



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Farmacia y Bioquímica



**INFLUENCIA DE LA EPIGENÉTICA Y
VARIANTES POLIMÓRFICAS
SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN
INTERLEUQUINA-1 β
EN PACIENTES CON
DIABETES MELLITUS TIPO 2**

TESIS DE MAESTRIA 2018

TESISTA: BIOQ. MARIA FERNANDA BERGONZI

DIRECTOR: DR. GUSTAVO D. FRECHTEL

CO-DIRECTORA: DRA. GLORIA E. CERRONE

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus Tipo 2 (DM2) se ha transformado en una pandemia de proporciones incontrolables constituyendo un problema de salud pública¹.

La Federación Internacional de Diabetes (IDF), estima que para el 2025 habrá unos 334 millones de diabéticos. Además, considera que aún frente a la estabilidad de la prevalencia de obesidad, lo cual parece improbable, el número de diabéticos será más del doble como consecuencia del envejecimiento de la población y la urbanización².

Recientemente, una interesante revisión de Zimmet y col. hace referencia a la pandemia de diabetes y obesidad; fundamentalmente a su alarmante incremento y al impacto que representan para la salud pública³. En esta misma revisión se resalta la participación de modificaciones epigenéticas como el mecanismo responsable que vincula los cambios ambientales (obesidad) con el desarrollo de DM2³. La causa principal de esta pandemia de DM2 es el alarmante incremento, en las últimas décadas, de la incidencia y prevalencia de sobrepeso/obesidad⁴, en la mayoría de los países industrializados, incluidos Argentina y otros países de Latinoamérica⁵⁻⁶.

La DM2 se presenta en aproximadamente el 90% de los individuos diabéticos. En Argentina, la prevalencia de diabetes es cercana al 10%, similar a la de otros países latinoamericanos y a la mayoría de los países industrializados^{4,7}.

En 1998 el Instituto de Salud de Estados Unidos (NIH) encontró que el 55% de la población adulta tenía obesidad o sobrepeso; en el 2004 se vio que las dos terceras partes de la población presentaba obesidad, convirtiéndose éste en un serio problema, no sólo en Estados Unidos sino también a nivel mundial. Las consecuencias adversas de la obesidad para la salud, incluyen, no sólo trastornos metabólicos como la DM2, sino también, enfermedades cardíacas y cáncer. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado, hace ya más de 10 años, que cerca de mil millones de adultos tienen sobrepeso y al menos 300 millones son obesos. Cerca de dos tercios de la población general Argentina presenta sobrepeso u obesidad. En Argentina, 4 de cada 10 personas presentan sobrepeso y 2 de cada 10 obesidad; 8 de cada 10 personas mayores a 18 años se realizaron controles de glucemia, y 1 de cada 10 personas presentan diabetes o glucemia elevada, según datos de la Tercera Encuesta Nacional de Factores de Riesgo (ENFR) realizada en 2013 por el Ministerio de Salud de la Nación.

1.1. Etiopatogenia de la Diabetes Mellitus Tipo 2

La DM2 se desarrolla cuando se asocia resistencia a la insulina (IR) al deterioro en la secreción de insulina por parte de las células β . El primer evento en la secuencia que conduce a DM2 es una resistencia insulínica que lleva a un incremento de la síntesis y secreción de la hormona. Consecuentemente se observa un hiperinsulinismo compensatorio capaz de mantener la homeostasis metabólica por años, antes de que claudique la célula β . Una vez que se quiebra el equilibrio entre resistencia a la insulina y secreción, se inicia la expresión bioquímica (intolerancia a la glucosa) y posteriormente la diabetes clínica.

Un conglomerado de factores de riesgo cardiometabólicos suele acompañar a la obesidad, la DM2 y el síndrome metabólico (SM) los cuales están caracterizados, desde un punto de vista fisiopatológico, no sólo por la presencia de resistencia a la insulina secundaria a sobrepeso/obesidad, sino también por un estado de inflamación subclínica sistémica secundaria a hiperactividad de la inmunidad innata⁸.

En la DM2 se observa hiperglucemia crónica como resultado del defecto en la secreción de insulina, y/o de la acción de la misma. La hiperglucemia crónica a largo plazo, está asociada a disfunción e insuficiencia de varios órganos vitales; por lo cual los individuos con DM2 presentan trastornos del metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas. La DM2 se encuentra asociada entonces a una serie de trastornos metabólicos (obesidad/sobrepeso, dislipoproteinemia, resistencia a la insulina, etc.) y cardiovasculares (hipertensión, vasculopatías, cardiopatías, etc.)

El estado prediabético es reconocido por una serie de alteraciones metabólicas entre las que se encuentran la obesidad (particularmente la obesidad central), la dislipemia (caracterizada por hipertrigliceridemia y descenso del colesterol HDL (c-HDL)), lo cual puede desencadenar SM⁹. El SM está definido en un individuo si se cumplen al menos tres de los cinco ítems siguientes, según National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III (NCEP: ATP III)¹⁰:

- Perímetro abdominal mayor a 88 cm. en las mujeres y mayor de 102 cm. en los hombres.
- c-HDL menor de 50 mg/dL en las mujeres y menor de 40 mg/dL en los hombres
- Hipertrigliceridemia mayor de 150 mg/dL en ayunas.
- Tensión arterial superior a 130/85 mm de Hg.
- Glucemia en ayunas igual o superior a 100 mg/dL.

El paciente que evoluciona desde el estado prediabético a DM2 presenta una falla progresiva de la célula β del páncreas que impide secretar la suficiente cantidad de insulina necesaria para mantener normales los niveles de glucemia. Este defecto de la secreción de insulina está definido por una inapropiada producción de insulina debido a deterioro en la función de la célula beta.

La DM2 se caracteriza por insulino-resistencia y deficiencia de insulina. Cuando un individuo se enfrenta a una demanda metabólica incrementada, como ayuno, estrés o infección, se promueve un estado de resistencia a la insulina, mediada por diferentes hormonas y citoquinas.

La Resistencia Insulínica se manifiesta por una desviación de la curva dosis-respuesta, donde el grado de respuesta biológica a la hormona se encuentra disminuido. En los individuos afectados, tres características apoyan su existencia:

- tienen menor respuesta a la administración de insulina exógena.
- son resistentes a la acción de la insulina endógena.
- Hiperinsulinemia (incluso antes de que la glucosa plasmática aumente hasta el punto de satisfacer el criterio diagnóstico para diabetes).

Por ej. En pacientes con intolerancia a la glucosa (IGT), los niveles de insulina en plasma aumentan a lo largo de la prueba oral de tolerancia a la glucosa. El hecho de que la hiperinsulinemia no induzca hipoglucemia, demuestra que el paciente es resistente a la acción de la insulina endógena secretada por el páncreas¹¹.

La IR ocurre a nivel del músculo esquelético (menor capacidad de utilización de la glucosa, siendo este tejido donde se capta el 80% de la glucosa circulante), hígado (disminución de la capacidad de inhibición de producción hepática de glucosa), y tejido adiposo (compromiso de la inhibición de la lipólisis)¹².

Los pacientes afectados con DM2 con frecuencia presentan obesidad, con distribución de grasa predominantemente abdominal, responden satisfactoriamente a la dieta y a drogas hipoglucemiantes orales, aunque alrededor del 30%, conforme evoluciona la enfermedad, requieren de insulina exógena para obtener un adecuado control metabólico¹³.

La obesidad es una acumulación excesiva de grasa en el tejido adiposo a un nivel tal que llega a ser perjudicial para la salud. Numerosos estudios han demostrado que la función del tejido adiposo, no solo es depósito de energía, sino que además es un importante órgano endócrino e inmunológico¹⁴.

El tejido adiposo es un órgano endócrino muy activo que secreta una gran cantidad de productos solubles con acciones locales y a distancia.

Estas hormonas cumplen roles muy importantes en el metabolismo, reproducción, función cardiovascular e inmunidad, además ejercen acción sobre otros órganos incluyendo el cerebro, hígado y musculo esquelético. La función endócrina del tejido adiposo está regulada por el estado nutricional, y ambos están estrechamente ligados a su función de reserva energética¹⁵.

Un aspecto trascendental en la fisiopatología de la DM2, es la presencia de un estado de inflamación crónico subclínico, a partir del depósito de macrófagos (previamente monocitos circulantes en sangre periférica) en el tejido visceral abdominal. Estos macrófagos junto con las células adiposas producen una mayor secreción de ácidos grasos libres y de citoquinas proinflamatorias, entre otras interleuquina 1 beta (IL-1 β) e interleuquina 6 (IL6), lo cual empeora la IR previa, acentuada a su vez por el sedentarismo. El referido estado de inflamación subclínica, tiene una implicancia directa en el desarrollo de la IR y en la progresiva falla de la célula β pancreática, determinando el comienzo de la DM2; y se constituye en un reconocido factor de riesgo para enfermedad cardiovascular¹⁶.

La inflamación subclínica depende de los niveles circulantes de moléculas inflamatorias, entre ellas IL-1 β , que es el prototipo de molécula proinflamatoria y considerada como una de las principales citoquinas, ya que participa activamente en los procesos fisiopatológicos de estas alteraciones metabólicas. La misma es producida por monocitos circulantes activados y macrófagos depositados en diferentes tejidos tales como músculo, tejido adiposo, endotelio, hígado y la propia célula β del páncreas.

Ha sido demostrado que la IL-1 β es producida en monocitos circulantes por activación de receptores Toll-like (TLR), lo que implica el clivaje de la proteína precursora de IL-1 β por caspasa 1 a la forma activa de IL-1 β ; la cual es posteriormente secretada por el monocito ante estímulos tales como lipopolisacáridos (LPS) provenientes de la flora intestinal¹⁷.

Las células β pancreáticas son blanco de citoquinas inflamatorias (IL-1 β) las cuales regulan su función, ciclo celular y viabilidad. Estas expresan el receptor de IL-1 β (IL-1R) que se activa por IL-1 β , estimulando la expresión del gen de insulina y su secreción, así como la proliferación de la masa de células β , permitiéndoles adaptarse al aumento de los requerimientos de insulina durante el estrés y los estados de inflamación sistémica aguda, coincidente con niveles incrementados de IL-1 β circulantes¹⁸.

La activación sostenida del IL-1R por IL-1 β , como la que se produce en el referido estado de inflamación crónica subclínica, causa una progresiva disminución de la función de la célula β del páncreas y promueve muerte celular por apoptosis. La acción de IL-1 β sobre su propio receptor es revertida por la molécula antagonista del receptor de interleuquina 1 (IL-1Ra)¹⁹.

Estos efectos de IL-1 β determinan la implicancia de esta citoquina en la relación entre inflamación, con la alteración funcional y la destrucción de la célula β , constituyéndose en un actor principal de los aspectos fisiopatológicos que definen la falla de los islotes pancreáticos en la progresión hacia la DM2²⁰. Los efectos deletéreos de la IL-1 β sobre la célula β del páncreas están significativamente incrementados en los estados de hiperglucemia, ya que se ha comprobado que islotes expuestos a concentraciones crecientes de glucosa presentan aumento de la producción y liberación de esta citoquina. En estados de hiperglucemia, la IL-1 β puede activar al receptor Fas, el cual vía caspasa y NF- κ B determina apoptosis y disfunción de la célula β ²¹⁻²².

La hiperglucemia no sólo induce la producción de IL-1 β por parte de la célula β , sino que también promueve la infiltración del islote pancreático por macrófagos. En este sentido, se encuentra incrementada la producción de IL-1 β , capaz de acentuar la infiltración de macrófagos al páncreas, con lo cual se constituye un círculo reverberante que determina el deterioro de la función y masa de células β ante la hiperglucemia²³.

Se observó que tanto la hiperglucemia persistente como la hiperglucemia postprandial intermitente inducen en ratas la expresión del gen de la IL-1 β , comprobado por el aumento de los niveles de ARNm y proteína de IL-1 β en monocitos de sangre periférica^{24,25}. En un trabajo recientemente publicado en población japonesa, se ha comprobado que los niveles circulantes de IL-1 β se correlacionaron significativamente con los niveles de glucemia en ayunas por encima de 100 mg/dl, y se observó que a mayor glucemia mayor correlación significativa²⁶.

También recientemente fue publicado en población finlandesa, que los niveles circulantes de IL-1 β estaban asociados al consumo de alimentos con altos índices glucémicos en individuos con síndrome metabólico (estado prediabético)²⁷. En un estudio similar, pero realizado en mujeres con sobrepeso sin otras alteraciones metabólicas (obesas con metabolismo normal), se analizaron los niveles circulantes y la expresión de IL-1 β en monocitos circulantes de sangre periférica, basales y postprandiales ante una dieta con bajo y alto índice glucémico, no hallándose diferencias significativas²⁸.

Por lo tanto, es muy probable que se requiera un ambiente metabólico alterado en el cual se produzca la activación de monocitos y el aumento de la expresión de citoquinas inflamatorias, paso previo al desarrollo de DM2.

De esta manera queda demostrado que el estado de inflamación de bajo grado que presentan pacientes con DM2 y alteraciones metabólicas asociadas, está claramente asociado con el aumento de la expresión de IL-1 β a partir de monocitos activados en sangre periférica.

Los efectos deletéreos de la IL-1 β sobre la célula β del páncreas, parecen revertirse con la utilización de IL-1Ra. La administración de IL-1Ra en modelos animales, cuya diabetes es inducida por una dieta rica en grasa saturada, impidió el desarrollo de la enfermedad²⁹. En un trabajo a doble ciego en pacientes con DM2 que recibieron IL-1Ra vs. Placebo, se observó disminución en los niveles de glucemia y una mejoría en la función beta celular, disminuyendo los marcadores de inflamación en aquellos que recibieron la medicación con respecto a los que no la recibieron³⁰.

Tanto la obesidad, como el SM³¹ y la DM2³² pertenecen a las denominadas enfermedades complejas, prevalentes y heterogéneas, cuya etiopatogenia estriba en interacciones complejas y múltiples (aún no elucidadas) entre factores genéticos y ambientales. La DM2 resulta de la interacción de factores ambientales sobre un individuo genéticamente predispuesto. Es fenotípicamente heterogénea y no puede ser explicada por un simple mecanismo fisiopatológico³³.

