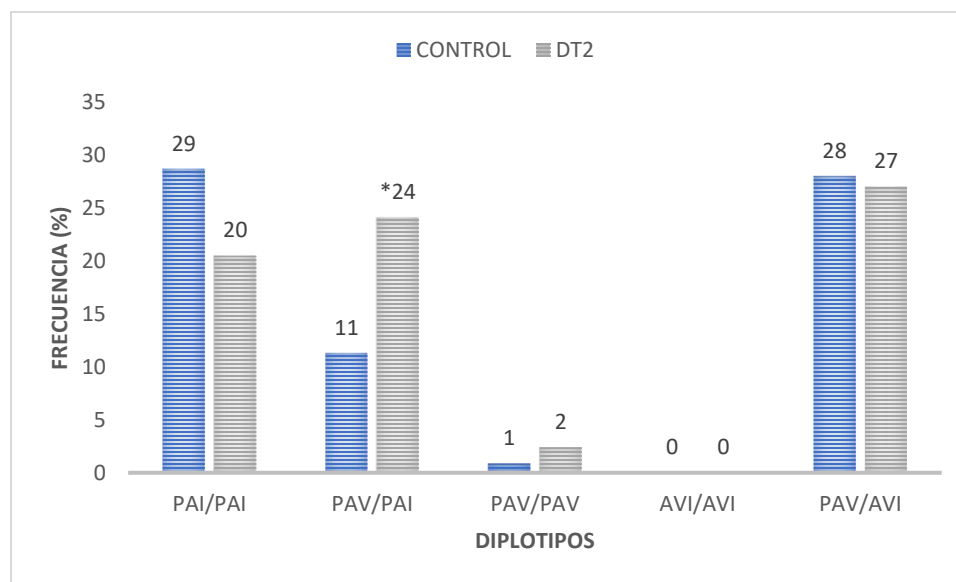
Gráfica 3 Principales haplotipos del gen *TAS2R38* encontrados en la muestra analizada de casos y controles de la población mexicana

En la tabla 18 se muestran los principales diplotipos encontrados, así como su frecuencia en la población evaluada. Se encontraron un total de 16 diplotipos diferentes de los cuales se consideraron los más frecuentes para el análisis de asociación.

Tabla 18 Frecuencia de los diplotipos del gen *TAS2R38* encontrados en población mexicana

DIPLOTIPO	FRECUENCIA	
	Población control n (%)	Población DT2 n (%)
AVV/AVV	3 (3)	1 (1)
PAI/AAI	1 (1)	2 (2)
PAI/PAI	33 (29)	17 (20)
PAI/AVI	2 (2)	0 (0)
PAI/PVI	6 (5)	1 (1)
PAV/AAI	5 (4)	2 (2)
PAV/AVI	32 (28)	22 (27)
PAV/AVV	3 (3)	2 (2)
PAV/PAI	13 (11)	20 (24)
PAV/PAV	1 (1)	2 (2)
PAV/PVI	9 (8)	6 (7)
PAV/PVV	2 (2)	5 (6)
PVI/PVI	0 (0)	1 (1)
PVV/AVV	1 (1)	2 (2)
PVV/PVI	1 (1)	0 (0)
PVV/PVV	2 (2)	0 (0)

En la gráfica 4 y la tabla 19 se muestra la frecuencia de los diplotipos más comunes encontrados en la población de estudio y el análisis de asociación de los diplotipos más frecuentes del gen *TAS2R38* en pacientes con diabetes tipo 2 en población mexicana, respectivamente. El análisis de asociación se realizó por regresión logística multinomial.



Gráfica 4 Frecuencia de los diplotipos del gen *TAS2R38* encontrados en población mexicana

Tabla 19 Asociación de los diplotipos del gen *TAS2R38* con diabetes tipo 2 en población mexicana

DIPLÓTIPO	FRECUENCIA n (%)	OR	IC 95%	p
PAI/PAI	Control 33 (29)	0.550	0.269-1.125	0.112
	DT2 17 (20)			
PAV/PAI	Control 13 (11)	2.514	1.131-5.590	0.027*
	DT2 20 (24)			
PAV/PAV	Control 1 (1)	2.678	0.237-30.238	0.578
	DT2 2 (2)			
PAV/AVI	Control 32 (28)	0.803	0.404-1.596	0.602
	DT2 22 (27)			

* Estadísticamente significativo, prueba exacta de Fisher muestra una $p < 0.05$

Dado que no se alcanzó la n poblacional se calculó el poder estadístico alcanzado (+) y con base a los resultados de las frecuencias alélicas encontradas en el presente estudio se recalculó la n poblacional que se requiere para alcanzar un poder estadístico de 0.8. Dicho análisis se llevó a cabo empleando el programa Quanto v1.2.4. (Tabla 20)

Tabla 20 Cálculo del poder estadístico y recálculo de la n poblacional

SNP	MODELO DE HERENCIA	RIESGO POBLACIONAL	FRECUENCIA ALÉLICA	OR	(+) PODER ESTADÍSTICO	TAMAÑO DE LA MUESTRA PARA PE=0.8
RS713598	Dominante			0.832	0.08	2095
	Recesivo	0.094	0.193	0.455	0.12	972
	Aditivo			0.500	0.61	129
RS1726866	Dominante			0.795	0.11	1214
	Recesivo	0.094	0.265	0.781	0.06	4302
	Aditivo			0.873	0.08	2246
RS10246939	Dominante			0.689	0.20	501
	Recesivo	0.094	0.440	0.589	0.23	416
	Aditivo			0.610	0.58	137

SNP, Polimorfismo de Nucleótido Único; OR, Odds ratio; PE, poder estadístico.

IX. Discusión

A partir del descubrimiento de las variantes alélicas del gen *TAS2R38* que explican hasta en un 80% la variabilidad de los humanos al sabor amargo (Kim *et al.* 2003) se ha estudiado su asociación con diversas enfermedades, tal es el caso de rinosinusitis crónica (Workman *et al.* 2018), cáncer colorrectal (Carrai *et al.* 2011), cáncer gástrico (Choi *et al.* 2016), caries (Wendell *et al.* 2010), alcoholismo (Ramos *et al.* 2015), obesidad (Ortega *et al.* 2016) entre otras.

El estudio de los receptores del sabor amargo y su participación en la modulación del metabolismo energético surge a partir del descubrimiento de su expresión en el epitelio del tracto GI, así como el descubrimiento de que sustancia de sabor amargo como la berberina (sal cuaternaria de amonio presente generalmente en las raíces de las plantas de la familia *Berberis*) (Yunli *et al.* 2015) y compuestos sintéticos de sabor amargo como ofloxacina (Dotson *et al.* 2008) disminuían los niveles de glucosa en sangre vía GLP-1 posterior a la activación de los receptores T2R38 y T2R9 respectivamente.

Dado que la diabetes tipo 2 representa un grave problema de salud en nuestro país el presente estudio tuvo como objetivo principal determinar si existe una asociación de los haplotipos PAV y AVI del gen *TAS2R38* con diabetes tipo 2. Para ello se evaluó una población de 198 individuos, 115 controles y 83 pacientes diabéticos. El grupo control (gráfica 1) quedó constituido por individuos que son originarios de 11 entidades federativas de la República Mexicana, procediendo en su mayoría del Estado de México (43%), mientras que el grupo de pacientes con DT2 (gráfica 2) quedó constituida por individuos que son originarios de 8 entidades federativas, siendo mayoritarios los originarios de la CDMX (41%).

Se analizaron las características antropométricas de ambos grupos encontrando diferencias estadísticamente significativas entre el sexo ($p=0.010$), edad ($p<0.001$) y valores de glucosa ($p<0.001$), estos últimos eran de esperarse dada la naturaleza de los grupos de estudio (Tabla 12). Estas diferencias estadísticas muestran que los grupos de estudio son heterogéneos y dichas variables podrían fungir como variables confusoras razón por la cual se consideraron

como covariables en el análisis de asociación por regresión logística multinomial. Un primer análisis sobre las covariables mostró que las mujeres poseen mayor riesgo de padecer diabetes ($p < 0.05$) y que el riesgo aumenta después de los 45 años ($p < 0.01$) (Datos no mostrados). Se esperaba que los AHFD mostraran una diferencia estadísticamente significativa ya que se sabe que es un factor importante para el desarrollo de DT2, sin embargo, esto no pudo comprobarse en este estudio debido a que de ciertos pacientes no se contaba con esta información.

Antes de realizar el análisis de asociación se determinó si los polimorfismos en estudio cumplían con el EHW tanto en el grupo control como en el de pacientes con DT2. Los resultados en la tabla 14 muestran que ambos grupos cumplen con el EHW presentando $p > 0.05$ en todos los casos. La tabla 21 muestra una comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas reportadas para población mexicana por el HapMap; por Ramos *et al.* 2015 y los obtenidos en el presente proyecto para la población control. Se puede apreciar que aun cuando se analiza población mexicana tanto las frecuencias alélicas como las genotípicas difieren entre referencias. Para el caso del polimorfismo rs713598 los resultados experimentales no concuerdan con ninguna de las dos referencias, ya que en este caso G es el alelo menor; en el caso del polimorfismo rs1726866 las frecuencias son similares a las publicadas por el HapMap y finalmente para el polimorfismo rs10246939 aun cuando en los tres casos las frecuencias difieren se mantiene la tendencia de A como alelo menor y los genotipos GG y GA en mayor frecuencia. Estas diferencias pueden deberse a la procedencia geográfica de la población, en el caso de HapMap estudiaron población que radica en Los Ángeles, California con ascendencia mexicana, mientras que Ramos y colaboradores trabajaron con una población mestizo-mexicana procedente del estado de Jalisco y el Oeste de la República, y en el presente proyecto gran parte de la población es originaria del centro del país. Este comportamiento se ha observado en otras poblaciones, por ejemplo, Sacerdote *et al.* 2007 estudiaron una población de 634 italianos encontrando diferencias entre las frecuencias de los haplotipos PA (rs713598) y AV (rs1726866) de *TAS2R38* entre italianos del sur-centro e italianos del norte.

Tabla 21 Comparación de las frecuencias de los polimorfismos rs713598, rs1726866 y rs10246939 del gen TAS2R38 en población mexicana

REFERENCIA	rs713598		rs1726866		rs10246939	
	Frecuencia alélica	Frecuencia genotípica	Frecuencia alélica	Frecuencia genotípica	Frecuencia alélica	Frecuencia genotípica
HAPMAP, 2019 n= 107	C=0.328	CC=0.109	T=0.321	CC=0.484	G=0.672	GG=0.469
	G=0.672	CG=0.438	C= 0.688	CT=0.406	A=0.328	GA=0.406
		GG=0.453		TT= 0.109		AA=0.125
RAMOS <i>et al.</i> 2015 n= 375	C=0.388	CC=0.148	T=0.629	CC=0.134	G=0.621	GG=0.379
	G=0.612	CG=0.48	C=0.371	CT=0.47	A=0.379	GA=0.485
		GG=0.372		TT=0.39		AA=0.137
PROYECTO n=115	C=0.778	CC=0.583	T=0.300	CC=0.461	G=0.630	GG=0.365
	G=0.222	CG=0.391	C=0.700	CT=0.478	A=0.370	GA=0.53
		GG=0.026		TT=0.061		AA=0.104

Se realizó el análisis de asociación de cada uno de los SNPs del gen *TAS2R38* con DT2. Este análisis de asociación se llevó a cabo considerando tres modelos de herencia: dominante, recesivo y aditivo. La medida de asociación empleada fue la razón de momios (OR) así como el IC al 95%. Los resultados de la tabla 15 muestran en todos los casos una $p > 0.05$ por lo que con base a los valores de OR y el IC 95% se concluye que no existe asociación de los SNPs del gen *TAS2R38* con DT2 en la muestra de población mexicana analizada. Aun cuando no existe algún reporte del comportamiento de este gen y sus variantes polimórficas en población diabética mexicana y a nivel mundial son pocos los estudios publicados sobre el tema, los resultados obtenidos en la presenta investigación concuerdan con los reportados por Dotson *et al.* 2008 en población Amish en la que tampoco se encontró asociación alguna de estos polimorfismos con DT2.