El grado de hiperglucemia en DM2 es suficiente para causar modificaciones funcionales en varios tejidos “blanco” sin que haya signos clínicos por un largo período. Estos pacientes pueden lograr un adecuado control de la glucemia con variaciones en su estilo de vida como reducción de peso, aumento de actividad física, y uso de hipoglucemiantes orales.

Dado que los cambios en la incidencia de la DM2 han ocurrido demasiado rápidamente para atribuirle sólo causas genéticas, la gran mayoría de los nuevos casos probablemente sea consecuencia de cambios en el estilo de vida y / o el medio ambiente durante las últimas décadas. Un grupo de factores epigenéticos candidatos son: el consumo de energía en exceso (en particular, ácidos grasos saturados, bebidas azucaradas y alimentos con almidón) y un menor consumo de fibra, en combinación con un estilo de vida más sedentario, es decir, con menor trabajo muscular, hábitos propicios para desarrollar obesidad.

Los factores psicosociales también pueden haber contribuido al fuerte aumento de la prevalencia de la DM2, en particular la menor cantidad de horas de sueño y una tendencia al estado de ánimo depresivo. Otro factor de riesgo que aumenta de prevalencia es la edad, así como aunque en menor medida, infecciones repetidas y tabaquismo³⁴.

La naturaleza genética predisponente ha sido sugerida por la altísima concordancia de esta forma clínica en gemelos idénticos y por su transmisión familiar³⁵. Se han reconocido alteraciones genéticas de tipo polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en múltiples genes que explican la etiopatogenia de la misma, por lo cual se la considera dentro de un grupo de patologías llamadas multifactoriales, donde el factor ambiental constituye el evento desencadenante de la patología.

Recientes estudios de asociación de genoma completo (GWAS) condujeron a la identificación de variantes genómicas candidatas a predisponer en ciertos individuos el desarrollo de DM2. Curiosamente algunas de ellas están localizadas en genes conocidos como reguladores de la función y/o desarrollo de la célula pancreática, tales como: HNF4A, TCF7L2, IDE, EXT2 y HHEX. Por lo tanto, estos estudios adjudican a dichas variantes un papel central, y potencialmente causante, de la disfunción de célula β en la DM2³⁶. La hiperglucemia crónica y la dislipemia causan la disfunción de la célula β por medio de la reducción de la expresión de un factor de transcripción PDX1 (Pancreatic duodenal homeobox 1) que juega un rol central en la función y supervivencia de las células pancreáticas³⁷.

La expresión de los genes depende, entre otros mecanismos, de la regulación que se produce a nivel de la “región promotora”, mediante la activación o la inhibición de factores de transcripción que reconocen secuencias específicas en dicha región, a través de una interacción ADN/Proteína. La presencia de SNPs y las modificaciones epigenéticas en la región promotora de un gen, alteran la unión de factores de transcripción a sus respectivas secuencias específicas de reconocimiento.

La epigenética constituye un grupo de modificaciones genéticas que no cambian la secuencia de ADN y es el mecanismo genético que actúa como interlocutor entre la genética y el ambiente (recordemos que las enfermedades multifactoriales como Obesidad, SM y DM2 resultan de la interacción entre susceptibilidad genética y factores ambientales desencadenantes).

Los mecanismos epigenéticos pueden responder entonces, a modificaciones inducidas por el ambiente en enfermedades como Obesidad, SM y DM2.

Es reconocida la influencia no sólo del ambiente uterino en relación al grado de nutrición materna, sino también el tipo de alimentación y actividad física a lo largo de la vida³⁸. De esta manera se presenta a la epigenética como un mecanismo plástico adaptable a las diferentes influencias inducidas por el ambiente, regulando la expresión de genes de una manera potencialmente reversible ante la modificación del disparador ambiental.

Los mecanismos epigenéticos como la metilación de genes en islas CpG pueden influenciar de manera unívoca la expresión de genes ya que podrían inhibir la unión de factores de transcripción al promotor o reclutar proteínas como la desacetiltransferasa (HDACs) y otras co-represoras. Se ha sugerido una relación entre metilación de determinados genes y DM2, aunque estos mecanismos están pobremente entendidos. Sin embargo, la epigenética puede estar jugando un rol importante en la creciente incidencia de DM2³⁹.

Existen múltiples sitios CpG plausibles de metilación en las primeras 1300 pb del promotor de IL-1 β , pero solo existe un trabajo en el cual se estudian modificaciones epigenéticas por metilación que pueden alterar (en minutos u horas) la expresión del gen⁴⁰. Por otro lado, no han sido exploradas las variantes genéticas y epigenéticas de este gen que modulan estos mayores niveles de expresión observados en los individuos con DM2.

Cabe destacar, que las personas con DM2 constituyen un grupo heterogéneo, por lo cual los objetivos del tratamiento deben ser individualizados. Una mejor comprensión de los aspectos fisiopatológicos, a partir de los hallazgos de las bases genéticas de estas enfermedades, mejorará la identificación precoz de individuos con alto riesgo para estas entidades, facilitando así su prevención, además de la identificación de grupos de individuos con características fenotípicas comunes.

Por otro lado, se favorecerá el desarrollo de nuevas drogas que evitarán los frecuentes fracasos, orientando la estrategia terapéutica en forma personalizada (Farmacogenética). Se producirá, de esta manera, un impacto beneficioso no sólo en la calidad de vida de los individuos afectados, sino que también se evitarán gastos innecesarios, permitiendo una reducción significativa en los costos de Salud Pública.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVO GENERAL

La hipótesis del actual trabajo de investigación se fundamenta en la influencia que la hiperglucemia pueda ejercer en la modificación de la expresión de genes responsables de la respuesta inflamatoria, a través de modificaciones epigenéticas en regiones promotoras del gen IL-1 β , en pacientes con DM2.

No hay estudios clínicos que hayan explorado esta hipótesis, correlacionando los niveles circulantes y los niveles de expresión de IL-1 β en células mononucleares de sangre periférica con modificaciones epigenéticas en la región promotora del gen, en pacientes con DM2 metabólicamente descompensados (hiperglucémicos).

En este estado de inflamación, la IL-1 β es la citoquina inflamatoria que ha demostrado mayor acción en el deterioro de los mecanismos fisiopatológicos más frecuentes en la progresión a DM2, como son la resistencia a la insulina y la disfunción de la célula β .

Es importante destacar que es inédita la correlación de estos aspectos funcionales de citoquinas proinflamatorias con estudios epigenéticos del gen de la IL-1 β .

Por lo tanto es de singular importancia el estudio de los niveles circulantes de IL-1 β así como la expresión de IL-1 β en mononucleares, además del análisis que sobre esa expresión puedan realizar el correspondiente índice de metilación en la región promotora del gen IL-1 β , en pacientes con DM2.

Además de explorar la influencia de los cambios epigenéticos sobre la expresión del gen IL-1 β , nos proponemos analizar su posible reversión ante medidas de intervención como los cambios en el estilo de vida para comprender la influencia de la hiperglucemia sobre el índice de metilación específica en el gen de IL-1 β , analizando los alcances que la hiperglucemia pueda tener sobre su expresión.

La hipótesis se sustenta en los siguientes pilares conceptuales:

1. La inflamación subclínica sistémica se ha constituido en uno de los principales mecanismos fisiopatológicos que determina el desarrollo de DM2.
2. La IL-1 β es una de las citoquinas inflamatorias, que ha demostrado mayor acción en el deterioro de la función de la célula β en la progresión a DM2.
3. El aumento tanto de los niveles circulantes de IL-1 β como la expresión de IL-1 β en células mononucleares de sangre periférica ha sido comprobada en pacientes con DM2. Más aún, estos niveles de IL-1 β se correlacionan con la concentración de glucemia en ayunas.

4. Pacientes tratados con IL-1Ra, antagonista de la IL-1 β , han revertido la disfunción β celular.
5. Los estudios incipientes de epigenética en DM2, están demostrando la asociación de estos mecanismos genéticos con la enfermedad.
6. No se ha explorado en estudios epidemiológicos de individuos con DM2 la asociación de modificaciones epigenéticas (en particular el índice de metilación) en la región promotora del gen de IL-1 β con sus niveles circulantes y sobre la expresión de IL-1 β .
7. No se ha explorado la influencia de la hiperglucemia significativa sobre la metilación y expresión de genes como IL-1 β .
8. No se ha explorado la potencial influencia de los cambios en el estilo de vida en la metilación y expresión de IL-1 β .

2.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS

En pacientes descompensados con DM2 de reciente diagnóstico, y a los 6 y 12 meses de obtenida su compensación metabólica, se propone analizar el impacto de la hiperglucemia sobre la

1. expresión del gen IL-1 β
2. metilación de la región promotora del gen IL-1 β

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ENROLAMIENTO

Se realizó un estudio prospectivo controlado para evaluar la expresión y metilación de IL-1 β en pacientes con DM2 que recibieron un tratamiento farmacológico y cambios en el estilo de vida., donde el mismo paciente es usado como control pre y post-intervención.

Se reclutaron 30 pacientes con DM2 de reciente diagnóstico, con descontrol metabólico caracterizado por la determinación de hemoglobina glicosilada (Hb A1c) mayor a 8%, los cuales constituyen el grupo pre-intervención (0 meses). Estos pacientes fueron sometidos a un tratamiento con medidas higiénico-dietéticas, evaluándose en cada caso la necesidad de tratamiento con drogas antidiabéticas orales de primera elección, con el objetivo de lograr la compensación metabólica, comprobada por una disminución del valor de Hb A1c a un 7% o menor. Se obtuvieron muestras de todos los pacientes luego de 6 y 12 meses de tratamiento, los cuales componen los grupos post-intervención. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Clínicas “José de San Martín” y todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito.

3.1.1. Criterios de inclusión: ser nativo argentino caucásico de ambos sexos, adulto no emparentado, de 30 a 70 años de edad, sano previo, sin antecedentes personales de diabetes o patologías asociadas previas exceptuando la posible existencia de hipertensión, dislipidemia y/o sobrepeso/obesidad, y residente en áreas urbanas de Buenos Aires (C.A.B.A. o conurbano bonaerense).

3.1.2. Criterios de exclusión: cualquier patología (exceptuando factores de riesgo cardiovasculares), embarazo, antecedentes psiquiátricos, enolismo, toxicomanía, antecedentes o sospecha de pancreatitis, ingestas recientes (<3 meses) de hiperglucemiantes (v.g. glucocorticoides), inestabilidad en el peso corporal (pérdida de >3 kg en los últimos 6 meses).

3.1.3. Cambios en el estilo de vida: Estudio prospectivo, controlado (el mismo paciente como control pre y post intervención), de intervención, con un tiempo de “wash out” de posibles tratamientos dietarios previos de 2 semanas, para el ingreso al protocolo.

3.2. MODELO TERAPÉUTICO DE INTERVENCIÓN

Plan Alimentario de moderada restricción calórica: se indicó realizar durante 6 meses una dieta de hasta un 20 % menos del Requerimiento energético diario, con el objetivo de lograr una disminución del 10 % del peso inicial luego de los tres meses de intervención. Consistió en una dieta con distribución de 50% de la energía como hidratos de carbono de bajo índice glicémico, 20% como proteínas y el 30% restante como grasas así como modificación de hábitos alimentarios. Cada participante de este grupo concurre al consultorio para controles clínicos y antropométricos, revisión del plan alimentario, además de la valoración de la adherencia al tratamiento. En cada visita se realizó una evaluación antropométrica, se evaluó de los resultados de laboratorios solicitados, refuerzo de pautas de estilo de vida saludable enfatizando la actividad física y de alimentación adecuada.

Pautas sobre modificaciones conductuales y cambios en el estilo de vida: en particular disminuyendo las actividades sedentarias e incrementando la actividad física en forma regular (recomendación actual de 40 min 3 veces por semana de actividad física de intensidad moderada). Concluido el periodo de intervención, los participantes fueron citados nuevamente a la Unidad Metabólica para obtener nuevas muestras de sangre (post intervención) para la evaluación, clínica, antropométrica y bioquímica.

Tratamiento farmacológico: Se indicó en la mayoría de los pacientes tratamiento con Metformina, la cual es la droga utilizada en la primera etapa de tratamiento en la gran mayoría de los pacientes a los que se les diagnostica DM2. Sólo tres pacientes recibieron insulina para lograr el objetivo de control metabólico.

3.3. FENOTIPIFICACIÓN CLÍNICA

Se tomaron datos de edad y sexo, datos demográficos (origen étnico, etc.), antecedentes neonatales y familiares de alteraciones metabólicas asociadas a DM2 y tabaquismo. Se realizaron determinaciones clínicas: presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) y antropométricas: peso, talla y circunferencia de cintura (CC) mediante protocolos estandarizados. Se calculó el índice de masa corporal (IMC) como $\text{peso [kg]} / (\text{altura [m]})^2$.

Luego de 12 horas de ayuno, se extrajeron muestras de sangre venosa (20 mL) a cada individuo, y se separó el volumen total en 3 alícuotas. Una alícuota de sangre se congeló a -20°C para la extracción de ADN y otra se utilizó para la extracción de ARNm. La alícuota restante se centrifugó para la obtención de suero y realización de pruebas serológicas.

Se determinaron los niveles de glucemia sérica en ayunas (método de glucosa-oxidasa (GLU glucosa GOD-PAP, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), en un auto-analizador Hitachi 727 (Hitachi, Tokio, Japón), insulinemia (electroquimioluminiscencia con un kit comercial Insulina, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), en un equipo Cobas E411 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), urea (Método: Enzimático Automatizado), creatinina (Método: Owen Automatizado), triglicéridos (TG, Método: Enzimático Automatizado), colesterol total (CT). Las concentraciones de colesterol de lipoproteínas de baja densidad (C-LDL) y de alta densidad C-HDL fueron medidas utilizando métodos de precipitación selectiva. Se determinó el C-HDL aisladas en el sobrenadante obtenido luego de la precipitación selectiva de las lipoproteínas con apo B utilizando reactivo precipitante 0,44 mmol/l ácido fosfotúngstico en presencia de iones magnesio. Se evaluó el nivel de C-LDL como la diferencia entre el CT y el colesterol contenido en el sobrenadante, obtenido después de la precipitación selectiva de LDL con 10 g/l polivinil sulfato en polietilenglicol (600 Da; 2,5% P/V; pH 6,7).

El hemograma se realizó mediante un contador hematológico. La HbA1c se determinó mediante el método inmunoturbidimétrico en un sistema Architect, con calibradores y controles que se correlacionaron con el programa nacional de estandarización en los Estados Unidos (NGSP e IFCC).