La literatura reporta que los SNPs rs713598, rs1726866 y rs10246939 del gen *TAS2R38* se encuentran en desequilibrio de ligamiento, por lo que se pueden heredar en bloques generando dos haplotipos principales, el haplotipo PAV que corresponde a la variante catadora de sabores amargos y el haplotipo AVI que corresponde a la variante no catadora.

Se realizó el análisis del desequilibrio de ligamiento por medio del programa Haploview 4.2. El LD Plot generado muestra que los tres SNPs presentan valores de D' muy cercanos a 1, sin embargo, los valores de r^2 son muy inferiores a 1, estos resultados indican que los tres SNPs en estudio se encuentran en desequilibrio de ligamiento, pero no pueden ser evaluados

por separado considerando a alguno de ellos como TagSNP debido a que el coeficiente de correlación r^2 es inferior a 1. Estos resultados concuerdan con la evidencia de que la actividad bioquímica y fisiológica del receptor T2R38 depende en conjunto de la presencia e interacción de los aminoácidos codificados por los polimorfismos rs713598, rs1726866 y rs10246939.

A nivel mundial los haplotipos de *TAS2R38* más frecuentes son PAV y AVI (Ramos *et al.* 2015) Sin embargo, en el presente estudio, de los 7 haplotipos presentes en la población mexicana evaluada los haplotipos PAI y PAV son los más frecuentes tanto para el grupo control como para el grupo de pacientes con DT2. Risso *et al.* 2016 reportaron la presencia del haplotipo PAI en una frecuencia de 0.32% en población europea, ausente para población americana y a nivel mundial se ha reportado sólo en el 0.18% por lo que se le ha clasificado como un haplotipo extremadamente raro. En población mexicana Ramos *et al.* 2015 reportan dos haplotipos principales que representan el 96% de todos los haplotipos: AVV (60%) y PAI (36.5%), este último concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio. Contrario a lo que se esperaba, el haplotipo AVI solo se encontró en el 15% de la población y se identificaron cuatro haplotipos raros: PVI (7%), AVV (4%), PVV (3%) y AAI (3%). Cabe mencionar que Risso *et al.* 2016 reporta el haplotipo AVV como ausente en población americana y con frecuencia del 5% en población europea, aun cuando la frecuencia de este haplotipo en población mexicana fue inferior a la reportada por Ramos *et al.* 2015 se confirma su presencia en población mexicana, así como la prevalencia del haplotipo PAI.

Como se puede apreciar en la gráfica 3 el haplotipo PAV es el más frecuente en población diabética mexicana por lo que se esperaría una asociación de riesgo de este haplotipo con DT2 en población mexicana.

Dado que la población diabética puede presentar el haplotipo PAV tanto en forma homocigota como heterocigota se realizó el análisis de asociación empleando los diplotipos. En general se identificaron 16 diplotipos diferentes de los cuales PAI/PAI (29%) y PAV/AVI (28%) fueron los más frecuentes en el grupo control, mientras que para el grupo DT2 PAV/PAI (24%) y PAV/PAV (2%) fueron los más frecuentes (tabla 18).

El análisis de asociación se llevó a cabo entre los diplotipos de mayor frecuencia. Los resultados mostraron una asociación de riesgo del diplotipo PAV/PAI con DT2 ($p= 0.027$) (OR= 2.514 [1.131-5.590]). Si bien no se encontró asociación con el diplotipo PAV/PAV se puede observar en la gráfica 4 una tendencia de este a presentarse en mayor frecuencia en el grupo de pacientes con DT2 por lo que sería importante aumentar la n para que se defina la asociación o no de este diplotipo con DT2. Este resultado fue contrario al propuesto en la hipótesis, ya que se esperaba que la asociación de riesgo fuera con el haplotipo AVI dado que los individuos que portan este haplotipo no pueden activar la vía de señalización propuesta para el mecanismo endócrino de *TAS2R38* que lleva a la liberación de GLP-1 y por tanto a la regulación de la homeostasis de glucosa.

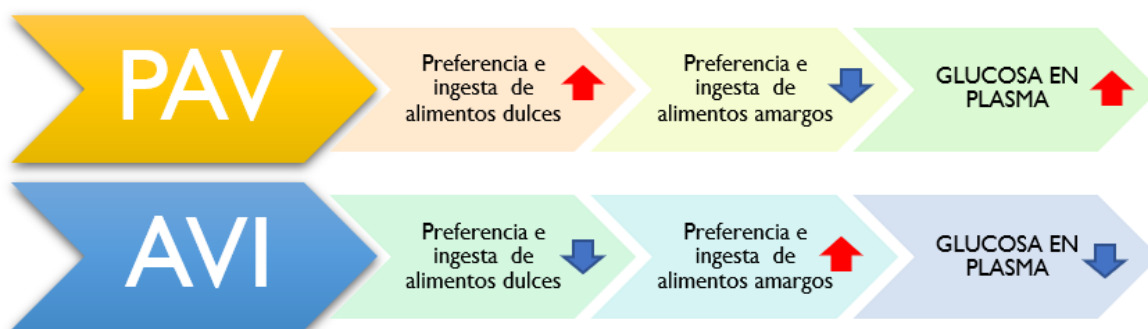
Sería complicado inferir el mecanismo bioquímico que explique este comportamiento, sin embargo, fisiológicamente podría tener la siguiente explicación:

Los mecanismos de percepción del sabor pueden afectar las cualidades percibidas de los alimentos e impactar en las preferencias e ingesta de estos (Dotson *et al.* 2008). Muchos vegetales de la familia *Cruciferae* se caracterizan por poseer sabores amargos que les confieren los glucosinolatos que presentan, tal es el caso del berro, brócoli, diversos tipos de coles, nabos, bok choy, mostaza, entre otros. Sandell & Breslin, 2006 demostraron que los individuos homocigotos para PAV perciben los sabores de estos alimentos con mayor intensidad, los homocigotos para AVI no los perciben y los heterocigotos PAV/AVI los perciben con una intensidad intermedia.

Ramos *et al.* 2015 reportan que tanto el haplotipo PAV como el PAI tienen el mismo efecto de respuesta al sabor de PCT y PROP. Bajo esta premisa se puede plantear que los individuos que son tanto homocigotos como heterocigotos para el haplotipo PAV al percibir el sabor amargo de los alimentos con mayor intensidad, principalmente verduras, los rechazarían y consumirían mayor cantidad de carbohidratos que a largo plazo sería un factor de riesgo importante para el desarrollo de DT2 (Fig. 15), por el contrario, los individuos homocigotos para el haplotipo AVI, al no percibir este sabor amargo característico de estos alimentos los

consumirían en mayor cantidad y en general llevarían una dieta más balanceada, lamentablemente este supuesto no fue analizado en la población de estudio.

La asociación entre los polimorfismos rs713598, rs1726866 y rs10246939 y los haplotipos PAV y AVI con las preferencias alimentarias no es muy clara aún y en población mexicana no se ha estudiado. En niños es evidente la asociación entre las variantes catadoras y la preferencia de consumo de carbohidratos, así como la asociación entre las variantes no catadoras y el consumo de vegetales (Pawellek *et al.* 2016; Cont *et al.* 2019; Mennella *et al.* 2005) mientras que, en adultos, autores como Hiroko *et al.* 2013, Keller *et al.* 2013, Deshaware & Singhal, 2017 y Lambert, 2018 reportan que no hay asociación entre los polimorfismos y haplotipos de *TAS2R38* con preferencias alimentarias. Otros autores como Dotson *et al.* 2009, Perna *et al.* 2018 y Sacerdote *et al.* 2007 reportan asociación de rs1726866 (T785C) con preferencias alimentarias en mujeres Amish, mientras que en población italiana se asoció a la variante rs713598 con la preferencia al consumo de mantequilla, cerveza, carne cruda, helado y derivados de lactosa. Duffy, 2007 reporta que tanto niños como adultos que son catadores para PROP consumen menor cantidad de vegetales. Dichos estudios apoyarían la nueva hipótesis planteada que asocia la presencia de los haplotipos PAV y PAI con la preferencia alimentaria e ingesta energética en población mexicana que se muestra en la fig. 15.



*Fig. 15 Impacto de las preferencias alimentarias en la homeostasis de glucosa mediada por T2R38
Adaptado de: Chamoun et al. 2018*

X. Conclusión

Se identificó a PAI como uno de los haplotipos principales del gen *TAS2R38* en población mexicana. El haplotipo heterocigoto PAV/PAI se asocia al riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 en población mexicana, vinculadas posiblemente a preferencias alimentarias, por lo que con base a estos resultados, se rechaza la hipótesis planteada.

XI. Perspectivas

- ✓ Determinar si existe asociación de los polimorfismos y haplotipos del gen *TAS2R38* con preferencias alimentarias en población mexicana.
- ✓ Realizar el docking molecular del haplotipo PAI del receptor T2R38 con PTC con la finalidad de investigar cómo afecta este cambio de aminoácidos la estructura y función del receptor.
- ✓ Incrementar la n poblacional en el estudio de asociación con diabetes para mejorar el poder estadístico.

ANEXO 1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
COMISIÓN DE ÉTICA



6 de marzo del 2018

Dra. Sandra Díaz-Barriga Arceo
FES Cuautitlán
Presente

Dra. Díaz-Barriga:

En respuesta a su solicitud de revisión del Protocolo de Investigación:

Genotipificación de los polimorfismos rs713598: A/P, rs1726866: A/V, rs10246939:
I/V del gen TAS2R38, en células del epitelio de la cavidad oral
de pacientes con diabetes tipo 2

y del formato de Consentimiento Informado que Ustedes han elaborado para recabar las muestras de las personas que proporcionarán las muestras de saliva y sangre periférica, me permito informarle que esta Comisión ha determinado emitir el dictamen con folio Ext/01/2018 de:

Avalado sin recomendaciones

Agradecemos su confianza en esta Comisión y les deseamos éxito en su proyecto.

Atentamente

Prof. Ma. Eugenia Isabel Heres y Pulido
Presidente de la Comisión de Ética

ANEXO 2

CONSENTIMIENTO INFORMADO EN MATERIA DE INVESTIGACIÓN

Título del protocolo: Genotipificación de los polimorfismos rs713598: A/P, rs1726866: A/V, rs10246939: I/V del gen *TAS2R38*, en células del epitelio de la cavidad oral de pacientes con diabetes tipo 2

Investigador principal: Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo

Sede donde se realizará el estudio: Laboratorio de Citogenética, L-521. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Campo 1. UNAM

Nombre del paciente: _____

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación clínica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

Determinar si existe asociación entre la capacidad de degustar sabores amargos (determinada por polimorfismos de *TAS2R38*) y la diabetes tipo 2.

BENEFICIOS DEL ESTUDIO

De existir una asociación entre la capacidad de degustar sabores amargos y diabetes tipo 2 este conocimiento servirá para diseñar estrategias de intervención alimenticia en poblaciones de alto riesgo, con la finalidad de prevenir y/o retardar en la medida de lo posible el desarrollo de la enfermedad.

PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

El presente proyecto se trata de un estudio de casos y controles, transversal y retrospectivo.

Población problema

Criterios de inclusión: Individuos ambos sexos, entre los 30 y 65 años con diagnóstico clínico de diabetes tipo 2.

Criterios de exclusión: Individuos menores de 30 años y mayores de 65 que no tengan diagnóstico clínico de diabetes.