3.4. FENOTIPIFICACIÓN DE MARCADORES INFLAMATORIOS PERIFÉRICOS

Las concentraciones séricas de IL-1 β se midieron en suero almacenado a -80°C por el método de quimioluminiscencia, con una sensibilidad de 1,5 pg/ mL y un intervalo de determinación de 1,5-1.000 pg/mL.

Los niveles séricos de proteína C reactiva ultrasensible (PCR-us) se midieron utilizando inmunonefelometría (Cardio Phase® hsCRP, Siemens) en un Nefelómetro Siemens BN (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, EE.UU.). Consideramos que los valores de PCR us > 10 mg / l representan una respuesta inflamatoria aguda⁴¹.

3.5. GENOTIPIFICACION DE SNPs

En estos 30 individuos se realizó la genotipificación de un SNP ubicado en la región promotora del gen de IL-1 β , en la cual puede existir una sustitución de una Timina ancestral (T) por una citosina (C) en la posición nucleotídica -511 (rs16944, NC_000002.11:g.113594867A>G, NC_000002.12:g.112837290A>G, NG_008851.1:g.4490T>C, NM_000576.2:c.-598T>C).

Se extrajo el ADN de sangre periférica, de todos los individuos reclutados, con el método que utiliza cetiltrimetilamonio (CTAB) (Gustincich, Manfiolett, Del Sal, Schneider y Carninci, 1991.), se cuantificó con el Fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) y se prepararon diluciones de 3,3 ng/ μ l. Las muestras de ADN se enviaron a LGC Genomics (<http://www.lgcgroup.com>) en el Reino Unido y el genotipado del SNP fue realizado por KASP (Kompetitive Allele Specific PCR).

3.5.1 Purificación de ADN por la técnica de CTAB

1. A partir de 600 μ l de sangre entera, realizar 2 lavados con T10E10 (Tris 10mM, EDTA 10mM), centrifugar 5 minutos a 12000 rpm. (descartar el sobrenadante por volcado).
2. Agregar 600 μ l (900ul) de CTAB (disgregando bien el pellet para aumentar el rendimiento).
3. Incubar por 2 hs hasta que termine de disgregarse el pellet a 60 °C u O.N. a 37 °C (agitando cada 15' para facilitar la disgregación).
4. Realizar 2 extracciones con 1 vol de IAC (cloroformo/ isoamílico 24: 1), y centrifugar por 5' a 12000 rpm para separar las fases.
5. Tomar la fase acuosa superior y precipitar el ADN con 1 vol de isopropanol.
6. Incubar por 2hs a -20 °C para facilitar la precipitación del ADN.
7. Centrifugar por 15 minutos a 12000 rpm, descartando el sobrenadante.
8. Secar el ADN en estufa a 37°C por 5 minutos.
9. Resuspender en cantidad necesaria de agua bidestilada.
10. Realizar una electroforesis en gel de agarosa para control de calidad de 5 ul de ADN.
11. Cuantificar en espectrofotómetro para determinar la concentración en ng/ μ l.

Solución de CTAB (Bromuro de cetil hexadecil trimetil amonio, C19 H42 N Br)

CTAB	2,0 %
CINa (3M)	1,4 M
EDTA (0,5M)	20mM
Tris (2M)	100mM
B mercaptoetanol	0,2 %

3.5.2 Electroforesis en geles de agarosa

Preparación del gel de corrida:

1. Pesar la cantidad de agarosa necesaria según la concentración final requerida.
2. Mezclar con el volumen necesario de buffer TBE 1X.
3. Disolver calentando en horno de microondas o en baño maría.
4. Dejar entibiar la solución y agregar solución de bromuro de etidio de tal forma de llegar a una concentración final de 0,5µg/mL. (Solución stock de bromuro de etidio: 10mg/mL en agua destilada)
5. Volcar en la cuba preparada a tal efecto con el/los peine/s puesto/s.
6. Dejar solidificar.
7. Sumergir el gel en la cuba de electroforesis conteniendo buffer de corrida TBE 1X en cantidad suficiente para cubrirlo.
8. Retirar el/los peine/s con cuidado para no romper las calles.

Solución stock de TBE 10X:

108gr de tris base	40mL de EDTA 0,5M pH=8,0
55gr de ácido bórico	csp volumen final 1L con agua destilada

Preparación de las muestras para siembra en geles:

1. Para visualizar ADN genómico: mezclar 5µl de la muestra con 5µl de agua y 2µl de buffer de siembra.
2. Para visualizar productos de PCR: mezclar 10µl de muestra con 2µl de buffer de siembra.
3. Realizar un spin de las muestras preparadas.
4. Sembrar todo el volumen preparado (12µl) en una calle libre del gel.

Buffer de siembra 6X:

30% de glicerol en agua
0,25% de azul de bromofenol

3.5.3 PCR competitiva alelo-específica

Esta técnica permite la identificación bialélica de un único nucleótido en un loci específico. Por lo tanto, es una técnica de elección para identificar los polimorfismos de una sola base (SNPs). La tecnología KASP (Kompetitive Allele Specific PCR) es una plataforma de genotipado de SNPs uniplex, desarrollada por LGC Genomics, que utiliza una PCR competitiva alelo-específica para identificar polimorfismos de un solo nucleótido.

El ensayo KASP se realiza con dos *primers forward* y un *primer reverse*, dos cassettes FRET (transferencia de energía de resonancia fluorescente) universales (FAM y HEX), colorante de referencia pasivo ROX, polimerasa Taq, nucleótidos libres y MgCl₂ en una solución buffer optimizada. Las secuencias de los *primers* son específicas para el SNP a analizar, y fueron diseñadas por LGC Genomics. La discriminación bialélica se logra mediante la vinculación competitiva de dos *primers forward* específicos para cada alelo y un *primer reverse* común. Cada *primer forward* incorpora una secuencia de cola adicional marcada con uno de los dos fluoróforos utilizados para diferenciarlos.

Una vez que se completaron las reacciones KASP y se midió la fluorescencia resultante, y los datos fueron procesados para permitir asignar los genotipos a cada muestra de ADN

3.6. ESTUDIOS EPIGENÉTICOS.

ANÁLISIS DE LA METILACIÓN EN EL PROMOTOR DEL GEN DE IL-1 β

3.6.1 Tratamiento de conversión con bisulfito de sodio

Una alícuota de ADN purificado (400 ng) se desnaturalizó a 98°C por 10 minutos, se modificó químicamente por tratamiento con bisulfito de sodio a 64°C por 2.5 horas, y luego se purificó usando el kit Methyl Code bisulfite conversion kit (Invitrogen). De esta manera se convirtieron las citosinas no metiladas en uracilos mientras que las citosinas metiladas quedaron sin cambios (**Figura 1**).

Protocolo del Tratamiento con bisulfito de sodio

Preparación del reactivo de conversión de CT.

1. Resuspender con 900 μ l de agua destilada estéril, 50 μ l de Tampón de resuspensión y 300 μ l de tampón de dilución
2. Mezclar por agitación breve intermitente 10 minutos.
3. Mantener protegido de la luz a temperatura ambiente (20 ° -30 ° C) hasta su uso

Cada tubo proporciona suficiente reactivo para 10 tratamientos de ADN. Para mejores resultados, se usó el reactivo inmediatamente después de su preparación.

4. Descongelar a temperatura ambiente y mezclar durante 2 minutos girando o agitando en vórtex antes de usar.

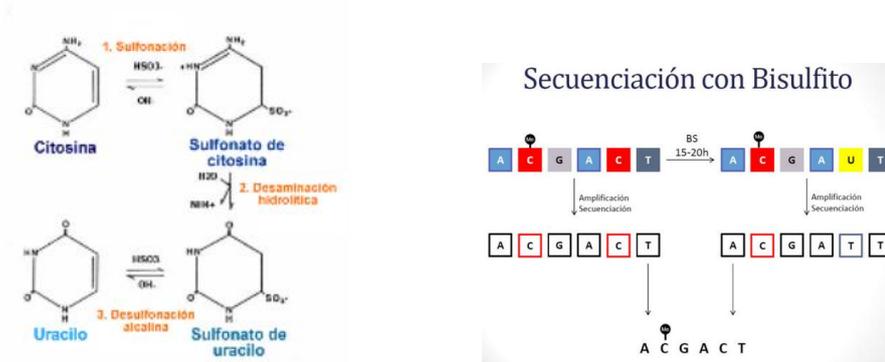


Figura 1: Análisis de metilación de CpG. La desaminación de las citosinas no metiladas por tratamiento con bisulfito de sodio (BS) genera uracilo y permite distinguir a las citosinas 5-metiladas que no sufren cambio, por el método de secuenciación.

Protocolo de conversión de bisulfito

Procedimiento

1. La cantidad de ADN por tratamiento puede variar de 500 pg a 2 μg . Una cantidad óptima es 200-500 ng.
2. Si es necesario, agregue agua destilada estéril a la muestra de ADN para subir el volumen a 20 μl .

En un tubo de PCR, agregar 130 μl de reactivo de conversión de CT a la muestra de ADN de 20 μl . Mezclar moviendo el tubo o pipeteando arriba y abajo.

3. Programa de ciclado (Termociclador Maxygene, Axygene)

- 98 ° C durante 10 minutos (desnaturalización del ADN)
- 64 ° C durante 2.5 horas (conversión de bisulfito)
- 4 ° C de almacenamiento por hasta 20 horas

4. Colocar una Columna en un Tubo de Colección y agregar 600 μl de tampón de unión a la columna.
5. Agregar la muestra del Paso 3 al Buffer de Enlace en la columna. Cerrar la tapa y mezclar invirtiendo varias veces.
6. Centrifugar a velocidad máxima ($\geq 10,000 \times g$) durante 30 segundos. Desechar el flujo continuo.

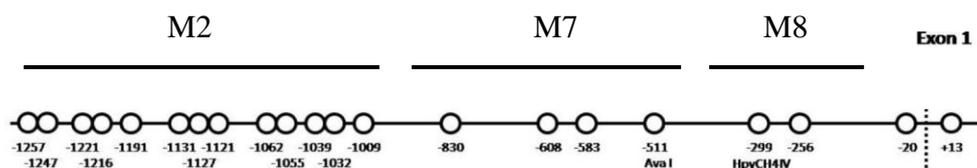
7. Agregar 100 μl de tampón de lavado preparado con etanol a la columna, y centrifugar a velocidad máxima durante 30 segundos. Desechar el flujo continuo.
8. Agregar 200 μl de tampón de desulfonación a la columna y dejar que la columna repose a temperatura ambiente durante 15- 20 minutos.
9. Centrifugar a velocidad máxima durante 30 segundos. Descartar el flujo continuo.
10. Agregar 200 μl de tampón de lavado con etanol a la columna y centrifugar a velocidad máxima durante 30 segundos. Descartar el flujo continuo.
11. Repetir el lavado en el Paso 10 una vez más, luego transferir la columna giratoria a un tubo de microcentrífuga de 1.5 μl nuevo y limpio.
12. Agregar 10 μl de tampón de elución directamente a la columna matriz. Centrifugar a velocidad máxima durante 30 segundos para eluir el ADN.

El ADN está listo para su análisis inmediato o puede almacenarse a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o menos. Se utilizan de 2-5 μl del ADN para cada PCR.

3.6.2 Amplificación específica por PCR de secuencias del promotor

Luego de este tratamiento se amplificaron las regiones promotoras de interés, mediante PCR usando *primers* específicos para el gen en estudio y su posterior secuenciación. Existen 20 sitios CpG plausibles de metilación en las primeras 1200 pb del promotor de IL-1 β , por lo cual se utilizaron *primers* específicos para amplificar las regiones que los flanquean.

El análisis de metilación del promotor se inició con el método de secuenciación de Sanger del ADN bisulfitado con los *primers forward* y *reverse* diseñados por Hashimoto y cols.⁴⁰, para amplificar las zonas de interés, y luego se utilizaron ambos *primers* para realizar la secuenciación e identificar las zonas con variaciones en la metilación de CpGs.



Los *primers* específicos permitieron el análisis de tres zonas que comprenden el promotor del gen IL-1 β , según se detallan en la **Tabla 1** (se mantuvo la identificación utilizada en el trabajo de Hashimoto y cols.⁴⁰).

Protocolo de amplificación de productos de PCR

REACTIVO (CONCENTRACIÓN)	CANTIDAD (CONCENTRACIÓN FINAL)
Buffer 5X	4,0 µL (1x)
dNTPs (10mM de cada dNTP)	dNTPs (200µM cada dNTP)
Primers F+R (50 pmoles/µL de cada primer)	Primers F+R (10 pmoles/µL de cada primer)
EpiMark® Hot Start Taq DNA Polymerase (NEB) (5.000U/mL)	0,1 µL (1U)
Agua	9,8 µL
ADN bisulfitado	5,0 µL (1µg)
Volumen final	10,0 µL

Para la amplificación de cada fragmento se realizaron dos reacciones de PCR sucesivas, en un principio con los *primers* externos (*OUT*) y luego con los *primers* internos (*IN*). Se deben considerar que las diferencias de protocolo implican que en la segunda amplificación se utilizaron 5µl de producto de PCR (400ng) para realizar la amplificación. Además, para cada juego de *primers* se utilizaron temperaturas de anelling específicas, como figuran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. *Primers* de amplificación de secuencias del promotor de IL-1 β

<i>Primers</i>	Secuencias (5'-3')	Localización relativa al inicio de transcripción	Tamaño producto de PCR
IL1BM2-out-F	GAATTAGGAGGGTAAGGTTTTAAT		
IL1BM2-out-R	AACAAATCTACATCATAACACTTTTT	-1312 to -949	364pb
IL1BM2-in-F	TTTGTAATTTAATATTTGGGAGGT		
IL1BM2-in-R	TTTTTAAACAAAATCTCACTCTATC	-1244 to -983	269pb
IL1BM7-out-F	TTGTGTGAGTTTATTTTTAGGGTTGT		
IL1BM7-out-R	TAAAAACCAATAACCCCTCCCTATC	-642 to -440	203pb
IL1BM7-in-F	GTTTATTTTAGGGTIGTTTTAATT		
IL1BM7-in-R	AAATCTCTACCTAAATACTATTCTCTACC	-634 to -479	156pb
IL1BM8-out-F	TTTAAATTTAAGTATAAAGAAGTGAATGA		
IL1BM8-out-R	TCATAAAAAACAAAAATAACAAACTA	-404 to -173	232pb
IL1BM8-in-F	AAATTTGTGTGTTTTTATTTTGTTTTATA		
IL1BM8-in-R	CACCATACAAATATACATTATTTTCCTAA	-355 to -222	134pb

En todos los casos se verificó el tamaño del amplicón mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%.

Programa de ciclado (Termociclador Maxygene, Axygene)

30 segundos, 95°C	}	5 ciclos
30 segundos, 95°C		
45 segundos, 57°C		
1 minuto, 68°C	}	25 ciclos
30 segundos, 95°C		
45 segundos, 62°C		
1 minuto, 68°C		
5 minutos, 68°C		

Debido a que la nomenclatura de secuencias fue replanteada a nivel internacional en 2007⁴², corregimos la numeración para cada posición CpG teniendo en cuenta el sitio de inicio de la traducción. Por ello, difieren de los presentes en la publicación de Hashimoto⁴⁰ (respecto al sitio de inicio de la transcripción). Los resultados de los estudios de metilación de las CpG, llevan la numeración que considera el sitio de inicio de la traducción.

Secuencia del promotor de IL-1 β

A continuación, se detalla el promotor del gen en estudio, donde se señalan los sitios CpG y sus posiciones según las nomenclaturas que tienen en cuenta:

- Posición con respecto a inicio de transcripción

- Posición con respecto a inicio de traducción

```

-2010 gagcagcagatacctggcacataactaatttgaataaaaaatgctgtcaaattcccattcacc
-1950 attcaagcagcaaaactctaccacctgaatgtacatgccaggcactgtgctagacttggct
-1890 caaaaagatttcagtttctctggaggaaccaggaggagcaaggtttcaactcagtgctata
          -1259      -1249                                -1221
          -1809      -1799                                -1771
-1830 agaagtgttacaggctggaca cggtggctcagcctgtaatcccaacactttgggaggcc
          -1216                                -1191
          -1766                                -1741
-1770 gaggcgggcagatcacaaggctcaggagat cgagaccatcctggctaacatggtgaaacc
          -1131 -1127 -1121
          -1681 -1677 -1671
-1710 tgtcttactactaaaaatacaaaaaattagc cgggcgtgg cggcagggtgcctgtagtcccag
          -1063 -1056
          -1613 -1606
-1650 ctgctggggaggctgagggcaggagaatggtgtgaacc cgggaggcggaacttgcaggggg

```

-1039 -1033 -1009
 -1589 -1583 -1559
 -1590 ccgagatcgtgcccactgcactccagcctgggacagagtgagactctgtctcaaaaaaa
 -1530 aaaaaaagtgttatgatgcagacctgtcaagaggcaaaggagggtgttcctacactcc
 -1470 aggcactgttcataacctggactctcattcattctacaaatggagggctcccctgggcag
 -1410 taccctggagcagcactttgctgggtgtctcggttaagagaaactgataactcttgggtt
 -1350 ggtattaccaagagatagagtctcagatggatattcttacagaaacaatattccactttt
 -1290 cagagttcaccaaaaaatcattttaggcagagctcatctggcattgatctggttcatcca
 -1230 tgagattggctagggtaacagcacctggctctgcagggttgtgtgagcttatctccaggg
 -608 -583
 -1170 ttgccccaaactcgtcaggagcctgaaccctgcataccgatatgttctctgccccagccaa
 -511
 -1110 gaaaggtaattttctcctcagaggctcctgcaattgacagagagctctgagggcagaga
 -1050 acagcacccaaggtagagaccacacctcaatacagacagggagggtattggccttc
 -990 attgtaccattttatccatctgtaagtgggaagattcctaaacttaagtacaaagaagtg
 -930 aatgaagaaaagtatgtgcatgtataaatctgtgtgtcttccactttgtcccacatatac
 -299
 -849
 -870 taaatttaaacattcttctaaacgtgggaaaatccagtattttaatgtggacatcaactgc
 -256
 -806
 -810 acaacgattgtcaggaaaacaatgcatatgtgcatgggtgatacatttgcaaatgtgtca
 -750 tagtttgctactccttgccttccatgaaccagagaattatctcagtttattagtcctc
 -690 ccctaagaagcttccaccaataactcttttccctttcctttaacttgattgtgaaatca
 -630 ggtattcaacagagaaatttctcagcctcctacttctgcttttgaaagccataaaaaacag

INICIO DE LA TRANSCRIPCIÓN



-570 ctaggggagaaactggcagataccaaacctcttcgaggcacaaggcacaacaggctgctct
 -510 gggattctcttcagccaatcttcattgctcaagtatgactttaatcttcccttacaactag
 -450 gtgctaagggagtctctctgtctctctgcctctttgtgtgtatgcatattctctctctct
 -390 ctctcttcttctctctgtctctctccctctccttccctctctgctccctctctcagctttt
 -330 tgcaaaaatgccagggtgtaataataatgcttatgactcgggaaatattctgggaaatggata
 -270 ctgcttatctaacagctgacaccctaaagggttagtgtaaagcctctgctccagctctcc
 -210 tagccaatacattgctagttgggggttgggttagcaaatgcttttctctagaccctaaagg
 -150 acttctctttcacacattcattcattactcagagatcatttctttgcatgactgccatg
 -90 cactggatgctgagagaaatcacacatgaacgtagccgtcatggggaagtcactcatttt
 -30 ctctttttacacaggtgtctgaagcagccatggcagaagtacctgagctcgccagtgaa
 31 atgatggcttattacaggtc



INICIO DE LA TRADUCCIÓN

3.6.3 Secuenciación por Sanger de las secuencias del promotor

Para la identificar los sitios con variaciones en los porcentajes de metilación de cada CpG, se utilizó el método de secuenciación automática de ADN por Sanger (Macrogen Inc).

Purificación de productos de PCR

Se evaluó la concentración de los productos amplificados por PCR a través de electroforesis en geles de agarosa al 2%. Los productos se purificaron con el kit “Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel band Purification kit” (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)

Procedimiento

1. Sembrar 100µl del producto de PCR en un gel de agarosa al 2%.
2. Observar los fragmentos en un transiluminador UV (BTS-20.S Uvitec Limited) y cortar con un bisturí la región que contiene el fragmento a purificar.
3. Tomar el bloque de agarosa cortado y colocarlo en un tubo eppendorf pesado previamente.
4. Pesar el tubo con el fragmento de gel y calcular el peso del fragmento por diferencia.
5. Agregar buffer de captura según corresponda:
 - a. para geles >2% se utilizan 60µl de Buffer cada 10mg de gel.
 - b. para geles <2% se utilizan 30µl de Buffer cada 10mg de gel.
6. Incubar a 60°C por 20 minutos homogeneizando cada 3 minutos.
7. Colocar en una columna de purificación dispuesta en un tubo.
8. Centrifugar 30 segundos a 13.000 rpm y descartar el filtrado.
9. Agregar 500µl de “Solución de lavado” e incubar 1 minuto.
10. Centrifugar 30 segundos a 13.000 rpm y descartar el filtrado.
11. Agregar 50µl de H₂O bidestilada estéril e incubar 1 minuto a temperatura ambiente.
12. Centrifugar 2 minutos a 13.000 rpm y conservar el eluido con la muestra a -20°C.

Reacción de Secuenciación automática de Sanger

Los productos purificados se enviaron a secuenciar con *primers* forward y reverse en ABI PRISM™ 3130XL Genetic analyzer (Applied Biosystems, Soul, Korea). Los electroferogramas se sometieron a análisis bioinformáticos y se compararon con la secuencia de referencia (ChromasPro 2.6.5, ClustalW Multiple Alignment).

3.6.4 Secuenciación por Pirosecuenciación de las secuencias del promotor

Para la cuantificación de los porcentajes de metilación observados para cada CpG, se utilizó el método de pirosecuenciación ya que es un método de secuenciación de ADN basado en la monitorización a tiempo real de la síntesis de ADN. La pirosecuenciación de ADN bisulfitado permite un análisis cuantitativo y preciso de la metilación basándose en la secuenciación por síntesis.

A diferencia de la secuenciación por Sanger, que se basa en dideoxinucleótidos terminadores, ésta técnica utiliza una mezcla de cuatro enzimas, y se fundamenta en la detección de la liberación de pirofosfato tras la incorporación de cada nucleótido en una cadena de ADN. El método se basa en la detección luminométrica del pirofosfato liberado, observándose señales de luz proporcionales (equimoleculares) al número de nucleótidos incorporados (**Figura 2A**). Por lo tanto, la pirosecuenciación consiste en la extensión de un *primer* sobre una cadena simple de ADN, de modo que la incorporación de cada nucleótido genera una intensidad de luz proporcional a la cantidad de nucleótidos incorporados. En el caso del estudio de la metilación de CpGs, y debido a que el tratamiento con bisulfito genera un polimorfismo C/T en los sitios CpG (C = alelos metilados; T = alelos no metilados), la pirosecuenciación permite cuantificar el porcentaje de metilación en cada sitio CpG en una región de alrededor de 50 pares de bases⁴³⁻⁴⁵ (**Figura 2B**).

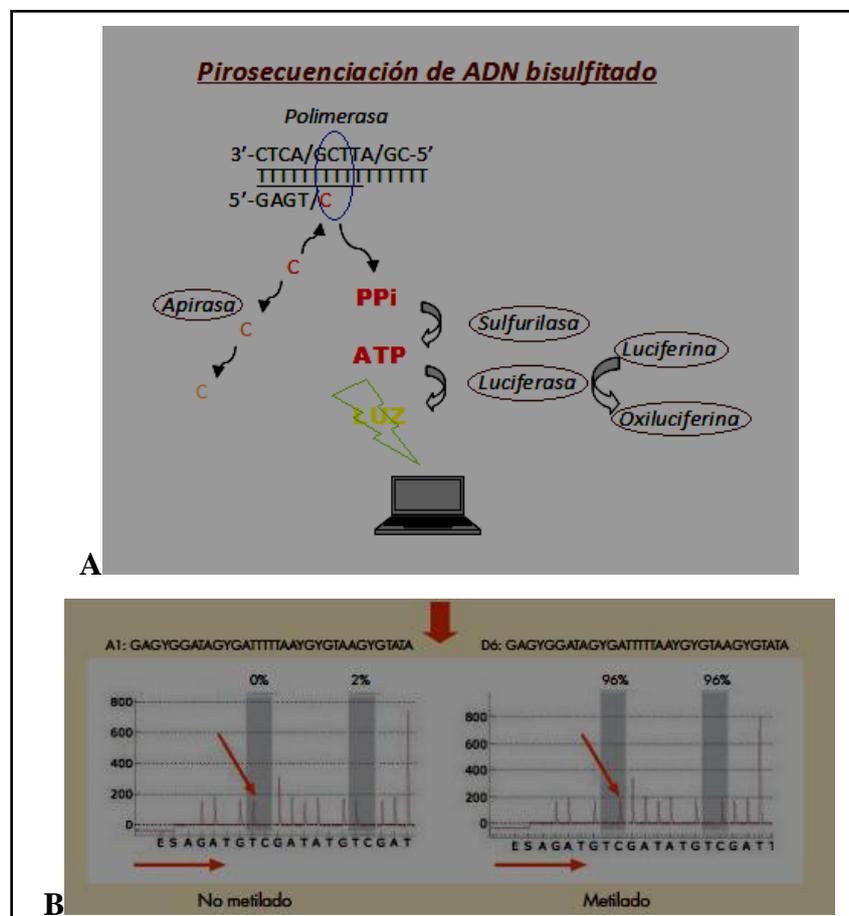


Figura 2: Método de pirosecuenciación de ADN bisulfitado. A. Reacciones implicadas en el método.

B. Pirogramas para determinar el porcentaje de metilación.

Para ello se diseñaron *primers* específicos con el Pyrosequencing software de Geneious (Biomatters Ltd, New Zealand) para las mismas regiones identificadas por Hashimoto y cols⁴⁰; pero que resultaron óptimos para su utilización para este método.

Uno de los *primers* se modificó en su extremo 3' con biotina de manera que pueda ser unida a esferas de sefarosa, se prepararon duplicados de cada placa, se desnaturalizó el ADN, luego se hibridó con el *primer* de secuenciación y se realizó la secuenciación en el equipo Pyromark 96 MD (Qiagen, Valencia, CA, USA).

A continuación, en la **Tabla 2** se indican los *primers* de amplificación utilizados para estudiar las mismas zonas identificadas por Hashimoto y cols⁴⁰, y en este caso además se diseñaron *primers* para permitir la secuenciación para cada uno de los fragmentos.

Debido a que esta técnica permite secuenciar solo pequeños fragmentos, se diseñaron diferentes *primers* de secuenciación en particular para la región M2 que comprende una región extensa con 11 sitios plausibles de metilación. De esta forma se pudo determinar con mejor exactitud el porcentaje de metilación de los sitios CpG.

Tabla 2. Primers de amplificación y de secuenciación para el análisis de metilación del promotor de IL-1 β

IL-1 β Región M2

F: AGGTTTAAATTTAGTGTTATAAGA

R: ATAAAAACACCCTCCTTAC (Biotinilado)

Primer de secuenciación A: GTTTTATTTAAAAATATAAAAAATT (*primer forward*)

Secuencia a analizar A:

AGT**Y**GGG**Y**GTGG**Y**GGTAGGTG**TT**TGTAGT**TTT**AG**TTG**TTGGGGAGG**TT**GAGG**TA**
GGAGAATGGTGTGAAT**TY**GGGAGG**Y**GGAATTTGTAGGGGG**TY**GAGAT**Y**GTG**TT**
ATTG**TA**TTT**AG**TTTGGG**Y**GATAGAGTGAGATTTTGT**TT**AAAA

Primer de secuenciación B: AGGAGAATGGTGTGA (*primer forward*)

Secuencia a analizar B:

AT**TY**GGGAGG**Y**GGAATTTGTAGGGGG**TY**GAGAT**Y**GTG**TT**ATTG**TA**TTT**AG**TTT**G**
GG**Y**GATAGAGTGAGATTTTGT**TT**AAAA

IL-1 β Región M7

F: TATTTATGAGATTGGTTAGGGTAATAG

R: AAAAAAAATTAACCTTCTTAACT (Biotinilado)

Primer de secuenciación: AGTTTATTTTTAGGGTTGTTTTAA (*primer forward*)

Secuencia a analizar:

TT**Y**G**TT**AGG AG**TT**TGAATTT**TG**TATAT**Y**GTATGTT**TT**TG**TTTT**AG**TT**AAGAA

IL-1 β Región M8

F: TAGAGAGTTTTTGAGGTAGAGAATAG (Biotinilado)

R: CACATTTACAAATATATCACCATACAAA

Primer de secuenciación: AATATACATTATTTTCCTAACCAATC (*primer reverse*)

Secuencia a analizar: R**TT**AT**ACA**AT**TA**AT**CC**CAC AT**TAAA**ACT**AA**ATTT**CC**

CAC**R**TT**AAA**AA**AT**ATTT**AA**TT**TA**AT**AT**

Como se observa en la **Tabla 2**, las C de los sitios de metilación a analizar, se indican con una Y(C/T) en el caso de la lectura con *primers forward* y una R (G/A) en el caso de la secuenciación con *primer reverse*. Los nucleótidos que figuran en color naranja corresponden a las bases modificadas por el tratamiento con bisulfito. Los *primers* de pirosecuenciación están identificados en la página 21, según el detalle de subrayado que se muestra en la **Tabla 2**.