Población control

Criterios de inclusión: Individuos de 30 a 65 años, sin diagnóstico clínico de diabetes, valores de glucosa sérica menores de 120 mg/dL en ayuno, valores de colesterol sérico menores de 200 mg/dL en ayuno y valores de TAG menores de 150 mg/dL.

Criterios de exclusión: Individuos menores de 30 años y mayores de 65 años, con diagnóstico clínico de diabetes, valores de glucosa sérica mayores de 120 mg/dL en ayuno, valores de colesterol sérico mayores de 200 mg/dL en ayuno y valores de TAG mayores de 150 mg/dL.

Si reúne las condiciones para participar en este protocolo y desea aceptar participar se le realizarán las siguientes pruebas y procedimientos:

1. Se le solicitará que responda un cuestionario para conocer sus antecedentes familiares y personales, así como un cuestionario de hábitos alimentarios.
2. Los investigadores medirán su peso, circunferencia de cintura y presión arterial.
3. Se le dará a probar una tira de papel impregnada con una solución de feniltiocarbamida al 0.1% con la finalidad de saber si usted es degustador o no degustador de esta sustancia.
4. Se le tomará una muestra de 10 ml de sangre. Para ello, es necesario que se presente en ayuno de 8 a 12 horas, sin haber ingerido bebidas alcohólicas 24 horas antes.
5. Se le tomará una muestra de 10 ml de saliva. Para ello, es necesario que se presente con aseo bucal.
6. La toma de muestras se realizará en el Laboratorio de Citogenética, L-521 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Campo 1. UNAM. Su muestra de sangre servirá para hacer mediciones de glucosa sérica, colesterol y triacilglicéridos, mientras que la de saliva se usará para obtener DNA, el cual será utilizado para realizar estudios genéticos y/o será almacenada en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Su muestra será codificada de acuerdo con el número que se le asigne en el estudio por la QFB María Llasbeth Hernández Calderón a quien podrá contactar en el correo electrónico fesc.llasbeth@gmail.com para cualquier duda y/o aclaración. Cabe mencionar que quién tenga acceso a su muestra de DNA, sus resultados o sus análisis, no tendrá acceso a su nombre y datos personales.
7. Una vez concluido el presente estudio, su muestra de DNA será destruida.
8. Si así lo desea se le entregarán los resultados de sus determinaciones bioquímicas y genéticas y en caso de estar alteradas se le canalizará a los servicios de salud correspondientes.

RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

Antes de la toma de muestra de sangre periférica debe indicar si toma algún tipo de anticoagulante. Durante el procedimiento para obtener la muestra de sangre de una vena del brazo, puede sentir alguna molestia o dolor ligero. En algunas personas se puede presentar un hematoma (moretón) que desaparecerá en algunos días y no implica riesgo alguno. Para los degustadores de feniltiocarbamida su sabor puede causar desagrado.

ACLARACIONES

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
- No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo al investigador responsable.
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.
- Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Firma del participante o del padre o tutor

Fecha

Testigo 1

Fecha

Testigo 2

Fecha

Esta parte debe ser completada por el Investigador (o su representante):

He explicado al Sr(a) _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del investigador

Fecha: _____

CARTA DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Título del protocolo: Genotipificación de los polimorfismos rs713598: A/P, rs1726866: A/V, rs10246939: I/V del gen TAS2R38, en células del epitelio de la cavidad oral de pacientes con diabetes tipo 2

Investigador principal: Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo

Sede donde se realizará el estudio: Laboratorio de Citogenética, L-521. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Campo 1. UNAM

Nombre del paciente: _____

Por este conducto deseo informar mi decisión de retirarme de este protocolo de investigación por las siguientes razones (Opcional):

_____.

Si el paciente así lo desea, podrá solicitar que le sea entregada toda la información que se haya recabado sobre él, con motivo de su participación en el presente estudio.

Firma del participante o del padre o tutor

Fecha

Testigo 1

Fecha

Testigo 2

Fecha

c.c.p El paciente

(Se deberá elaborar por duplicado quedando una copia en poder del paciente)

ANEXO 3

HISTORIA CLÍNICA

Ficha de identificación

ID: _____

NOMBRE: _____

EDAD: _____ SEXO: ____ ESTADO CIVIL: _____ OCUPACIÓN: _____

DIRECCIÓN: _____

ESTADO DE LA REPÚBLICA PROVENIENTE: _____

GRUPO SANGUINEO: _____ ALERGIAS: _____

Antecedentes heredofamiliares

Sus padres, abuelos o hermanos ¿padecen o padecieron; alguna o algunas de las enfermedades mencionadas? Trace una cruz en la columna que corresponda

PATOLOGÍAS	SÍ	No
Obesidad		
Diabetes		
Cáncer		
Hipercolesterolemia		
Hipertrigliceridemia		
Hipertensión arterial		
Alcoholismo		
Tabaquismo		
Otras no mencionadas		

Antecedentes personales patológicos

¿Padece o padeció alguna o algunas de las enfermedades mencionadas? Trace una cruz en la columna que corresponda

PATOLOGÍAS	SÍ	No
Obesidad		
Diabetes		
Cáncer		
Hipercolesterolemia		
Hipertrigliceridemia		
Hipertensión arterial		
Alcoholismo		
Tabaquismo		
Otras no mencionadas		

En caso de ser diabético, ¿Tiempo de evolución de la enfermedad? _____

¿Se ha realizado, en los últimos 3 meses, la prueba de hemoglobina glicosilada? No __ Sí ____ ¿Cuál es su valor?

¿Cuántas comidas realiza al día? _____
 ¿Cuáles son sus alimentos preferidos? _____
 ¿Con qué frecuencia los consume? _____
 ¿Qué alimentos no le agradan / no acostumbra? _____
 ¿Algún alimento le causa malestar? ¿Cuál? _____
 ¿Es alérgico o intolerante a algún alimento? No _____ Sí _____ ¿Cuál? _____

Frecuencia en consumo de alimentos

¿Con que frecuencia consume los siguientes alimentos y bebidas?