3.7 Análisis de la expresión del ARN mensajero de IL-1 β

La PCR en tiempo real fue el método de elección para cuantificar la expresión de ARN mensajero ya que constituye uno de los métodos más sensibles y precisos⁴⁶, en particular para las citoquinas, las cuales a menudo están presentes en muy bajos niveles. El análisis de la expresión del ARN mensajero de IL-1 β se llevó a cabo en monocitos de sangre periférica obtenidos de cada individuo para los 3 tiempos de estudio. Se separaron los leucocitos mononucleares de sangre periférica por centrifugación en gradiente de Ficoll y se resuspendieron en Tioisocianato de guanidinio para la posterior extracción de ARN total.

En estas condiciones, las muestras se almacenaron a -80°C por un período de máximo de tres meses, verificándose la integridad del ARN en geles de agarosa 1 %, y eliminando el posible remanente de ADN con un tratamiento de DNase I.

El ARN se retrotranscribió con la enzima retrotranscriptasa del virus de la leucemia murina de Moloney y utilizando hexámeros de ADN como *primers* aleatorios para obtener la primera cadena de ADN complementario (ADNc).

Para la cuantificación relativa de ARNm utilizamos un *método C_t comparativo (método $\Delta\Delta C_t$)* donde fórmulas aritméticas son usadas para calcular los niveles de expresión relativos comparados con otra muestra (en nuestro caso, muestras de pacientes con debut de DM2 antes (B) y después (A) del tratamiento compensatorio).

La expresión génica se analizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real con el software del equipo StepOne. Se utilizaron *primers* específicos para IL-1 β y GADPH mensurando expresión por cuantificación relativa (Método del ΔC_t)⁴⁷⁻⁴⁹ y por el método comparativo de Ct (Método del $\Delta\Delta C_t$)⁵⁰ utilizando como control la expresión del gen de GADPH. El Ct se definió como el umbral del ciclo de la PCR en el cual el producto amplificado es detectado, y los resultados se expresaron como la relación entre el producto y el control. La concentración de la muestra problema, normalizada a un gen constitutivo endógeno relativa a la muestra de referencia está dada por $2^{-\Delta\Delta C_t}$ donde $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ (muestra A) - ΔC_t (muestra B) y $\Delta C_t = C_t$ (muestra) - C_t (housekeeping).

Para que este método sea aplicable fue indispensable verificar que la eficiencia de amplificación del gen problema fuera aproximadamente igual a la del gen *housekeeping*, para lo cual fue necesario realizar la curva estándar para el cálculo de las eficiencias de las amplificaciones de los genes experimentales y del control endógeno, así como la optimización de *primers* y cuantificación por medio de curva estándar (SYBR Green). La muestra utilizada para la curva estándar y la optimización fueron extraídas por el mismo método que las muestras experimentales.

Extracción del ARN total por el método del tiosocianato de guanidinio (TRIzol, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA).

3.7.1 Separación de células mononucleares con Ficoll.

Se siguió el siguiente protocolo:

1. Realizar una dilución al medio de la sangre anticoagulada con solución salina balanceada (PBS ph 7.4, Life technologies). Mezclar con pipeta Pasteur.
2. Agregar 3 mL de Ficoll (Ficoll® Paque Plus, GE Healthcare) a un tubo cónico.
3. Colocar la sangre diluida sobre la superficie del Ficoll con extremo cuidado. Sin mezclar. (Se usa un máximo de 10 mL de sangre diluida, por cada 3 mL de Ficoll; en caso de tener más de 5 mL de sangre, procesar en 2 tubos en paralelo).
4. Centrifugación: 400 g, 20 minutos, 18-20°C.
5. Descartar la fase superior (plasma + plaquetas).
6. Transferir la capa de mononucleares a un nuevo tubo cónico.
7. Lavar con 6 mL de solución salina balanceada (PBS ph 7.4), pipeteando con pipeta Pasteur.
8. Centrifugación: 60-100 g, 10 minutos, 18-20°C.
9. Descartar el sobrenadante.
10. Repetir los pasos 6, 7 y 8.
11. Resuspender en 1,5 mL de Trizol (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). En estas condiciones las células pueden conservarse a -70°C por 3 meses.

3.7.2 Extracción y Purificación del ARN mensajero

1. Incubación del pellet de células resuspendidas en Trizol: 5 minutos a 15-30°C.
2. Agregar 0,3 mL de cloroformo. Agitar a mano por 15 segundos.
3. Dejar reposar por 2-3 minutos, a temperatura ambiente.
4. Centrifugar a <12000g, 15 minutos, 2-8°C.
5. Transferir la fase acuosa (superior) a otro tubo.
6. Agregar 0,75 mL de isopropanol. Mezclar por inversión varias veces.
7. Incubación: 10 minutos, 15-30°C.
8. Centrifugar a <12000g, 10 minutos, 2-8°C.
9. Descartar el sobrenadante.
10. Lavar el pellet con 1,5 mL de etanol 75%.
11. Mezclar con vórtex.
12. Centrifugar a <7500g, 5 minutos, 2-8°C.
13. Secar al aire (en estufa, con el tubo tapado con parafilm agujereado).
14. Resuspender en 30 µL de agua RNAsa free.

3.7.3 Chequeo del ARN en agarosa 1%:

Gel de 35 mL de agarosa 1%:

- 0,35 g agarosa
- 3,5 mL MOPS 10x (Life Technologies)
- 5 µL Gel Red (u otro colorante fluorescente, Genbiotech)
- 31,5 mL agua

Para la cuba de electroforesis: lavar la cuba inmediatamente antes de usar con alcohol etílico y colocar 300 mL de buffer de corrida (MOPS).

Preparación de la Muestra

1. Separar en un tubo 5 µL para la siembra.
2. Incubar por 5 minutos a 60°C.
3. Colocar inmediatamente en hielo.
4. Agregar 5 µL de buffer de siembra para ARN (mantener siempre la relación 1:1).

Realizar la electroforesis durante por lo menos media hora a un voltaje menor a 100 V, para una cuba de 15 cm entre los electrodos.

3.7.4 Tratamiento con DNAsa I (Life Technologies):

Se siguieron las indicaciones del kit DNAsaI Amplification Grade (Life Technologies, Cat. N° 18068015)

Protocolo:

REACTIVO (CONCENTRACIÓN)	VOLUMEN (CONCENTRACIÓN FINAL)
DNAsa I Buffer (5x)	2 µL (1x)
DNAsa I enzima (1U/µl)	2 µL (2U)
ARN	volumen necesario para 2 µg
Agua	cantidad necesaria hasta 20 µL
Volumen final	20µL

Incubación: 15 minutos, temperatura ambiente.

Frenado de la reacción: Agregar 2 uL de EDTA 25 mM. Incubación: 10 minutos, 65°C.

3.7.5 Retrotranscripción

Se realizó la síntesis de la primera hebra del ADN complementario (cDNA) por retrotranscripción del ARN utilizando hexámeros de random priming.

RT-PCR:

Protocolo:

REACTIVO (CONCENTRACIÓN)	VOLUMEN (CONCENTRACIÓN FINAL)
ARN tratado con DNAsa I	2 µL (500 ng)
Hexámeros (Life Technologies) (500 ng/µL)	0,5 µL (1.5µg)
dNTPs (10 mM)	2 µL (500 µM de cada uno)

Incubación: 5 minutos, 65°C, realizar un spin y mantener en hielo hasta realizar la PCR.

REACTIVO (CONCENTRACIÓN)	VOLUMEN (CONCENTRACIÓN FINAL)
Buffer 5X	8 μ L (1x)
DTT (100 mM)	4 μ L (10 mM)
RNaseOUT (40U/μl)	2 μ L (80 U)
Volumen final	40 μ L

Incubación: 2 minutos, 37°C. Luego agregar:

MMLV-RT (Life Technologies)	2 μL (400 U)
Volumen final	42 μ L

Incubación (Termociclador Maxygene, Axygen):

10 minutos, 25°C; 1 hora, 37°C; 15 minutos 70°C

3.7.6 Control de la Retrotranscripción: PCR β -actina

Se realizó una evaluación de la calidad de la retrotranscripción del ARN mediante una PCR de control a través de la amplificación de un fragmento del gen de la β -actina (termociclador Maxygene, Axygen).

Protocolo de retrotranscripción:

REACTIVO (CONCENTRACIÓN)	VOLUMEN (CONCENTRACIÓN FINAL)
Buffer de reacción (5X)	5,0 μ L (1x)
dNTPs (10 mM dNTPs de cada dNTP)	dNTPs (200 μ M de cada dNTP)
Primers F+R (10pmol/μl de cada primer)	Primers F+R (1 pmol/ μ L de cada primer)
DMSO (100%)	1,0 μ L (0,25%)
Go Taq polimerasa (Promega) (5U/μl)	0,2 μ L (1U)
Agua	9,8 μ L
ADNc	6,0 μ L (600ng)
Volumen final	25,0 μ L

Se utilizaron los *primers*:

F = GGGACGACATGGAGAAAA (T_m=56,9°C)

R = TTCATGAGGTAGTCAGTCAGGT (T_m=56,4°C)

Condiciones de Ciclado (Maxygene, Axygen):

4 minutos, 94°C	}	39 ciclos
30 segundos, 94°C		
30 segundos, 56°C		
1 minuto, 72°C		
10 minutos, 72°C		

3.7.7 PCR para evaluación de expresión de IL-1β por PCR en tiempo real

Se realizó la amplificación de secuencias específicas, para evaluar la expresión de IL-1β mediante una PCR real time realizada por triplicado (Termociclador Step One, Applied Biosystems) con los *primers*:

• IL-1-β:

F = ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA (T_m=60,7°C)

R = GTCGGAGATTCGTAGCTGGA (T_m=60,4°C)

• GADPH (control interno):

F = TGCACCACCAACTGCTTAGC (T_m=62,4°C)

R = GGCATGGACTGTGGTCATGAG (T_m=63,9°C)

Protocolo:

REACTIVO (CONCENTRACIÓN)	VOLUMEN (CONCENTRACIÓN FINAL)
SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems) 2X	10 µL (1X)
Primer F (5 µM)	1 µL (250 nM)
Primer R (5 µM)	1 µL (250 nM)
Agua	6 µL
ADNc	2 µL (2 – 200 ng)
Volumen final	20 µL

Condiciones de Ciclado (Maxygene, Axygen):

2 minutos, 50°C
 10 minutos, 95°C
 15 segundos, 95°C }
 1 minuto, 60°C } 40 ciclos

Curva de fusión
 15 segundos, 95°C
 1 minuto, 60°C hasta 95°C con una rampa de Temperatura de 0,1°C/seg.

Cada muestra se analizó por duplicado y se utilizó la expresión de GAPDH como control interno. Las muestras pre-intervención y las dos post-intervención para cada paciente fueron amplificadas en el mismo ensayo, incluyendo un control negativo (sin templado sustituyéndolo por agua)

Para el análisis de los estudios de expresión génica se utilizaron los valores:

- ΔCt : Representa el nivel de expresión de los genes. Se calculó como la diferencia entre el Ct del gen de interés (IL-1 β), y el Ct del control interno (GAPDH), para cada muestra. El valor numérico corresponde a la inversa del valor logarítmico de la concentración de ARNm del gen de interés (IL-1 β), respecto del gen control normalizador (GAPDH).
- $\Delta\Delta Ct$: transformación logarítmica de $2^{-\Delta Ct}$. Se calculó como el ΔCt de la muestra post-intervención (6 y 12 Meses) menos el ΔCt de la muestra pre- intervención (0 meses)
- $2^{-\Delta\Delta Ct}$: factor de variación del nivel de expresión génica luego de la intervención. Cuantificación relativa de la expresión génica⁵¹.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El análisis estadístico se efectuó con el software SPSS version 20.0 (IBM Corp., Armonk, Nueva York, EE.UU.).

El estudio de las variables bioquímico-clínicas de los pacientes en cada etapa de estudio se realizó por ANOVA de una vía para muestras pareadas y test post-hoc de Bonferroni. Las frecuencias alélicas y fenotípicas se calcularon por conteo directo y se evaluó si los SNPs estaban en equilibrio de Hardy Weinberg mediante la prueba de Chi Cuadrado.

El estudio de la expresión de ARNm y de expresión proteica también se realizó por ANOVA de una vía para muestras pareadas y test post-hoc de Bonferroni.

Para el análisis estadístico de la expresión de ARNm pre y post-intervención, se comparó el valor de ΔCt para cada etapa del estudio ya que esta variable presentó distribución normal. A través de regresión lineal, con edad y sexo como covariables, se evaluó la asociación de los genotipos de los SNPs, la expresión de ARNm y la expresión proteica, y se evaluó la asociación entre las variables bioquímico-clínicas y la expresión de ARNm y de Proteína.

Se utilizó el test t de Student para la comparación de medias, comparación de datos pareados y estudio de estadísticos de una variable.

Para todos los análisis estadísticos realizados, un valor de p inferior a 0,05 fue considerado significativo.

5. RESULTADOS

5.1. Características Bioquímico-Clínicas

De los 30 pacientes reclutados, hubo 3 individuos que abandonaron el protocolo, los restantes 27 individuos continuaron con la intervención, y en base a estos últimos se realizó el análisis. La población total consistió en 7 mujeres (23.33%) y 23 hombres (76.67%), con una edad promedio de 48.17 años (DE = 12.37, rango: 23-69 años).

La **Tabla 3** muestra las características bioquímico-clínicas y antropométricas que permitieron caracterizar la población de estudio en las etapas pre-intervención y post-intervención. El perfil bioquímico-clínico del grupo de pre-intervención corresponde al esperado para los individuos con DM2.

Tabla 3: Características bioquímico-clínicas y antropométricas de la población en las etapas pre y post-intervención.

	Grupo Pre-intervención (n = 30)	Estudio controlado prospectivo (n = 27)					
		Tiempo de intervención (meses)			ANOVA	Bonferroni <i>post-hoc</i> test	
		0	6	12		0-6	0-12
	M ± DE	M ± DE	M ± DE	M ± DE	P	p	p
Peso (kg)	95.8 ± 21.5	93.8 ± 21.2	90.8 ± 19.5	90.6 ± 19.8	NS	NS	NS
IMC (kg m ⁻²)	34.24 ± 5.57	33.79 ± 5.52	32.88 ± 5.31	32.74 ± 5.66	NS	NS	NS
Circunferencia de cintura (cm)	108.1 ± 14.6	106.8 ± 14.8	106.6 ± 14.1	108.0 ± 13.9	NS	NS	NS
PAS (mmHg)	135 ± 21	134 ± 21	127 ± 12	129 ± 15	NS	NS	NS
PAD (mmHg)	81 ± 14	81 ± 14	75 ± 11	76 ± 11	NS	NS	NS
HbA _{1c} (%)	9.74 ± 1.88	9.69 ± 1.92	6.52 ± 0.99	6.38 ± 1.45	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Glucemia en ayunas (mg dL ⁻¹)	200 ± 88	195 ± 87	123 ± 45	121 ± 43	0,005	0,003	0,003
CT (mg dL ⁻¹)	213 ± 70	212 ± 73	206 ± 50	192 ± 30	NS	NS	NS
c-HDL (mg dL ⁻¹)	41 ± 8	40 ± 7	42 ± 9	44 ± 9	0,005	NS	0,011
c-LDL (mg dL ⁻¹)	121 ± 28	119 ± 29	118 ± 34	114 ± 25	NS	NS	NS
TG (mg dL ⁻¹)	250 ± 357	258 ± 376	214 ± 108	177 ± 101	NS	NS	NS

Análisis estadístico: ANOVA de una vía para muestras pareadas y test *post-hoc* de Bonferroni. M: media; DE: desviación estándar; IMC: índice de masa corporal; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; HbA_{1c}: hemoglobina glicosilada; CT: colesterol total; c-HDL: colesterol de lipoproteínas de alta densidad; c-LDL: colesterol de lipoproteínas de baja densidad; TG: triglicéridos; NS: no significativo.

Los pacientes lograron el objetivo terapéutico de la compensación metabólica después de 6 meses de tratamiento y dicha compensación se mantuvo a los 12 meses. Esto se demostró por una disminución estadísticamente significativa en la HbA_{1c} y en la glucemia sérica en ayunas, en la etapa post-intervención.

Asimismo, se observó un aumento significativo en el c-HDL después de 12 meses de tratamiento y una tendencia a la disminución del peso y el IMC luego de 6 meses de tratamiento. También se observó una tendencia a la disminución de la PAS a los 12 meses, que no alcanzaron significancia estadística. El resto de variables no mostraron cambios significativos con el tratamiento.

5.2. Análisis poblacional previo a la intervención

Consideramos el logaritmo de los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para el análisis de la expresión de ARNm y los logaritmos de pg/mL para el análisis de los niveles de IL-1 β en suero, ya que dichas variables mostraron una distribución normal. En el grupo previo a la intervención, utilizamos la regresión lineal múltiple, con edad y sexo como covariables, para evaluar la asociación entre la expresión de ARNm de IL-1 β , los niveles séricos de IL-1 β y las variables bioquímicas y clínicas. La mediana de la concentración sérica de IL-1 β al comienzo del estudio fue de 10,40 pg / mL (rango intercuartílico [IQR]: 2,30 - 19,50 pg / mL). 13 individuos (43.33%) mostraron valores dentro del rango de referencia (<5 pg / mL) y 17 individuos (56.67%) por encima (\geq 5 pg / mL).

Tabla 4. Expresión de IL-1 β ARNm y de proteína IL-1 β y su asociación con los valores de Glucemia en ayunas y de HbA1c						
A						
	Glucemia en ayunas			Regresión lineal		
	< 140 mg/dl (n = 11)	140 - 199 mg/dl (n = 7)	\geq 200 mg/dl (n = 12)	P	r	IC 95% r
	m (IQR)	m (IQR)	m (IQR)			
IL-1 β ARNm ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	1.23 (0.23 - 7.62)	0.41 (0.15 - 2.18)	1.32 (0.66 - 2.77)	NS		
IL-1 β proteína (pg mL ⁻¹)	3.50 (1.50 - 13.50)	6.70 (1.50 - 14.00)	13.25 (10.40 - 74.83)	0.015	0.378	0.078 / 0.678
B						
	HbA1c			Regresión lineal		
	< 10 % (n = 18)	10 - 11.99 % (n = 8)	\geq 12 % (n = 4)	P	r	IC 95% r
	m (IQR)	m (IQR)	m (IQR)			
IL-1 β ARNm ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	1.02 (0.28 - 3.44)	0.67 (0.20 - 3.03)	1.36 (0.45 - 2.62)	NS		
IL-1 β proteína (pg mL ⁻¹)	11.70 (1.50 - 16.35)	6.55 (1.50 - 12.63)	26.45 (2.90 - 762.05)	NS		

Evaluación estadística: regresión lineal múltiple. Las variables dependientes utilizadas fueron el $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para la expresión de ARNm de IL-1 β y el logaritmo de pg/mL para los niveles de IL-1 β en suero, debido a que esas variables mostraron una distribución normal. Covariables: edad y sexo. m: mediana; IQR: rango intercuartílico; HbA1c: hemoglobina glicosilada; r: coeficiente de regresión; IC del 95% r: coeficiente de regresión intervalo de confianza del 95%; NS: no significativo

Para evaluar el efecto de la hiperglucemia sobre la expresión de IL-1 β , se crearon grupos con diferentes niveles de HbA1c (<10%, 10-11.99%, \geq 12%) y Glucemia en ayunas (<140 mg / dL; 140-199 mg / dL; \geq 200 mg / dL), y se comparó la expresión de ARNm de IL-1 β y las concentraciones séricas de IL-1 β en cada nivel mediante regresión lineal múltiple, con edad y sexo como covariables. En el momento basal, el nivel sérico de IL-1 β se asoció positivamente con Glucemia en ayunas, donde los intervalos más altos de glucemia se asociaron con los niveles más altos de proteína IL-1 β (**Tabla 4**). La expresión del ARNm de IL-1 β no se asoció con ninguna variable bioquímica-química analizada.

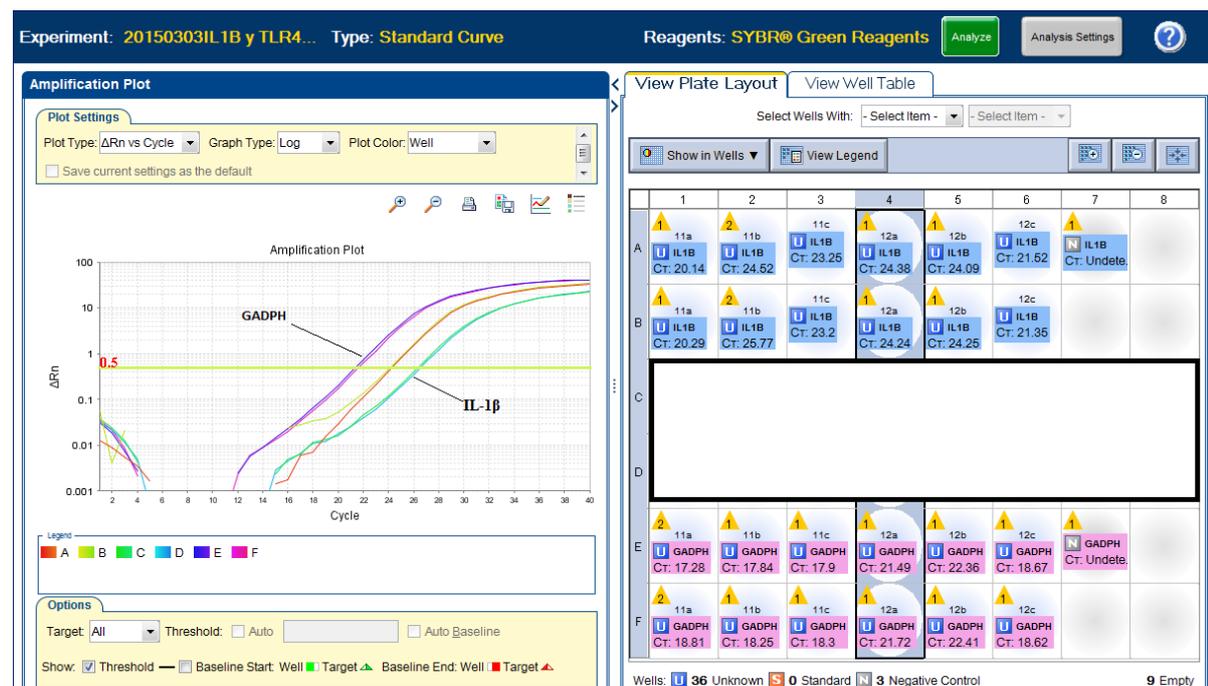
5.3 Evaluación de la expresión de ARN mensajero de IL-1 β por PCR en tiempo real

Se determinaron los niveles de expresión de ARNm de IL-1 β en todos los pacientes reclutados. Cada muestra se analizó por duplicado, con GADPH como el gen de control de normalización. Las muestras previas y posteriores a la intervención para cada individuo se amplificaron en el mismo ensayo, y todas las mediciones incluyeron la determinación de un control negativo sin plantilla, en el que el ADNc se sustituyó por agua.

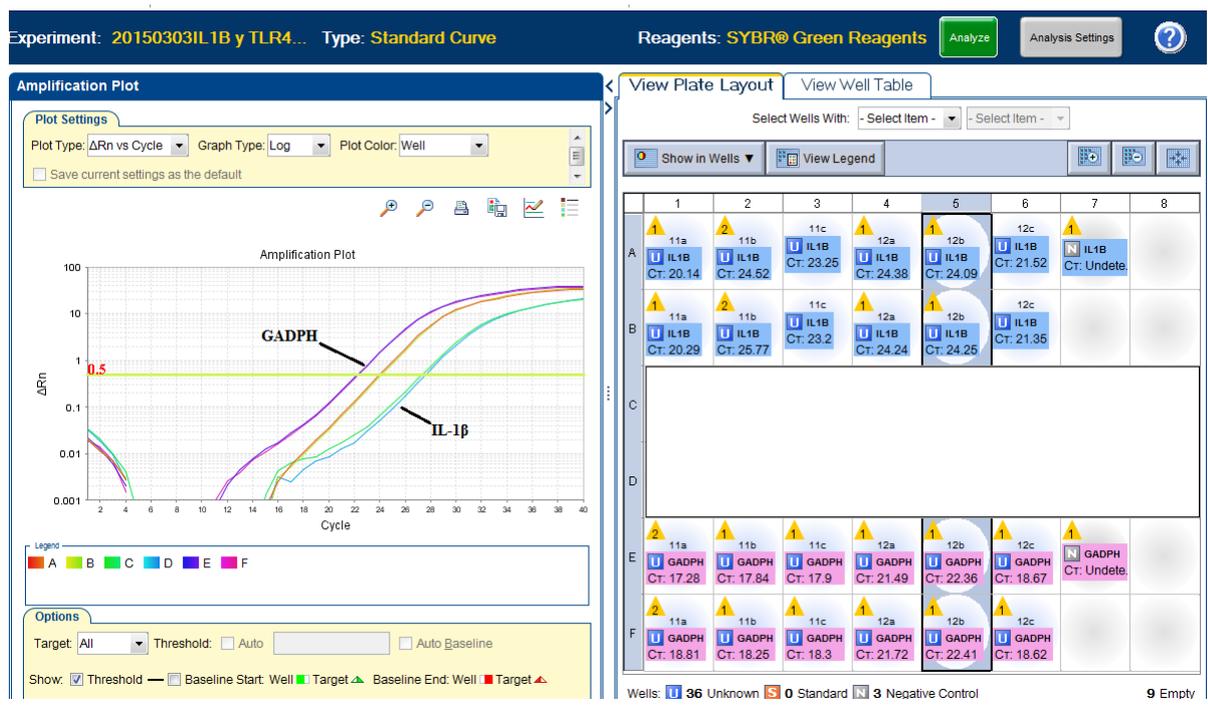
El método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ se empleó para la cuantificación relativa de la expresión génica. ΔCt se calculó como la diferencia entre el Ct del gen diana (IL-1 β) menos el Ct del gen de control endógeno (GADPH) para cada muestra. Para el análisis grupal previo a la intervención, se calculó el $\Delta\Delta Ct$ como ΔCt de cada muestra previa a la intervención menos el ΔCt promedio de todas las muestras previas a la intervención. Se calculó el $2^{-\Delta\Delta Ct}$, que representa el cambio en la expresión de ARNm de cada muestra pre-intervención en comparación con la expresión promedio. Para el análisis prospectivo, $\Delta\Delta Ct$ se calculó como el ΔCt de la muestra posterior a la intervención (6 y 12 meses) menos el ΔCt de la muestra previa a la intervención (0 meses) y el $2^{-\Delta\Delta Ct}$ que representa el cambio en la expresión del ARNm después de la intervención. También se calculó el $2^{-\Delta Ct}$ de cada muestra para evaluar los niveles de expresión del ARNm de IL-1 β normalizados por el control endógeno en cada momento del estudio.

A modo de ejemplo, en la **Figura 3** se presentan los resultados observados en el estudio prospectivo controlado de un individuo con DM2 en los 3 tiempos analizados. A partir de los mismos se determina el Ct de las muestras para cada juego de *primers* y cada tiempo del estudio (A, B, C) para luego realizar los cálculos detallados previamente.