Alimento /Bebida	Diario	Semanal	Quincenal	Mensual	Nunca
Papa					
Frijol					
Chicharos					
Pepino					
Calabaza					
Lechuga					
Espinaca					
Coles de Bruselas					
Coliflor					
Brócoli					
Soya					
Toronja					
Té verde					
Café					
Cerveza					
Bebidas alcohólicas ¿Cuáles?					

¿Con que frecuencia consume los siguientes alimentos y bebidas? (Continuación)

Alimento /Bebida	Diario	Semanal	Quincenal	Mensual	Nunca
Mantequilla					
Manteca					
Chicharrón					
Sustituto de crema					
Chorizo					
Tocino					
Crema					
Mayonesa					
Aderezo cremoso para ensaladas					
Chocolates					
Aceites de maíz					
Ajonjolí / girasol					
Vinagreta					
Aceite de oliva					
Aceite canola					
Aguacate					
Margarina					
Agua preparada de sabor					
Polvo para beber de sabor					
Azúcar					
Cajeta					
Mermelada					
Miel					
Caramelo					
Chicle					
Chocolate en polvo					
Gelatina					
Nieve de frutas					
Helados de crema					
Jugos industrializados					
Refrescos					

Información complementaria

¿Usted fuma? No: ____ Sí: ____ ¿Con qué frecuencia? _____ ¿Cantidad? _____

¿Realiza alguna actividad física? No ____ Sí ____ ¿Cuál? _____ ¿Con qué frecuencia? _____

Indicadores Antropomórficos

PARÁMETRO	RESULTADO
Peso (kg)	
Talla (m)	
Circunferencia abdominal (cm)	

Indicadores bioquímicos

PARÁMETRO (mg/dL)	RESULTADO
Glucosa	
TAG	
Colesterol	

Indicadores del gusto

PRUEBA PTC	Escala de sensibilidad		
	Sensibilidad <u>ALTA</u> a la PTC (+++)	Sensibilidad <u>MEDIA</u> a la PTC (++)	Sensibilidad <u>BAJA</u> a la PTC (+)

Deseo conocer mis resultados _____

Nombre y firma

Comunicarse al número telefónico: _____ y/o al correo electrónico:

REFERENCIAS

1. Abrol, R., Tan, J., Hui, H., Goddard III, W. A., Pandol, S. J. (2015). Structural basis for bitter taste receptor activation and its potential role in targeting diabetes. *Functional Foods in Health and Disease*, 2015; 5(3): 117-125
2. ADA (2019) Standards of Medical Care In Diabetes-2019. Información en línea. Tomado de: http://care.diabetesjournals.org/content/42/Supplement_1/S1. Fecha de consulta: 05/02/19.
3. Bachmanov, A. A y Beauchamp, G. K (2007). Taste Receptor Genes. *Annu Rev Nutr*, 27. Pp. 389-414.
4. Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J., Daly, M. J. (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. [PubMed ID: 15297300]
5. Bering, A (2012). *Genetic Analysis of Taste in Homo Sapiens*. Tesis de Maestría. Brock University. Ontairo, Sr. Catharines.
6. Carrai, M., Steinke, V., Vodicka, P., Pardini, B., Rahner, N., Holinski-Feder, E., ... Campa, D. (2011). Association between TAS2R38 gene polymorphisms and colorectal cancer risk: a case-control study in two independent populations of Caucasian origin. *PLoS One*, 6(6), e20464. doi:10.1371/journal.pone.0020464
7. Chamoun, E., Mutch, D. M., Allen-Vercoe, E., Buchholz, A.C., Duncan, A. M., Spriet, L. L., et al. (2018) A review of the associations between single nucleotide polymorphisms in taste receptors, eating behaviors, and health. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 58:2, 194-207, DOI: 10.1080/10408398.2016.1152229
8. Choi, J. H., Lee, J., Choi, I. J., Kim, Y. W., Ryu, K. W., & Kim, J. (2016). Genetic Variation in the TAS2R38 Bitter Taste Receptor and Gastric Cancer Risk in Koreans. *Sci Rep*, 6, 26904. doi:10.1038/srep26904
9. Cont, G., Paviotti, G., Montico, M., Paganin, P., Guerra, M., Trappan, A., et al. (2019). TAS2R38 bitter taste genotype is associated with complementary feeding behavior in infants. *Genes & Nutr*, 14, 13. doi:10.1186/s12263-019-0640-z

10. Deshaware, S & Singhal, R. (2017). Genetic variation in bitter taste receptor gene *TAS2R38*, PROP taster status and their association with body mass index and food preferences in Indian population. *Gene*. 627:363-368. doi: 10.1016/j.gene.2017.06.047
11. Deshpande, D. A., Wang, W. C., McIlmoyle, E. L., Robinett, K. S., Schillinger, R. M., An, S. S., Sham, J. S., ... Liggett, S. B. (2010). Bitter taste receptors on airway smooth muscle bronchodilate by localized calcium signaling and reverse obstruction. *Nat Med*, 16(11), 1299-304.
12. Dotson, C. D., Zhang, L., Xu, H., Shin, Y. K., Vignes, S., Ott, S. H., Elson, A. E., Choi, H. J., Shaw, H., Egan, J. M., Mitchell, B. D., Li, X., Steinle, N. I., ... Munger, S. D. (2008). Bitter taste receptors influence glucose homeostasis. *PLoS One*, 3(12), e3974.
13. Duffy, V. B. (2007). Variation in oral sensation: implications for diet and health. *Nutrition*, 23(2): 171-177. doi: 10.1097/MOG.0b013e3280147d50
14. ENSANUT (2016) Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2016. Información en línea. Tomado de: <https://ensanut.insp.mx/ensanut2016/index.php#.XJG6NvZFxhE>. Fecha de consulta: 24/07/2018.
15. Ezcurra, L. P. (2016). Guía de Actualización en Diabetes Mellitus Tipo 2. Información en línea. Tomado de: <http://redgdps.org/guia-de-actualizacion-en-diabetes-20161005/>. Fecha de consulta: 28/10/2018.
16. FMD (2017) Estadísticas en México. Información en línea. Tomado de: <http://fmdiabetes.org/estadisticas-en-mexico/>. Fecha de consulta: 02/02/19
17. GeneCards (2017) *TAS2R38* Gene. Información en línea. Tomado de: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TAS2R38>. Fecha de consulta: 23/04/2018.
18. Guili, V. (2019). Sensibilité au ptc (phénylthiocarbamide): phénotype macroscopique, phénotype moléculaire, génotype. Información en línea. Tomado de: <http://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biologie/spip.php?article367>. Fecha de consulta: mayo 2018.
19. HapMap (2018). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/> . Fecha de consulta: agosto de 2018

20. Hiroko, I., Kimiko, Y.K., Yuichi, S., Teruyo, N., Hisayoshi, H., & Toshiko, K. (2012). A Case Study on the Association of Variation of Bitter-Taste Receptor Gene TAS2R38 with the Height, Weight and Energy Intake in Japanese Female College Students. *J Nutr Sci Vitaminol*, 59, 16-21.
21. IBM Corp. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.
22. IDF (2017) Diabetes Atlas. 8va Edición. Información en línea. Tomado de: www.diabetesatlas.org. Fecha de consulta: 04/02/2019. ISBN: 978-2-930229-87-4
23. Keller, M., Liu, M., Wohland, T., Rohde, K., Gast, M., Stumvoll, M., Kovacs, P., Tönjes, A., & Böttcher, Y. (2013), TAS2R38 and its influence on smoking behavior and glucose homeostasis in the german Sorbs. *PLoS One*, 8(12). doi.org/10.1371/journal.pone.0080512
24. Kim, K. S., Egan, J. M., & Jang, H. J. (2014). Denatonium induces secretion of glucagon-like peptide-1 through activation of bitter taste receptor pathways. *Diabetologia*, 57(10), 2117–2125. doi:10.1007/s00125-014-3326-5
25. Kim, U. K., Jorgenson, E., Coon, H., Leppert, M., Risch, N., & Drayna, D. (2003). Positional cloning of the human quantitative trait locus underlying taste sensitivity to phenylthiocarbamide. *Science*, 299:1221–1225. doi:10.1126/science.1080190
26. Kokrashvili, Z., Mosinger, B., & Margolskee, R. F. (2009). Taste signaling elements expressed in gut enteroendocrine cells regulate nutrient-responsive secretion of gut hormones. *Am J Clin Nutr* 90(3), 822S–825S. doi:10.3945/ajcn.2009.27462T
27. Lambert, J.D., VanDusen, S.R., Cockcroft, J.E. et al. (2019) Bitter taste sensitivity, food intake, and risk of malignant cancer in the UK Women’s Cohort Study. *Eur J Nutr*. 58: 2111. <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1772-4>
28. Lee RJ & Cohen NA (2016) Los centinelas del sabor amargo. *Investigación y Ciencia*. No. 475
29. Lu, P., Zhang, C. H., Lifshitz, L. M., & ZhuGe, R. (2017). Extraoral bitter taste receptors in health and disease. *J Gen Physiol* 149(2), 181–197. doi:10.1085/jgp.201611637
30. Maurer, S., Wabnitz, G. H., Kahle, N. A., Stegmaier, S., Prior, B., Giese, T., ... Hänisch, G. M. (2015). Tasting *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Human

- Neutrophils Express the Bitter Receptor T2R38 as Sensor for the Quorum Sensing Molecule N-(3-Oxododecanoyl)-l-Homoserine Lactone. *Front Immunol*, 6, 369. doi:10.3389/fimmu.2015.00369
31. Mennella, J. A., Pepino, M. Y., & Reed, D. R. (2005). Genetic and environmental determinants of bitter perception and sweet preferences. *Pediatrics*, 115(2), e216–e222. doi:10.1542/peds.2004-1582
 32. NCBI (2016) TAS2R38 taste 2 receptor member 38 [Homo sapiens (human)]. Información en línea. Tomado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5726>. Fecha de consulta: 23/04/2018.
 33. OMS. 2015. Diabetes. Nota descriptiva No. 312. Información en línea. Tomado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>. Fecha de consulta: 14 de febrero de 2018.
 34. Ortega, F. J., Agüera, Z. , Sabater, M. , Moreno-Navarrete, J. M., Alonso-Ledesma, I. , Xifra, G. , Botas, P. , Delgado, E. , Jimenez-Murcia, S. , Fernández-García, J. C., Tinahones, F. J., Baños, R. M., Botella, C. , Torre, R. , Frühbeck, G. , Rodríguez, A. , Estivill, X. , Casanueva, F. , Ricart, W. , Fernández-Aranda, F. & Fernández-Real, J. M. (2016). Genetic variations of the bitter taste receptor TAS2R38 are associated with obesity and impact on single immune traits. *Mol Nutr Food Res*, 60: 1673-1683. doi:10.1002/mnfr.201500804
 35. Pawellek I, Grote V, Rzehak P, Xhonneux A, Verduci E, Stolarczyk A, et al. (2016). Association of TAS2R38 variants with sweet food intake in children aged 1–6 years. *Appetite*. 107:126-134. doi: 10.1016/j.appet.2016.07.034
 36. Pérez, B. F. (2009). Epidemiología y fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 2. *Rev Med Clin Condes-2009*; 20(5) 565-571.
 37. Perna, S., Riva, A., Nicosanti, G., Carrai, M., Barale, R., Vigo, B., et al. (2018) Association of the bitter taste receptor gene TAS2R38 (polymorphism RS713598) with sensory responsiveness, food preferences, biochemical parameters and body-composition markers. A cross-sectional study in Italy. *Int J Food Sci Nutr*. 69:2, 245-252, DOI: 10.1080/09637486.2017.1353954
 38. Pham, H., Hui, H., Morvaridi, S., Cai, J., Zhang, S., Tan, J., ... Abrol, R. (2016). A bitter pill for type 2 diabetes? The activation of bitter taste receptor TAS2R38 can