A. Muestra pre-intervención (0 meses)



B. Muestra a los 6 meses post-intervención



C. Muestra a los 12 meses post-intervención

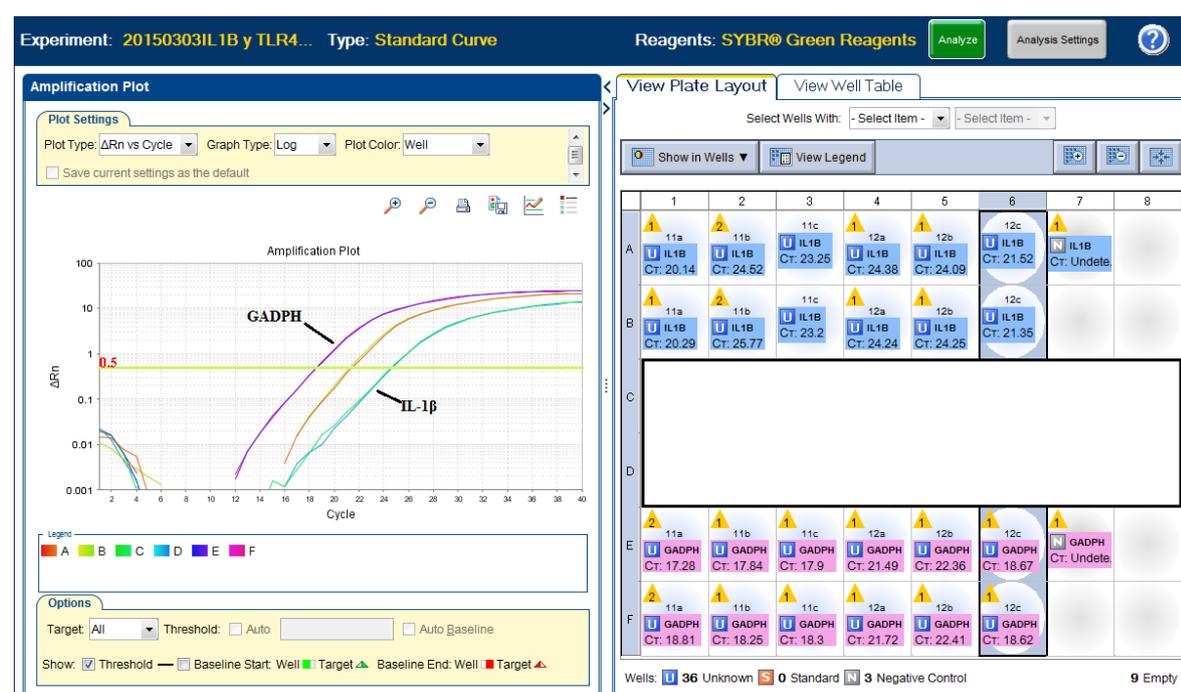


Figura 3: Evaluación de la expresión del ARNm de IL-1 β en los diferentes tiempos de la intervención

5.4 Análisis de ARNm de IL-1 β y la proteína IL-1 β

Para el análisis de la expresión de ARNm de IL-1 β , se compararon los logaritmos de los valores de $2^{-\Delta Ct}$ de las etapas previa y posterior a la intervención. Las variaciones en los niveles séricos de IL-1 β y en las variables bioquímicas y clínicas se calcularon como el valor de la muestra posterior a la intervención (6 y 12 meses) menos el valor de la muestra previa a la intervención (0 meses). La expresión de ARNm de IL-1 β y los niveles de proteína sérica se compararon con las variaciones en variables bioquímicas y clínicas, con el genotipo de SNP rs16944, con el tipo de tratamiento y con la dosis de cada fármaco antidiabético, mediante regresión lineal múltiple, con edad y sexo como covariables.

Los niveles de expresión de ARNm de IL-1 β y proteína IL-1 β circulante no presentaron cambios significativos con el tratamiento. Los resultados se presentan en las **Figuras 4 y 5**, en las cuales para cada conjunto de datos se informa la mediana y el rango intercuartílico. No se encontró asociación entre los niveles de expresión de ARNm de IL-1 β y ninguna de las variables bioquímico-clínicas estudiadas.

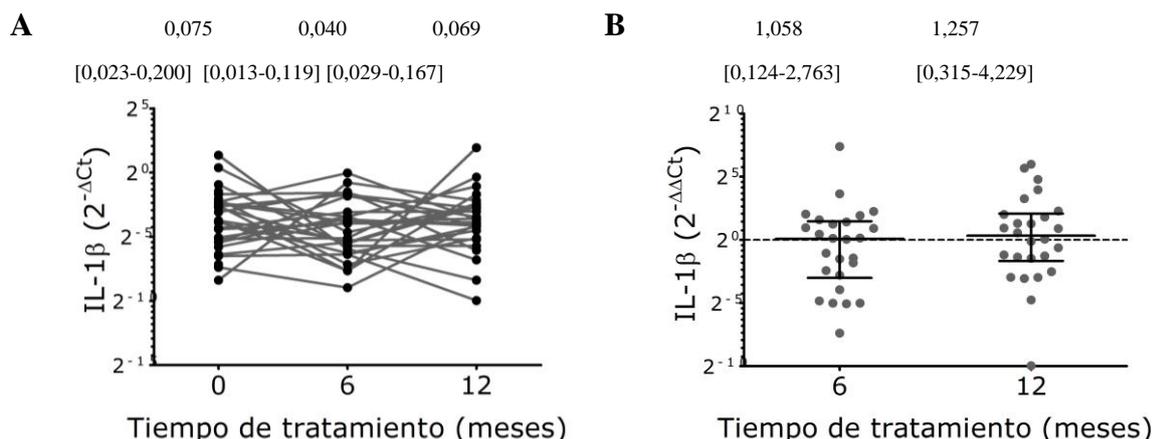


Figura 4: Expresión del ARNm de IL-1β y los niveles séricos en cada momento del estudio y la variación después de 6 y 12 meses de tratamiento. **A.** Cuantificación relativa al control endógeno, de la expresión de ARNm de IL-1β pre y post-intervención. **B** Variación de expresión de ARNm de IL-1β a los 6 y 12 meses del tratamiento.

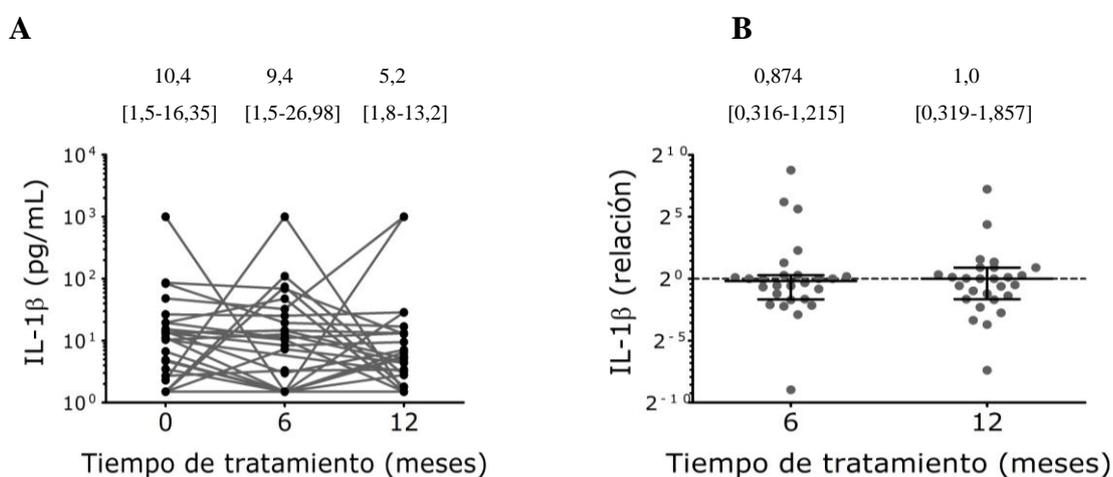


Figura 5: Niveles séricos de proteína IL-1β antes y después del tratamiento (**A**). Variación de los niveles séricos de IL-1β a los 6 y 12 meses post-intervención calculada como la relación entre los niveles sericos después del tratamiento y el nivel inicial de la proteína circulante (**B**).

Para las **Figuras 4 y 5**, se realizaron los siguientes análisis estadísticos: ANOVA de una vía para muestras pareadas y prueba post hoc de Bonferroni. Para el análisis estadístico consideramos los logaritmos de los valores de $2^{-\Delta Ct}$ para la expresión de ARNm y el logaritmo de la pg/mL para los niveles de proteína sérica.

5.5 Correlación entre niveles circulantes de IL-1 β y HbA_{1c}

Se halló una asociación negativa significativa entre la variación de IL-1 β circulante después de 6 meses de tratamiento y la variación en la HbA_{1c} ($p=0.021$, $r=-0.004$, IC95% $r=-0.007/-0.001$). También se ha encontrado una asociación negativa significativa entre los niveles de IL-1 β circulante después de 12 meses de tratamiento y la variación de la HbA_{1c} ($p=0.004$, $r=-0.004$, IC95% $r=-0.006/-0.001$) y de la Glucemia en Ayunas ($p=0.040$, $r=-0.102$, IC95% $r=-0.198/-0.005$). En todos los casos, los individuos que presentaron los mayores descensos de glucemia y HbA_{1c}, fueron los que mostraron un mayor aumento en el nivel de IL-1 β circulante. La variación en los niveles de proteína circulante no se asoció a ninguna otra variable analizada

5.6 Estudios epigenéticos.

5.6.1 Amplificación específica por PCR de secuencias del promotor

Se realizaron las amplificaciones específicas de las regiones a analizar, con posterior evaluación de especificidad y calidad de los productos amplificados a través de electroforesis en geles de agarosa al 2%. En la **Figura 6** se observan los resultados obtenidos:

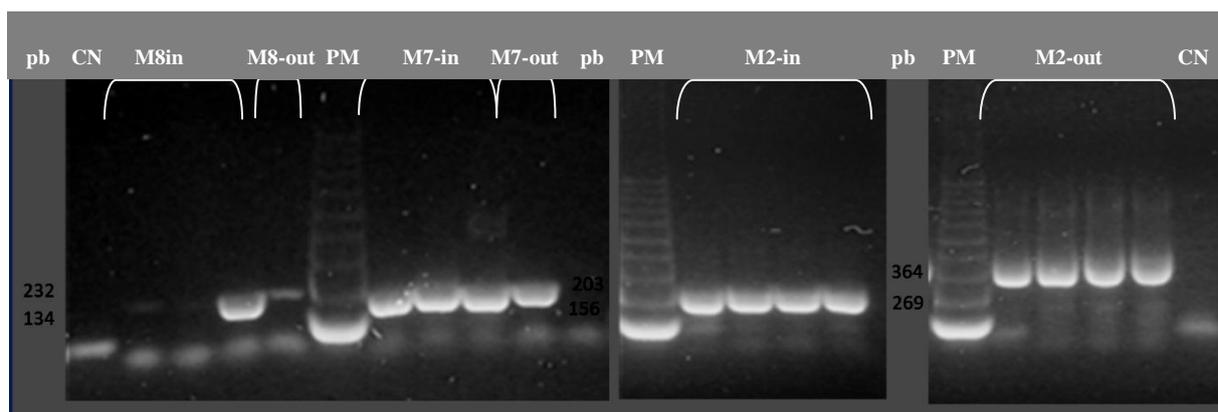
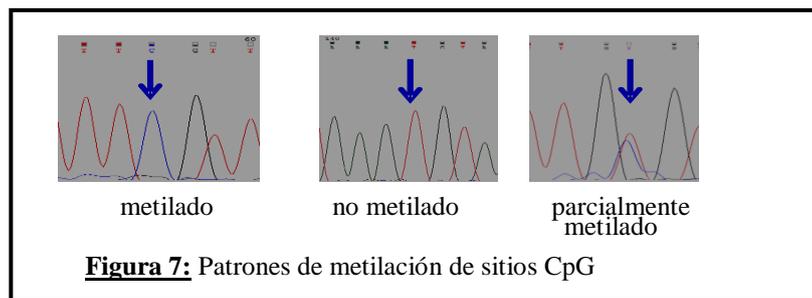


Figura 6: Electroforesis de los productos amplificados a partir de secuencias específicas del promotor de IL-1 β .
PM: Marcador de Peso molecular de 100 pb (comprende bandas entre 100 y 1000 pb separadas cada 100 bases)

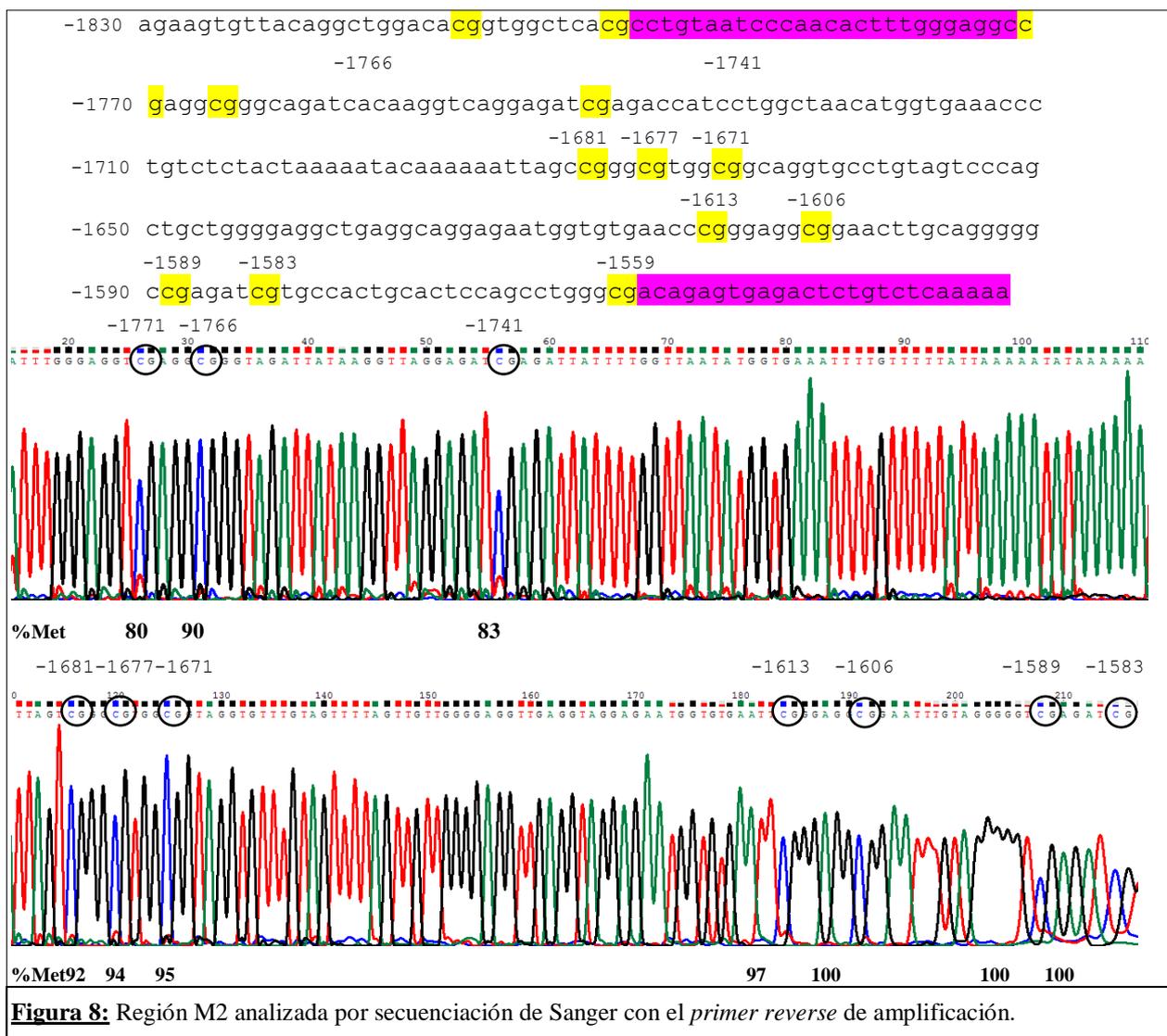
5.6.2 Correlación entre metilación del promotor del gen de IL-1 β y expresión proteica de IL-1 β