- stimulate GLP-1 release from enteroendocrine L-cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 475(3), 295–300. doi:10.1016/j.bbrc.2016.04.149
39. Ramos, L. O., Roman, S., Martínez, L. E., González, A. K., Ojeda, G. C., Sepulveda, V. M., & Panduro, A. (2015). Association of a novel TAS2R38 haplotype with alcohol intake among mexican-mestizo population. *Annals of Hepatology*, 14(5):729-734.
40. Risso, D. S., Mezzavilla, M., Pagani, L., Robino, A., Morini, G., Tofanelli, S., Carrai, M., Campa, D., Barale, R., Caradonna, F., Gasparini, P., Luiselli, D., Wooding, S., ... Drayna, D. (2016). Global diversity in the TAS2R38 bitter taste receptor: revisiting a classic evolutionary PROPosal. *Sci Rep*, 6, 25506. doi:10.1038/srep25506
41. Roudnitzky, N., Behrens, M., Engel, A., Kohl, S., Thalmann, S., Hübner, S., et al. (2015). Receptor Polymorphism and Genomic Structure Interact to Shape Bitter Taste Perception. *PLoS genet*, 11(9), e1005530. doi:10.1371/journal.pgen.1005530
42. Rozengurt, E. (2006). Taste Receptors in the Gastrointestinal Tract. I. Bitter taste receptors and α -gustducin in the mammalian gut. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 291: G171–G177, 2006; doi:10.1152/ajpgi.00073.2006.
43. Sacerdote, C., Guarrera, S., Davey Smith, G., Grioni, S., Krogh, V., Masala, G., et al. (2007). Lactase Persistence and Bitter Taste Response: Instrumental Variables and Mendelian Randomization in Epidemiologic Studies of Dietary Factors and Cancer Risk, *Am J Epidemiol*. 166(5):576-81 <https://doi.org/10.1093/aje/kwm113>
44. Sandell, M. A. & Breslin, P. A. S. (2006). Variability in a taste-receptor gene determines whether we taste toxins in food. *Curr Biol*. 16(18):R792-4. doi.org/10.1016/j.cub.2006.08.049
45. Schiess, S., Platz, S., Kemper, M., Schreiner, M., Mewis, I., Rohn, S., Bumke-Vogt, C., Pivovarova, O., Pfeiffer, A. F.H. (2017). Oral administration of nasturtium affects peptide YY secretion in male subjects. *Mol Nutr Food Res*, 61, 1600886. doi.org/10.1002/mnfr.201600886
46. Soriano, L. (2019). Detección del polimorfismo 4 de CYP2D6 en población juvenil a partir de muestras de sangre y saliva. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán. UNAM. México.

47. Tébar, M. F. J. (2014). La Diabetes en la Práctica Clínica. Ed. Médica Panamericana. Pp. 520
48. Wendell, S., Wang, X., Brown, M., Cooper, M. E., DeSensi, R. S., Weyant, R. J., ... Marazita, M. L. (2010). Taste genes associated with dental caries. *J Dent Res*, 89(11), 1198–1202. doi:10.1177/0022034510381502
49. Wölfle, U., Elsholz, F. A., Kersten, A., Haarhaus, B., Müller, W. E., & Schempp, C. M. (2015A). Expression and Functional Activity of the Bitter Taste Receptors TAS2R1 and TAS2R38 in Human Keratinocytes. *Skin Pharmacol Physiol*; 28:137-146. doi: 10.1159/000367631
50. Wölfle, U., Elsholz, F. A., Kersten, A., Haarhaus, B., Schumacher, U., & Schempp, C. M. (2016). Expression and Functional Activity of the Human Bitter Taste Receptor TAS2R38 in Human Placental Tissues and JEG-3 Cells. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(3), 306. doi:10.3390/molecules21030306.
51. Wölfle, U., Haarhaus, B., & Schempp, C. M. (2015B). Amarogentin Displays Immunomodulatory Effects in Human Mast Cells and Keratinocytes. *Mediators of Inflamm*, 2015, 630128. doi:10.1155/2015/630128
52. Wölfle, U., Haarhaus, B., Seiwert, J., Cawelius, A., Schwabe, K., Quirin, K. W., & Schempp, C. M. (2017). The Herbal Bitter Drug Gentiana lutea Modulates Lipid Synthesis in Human Keratinocytes In Vitro and In Vivo. *Int J Mol Sci*, 18(8), 1814. doi:10.3390/ijms18081814
53. Workman, A. D., Maina, I. W., Brooks, S. G., Kohanski, M. A., Cowart, B. J., Mansfield, C., ... Cohen, N. A. (2018). The Role of Quinine-Responsive Taste Receptor Family 2 in Airway Immune Defense and Chronic Rhinosinusitis. *Front Immunol*, 9, 624. doi:10.3389/fimmu.2018.00624
54. Xie, C., Wang, X., Young, R. L., Horowitz, M., Rayner, C. K., & Wu, T. (2018). Role of Intestinal Bitter Sensing in Enteroendocrine Hormone Secretion and Metabolic Control. *Front Endocrinol*, 9, 576. doi:10.3389/fendo.2018.00576
55. Yamaki, M., Saito, H., Isono, K., Goto, T., Shirakawa, H., Shoji, N., Satoh-Koriwada, S., Sasano, T., Okada, R., Kudoh K, Motoi, F., Unno, M., & Komai, M. (2017). Genotyping Analysis of Bitter-Taste Receptor Genes *TAS2R38* and *TAS2R46* in

- Japanese Patients with Gastrointestinal Cancers. *J Nutr Sci Vitaminol*, 63(2), 148-154, doi.org/10.3177/jnsv.63.148,
56. Yunli, Y., Gang, H., Quanying, Z., Wenyan, H., Meng, W., Wenjia, Z., Shunlin, Z., Ming, H., & Xiaozhou, W. (2015). Berberine induces GLP-1 secretion through activation of bitter taste receptor pathways. *Biochem Pharmacol* 97. Pp. 173-177, doi.org/10.1016/j.bcp.2015.07.012.