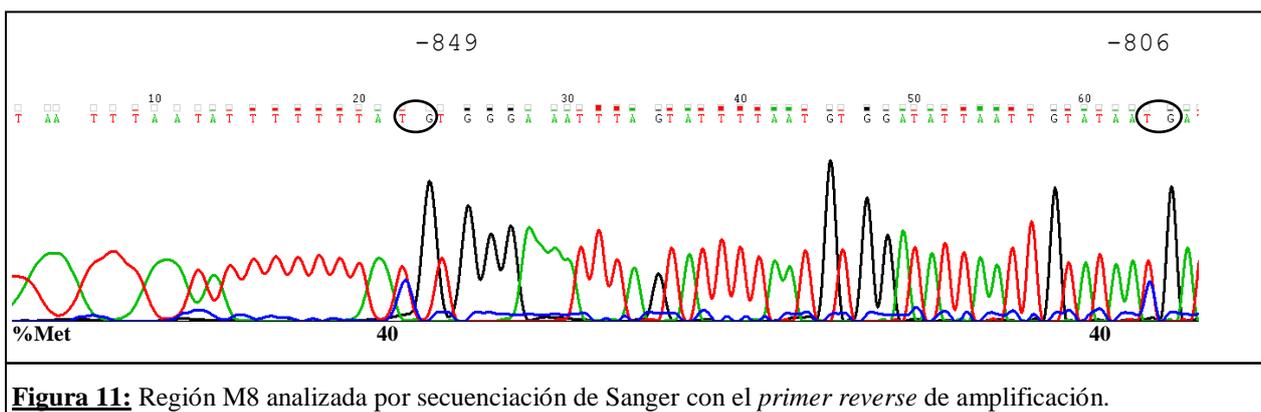
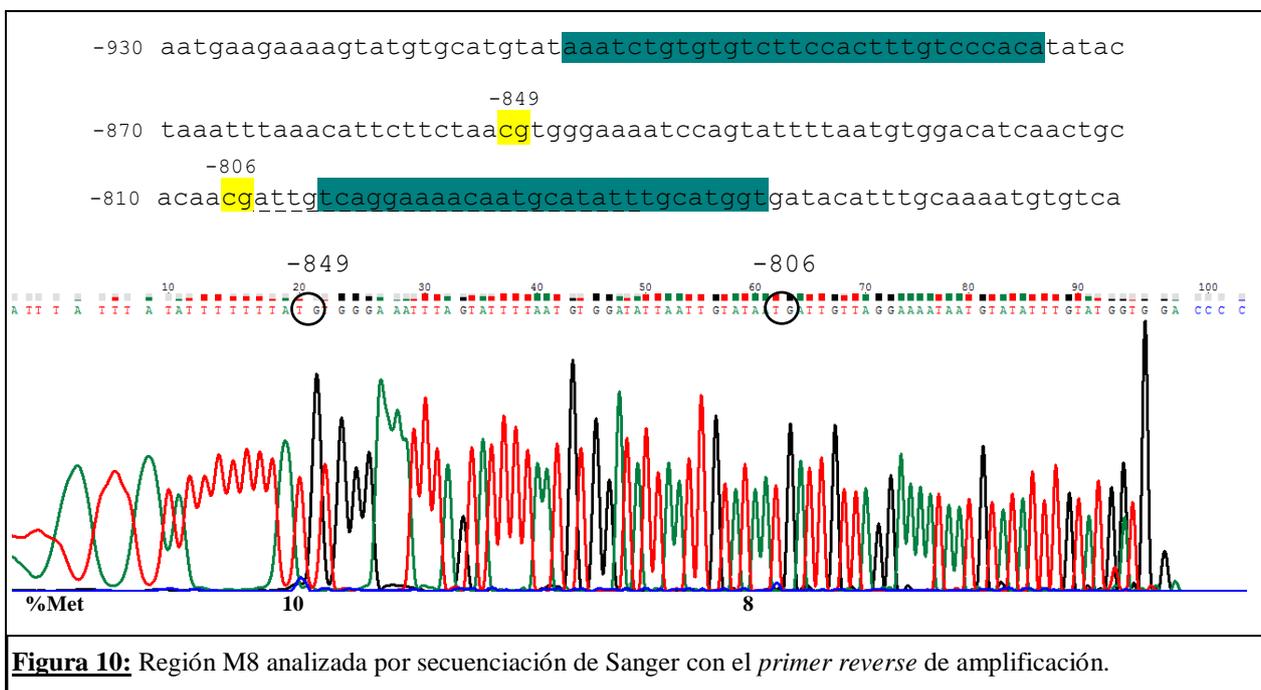
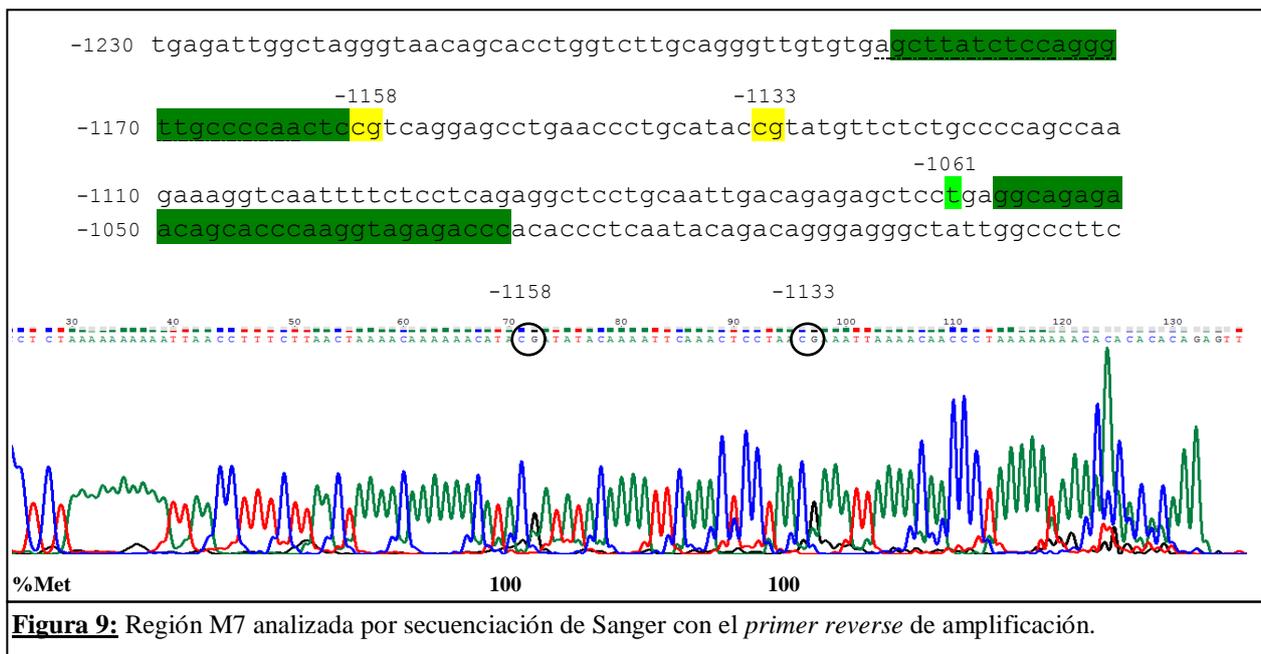
Se analizó la metilación de sitios CpG de las 3 regiones del promotor del gen de IL-1 β por medio de secuenciación automática de Sanger y se identificaron los picos de C o T en cada una de las posiciones CpG para el cálculo de los porcentajes de metilación.

Como se observa en la **Figura 7** se pueden identificar los sitios CpG metilados, no metilados y parcialmente metilados.



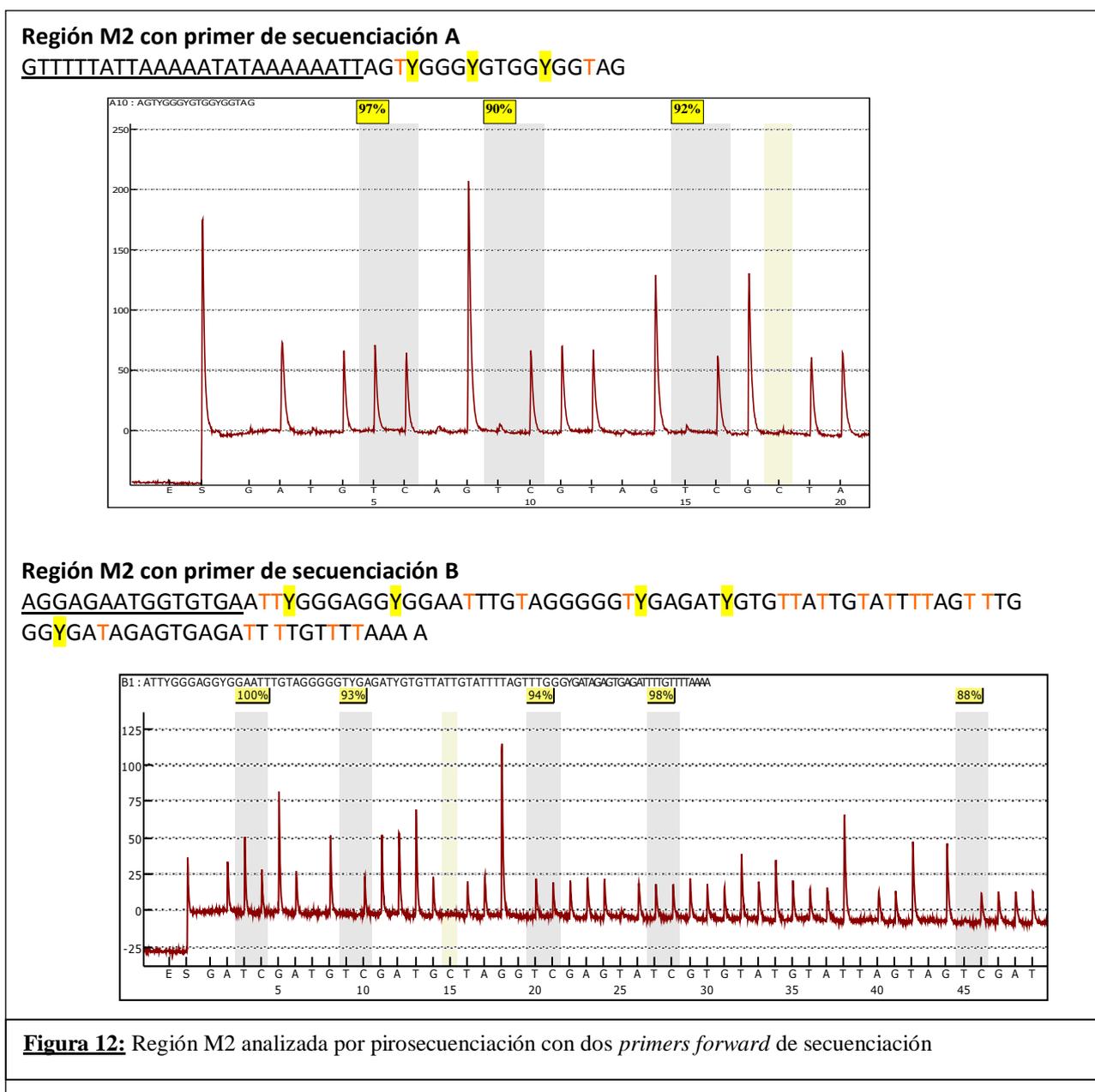
A modo de ejemplo presentamos resultados de muestras de pacientes en los cuales se analizaron las 3 regiones del promotor en estudio y los correspondientes porcentajes de metilación para cada CpG (**Figuras 8 a 11**).





La secuenciación automática de Sanger permitió identificar los sitios con variaciones en los porcentajes de metilación entre las diferentes muestras, pero resultó compleja la determinación absoluta de los porcentajes de metilación para cada sitio CpG.

Por ello, se realizó la puesta a punto de la técnica de pirosecuenciación para el análisis del porcentaje de metilación de las 3 regiones del gen IL-1 β correspondientes al promotor del gen según el detalle de materiales y métodos. Se presenta a manera de ejemplo, el gráfico de cada una de las subregiones del gen analizadas (**Figuras 12 a 14**).



Región M7

AGTTTATTTTTAGGGTTGTTTTAA**TTT**Y**GTT**AGG AGTTTGAATT **TTG**TATAT**Y**G TATGTT**TTTT** **GTTTT**AG**TTA**AGGA

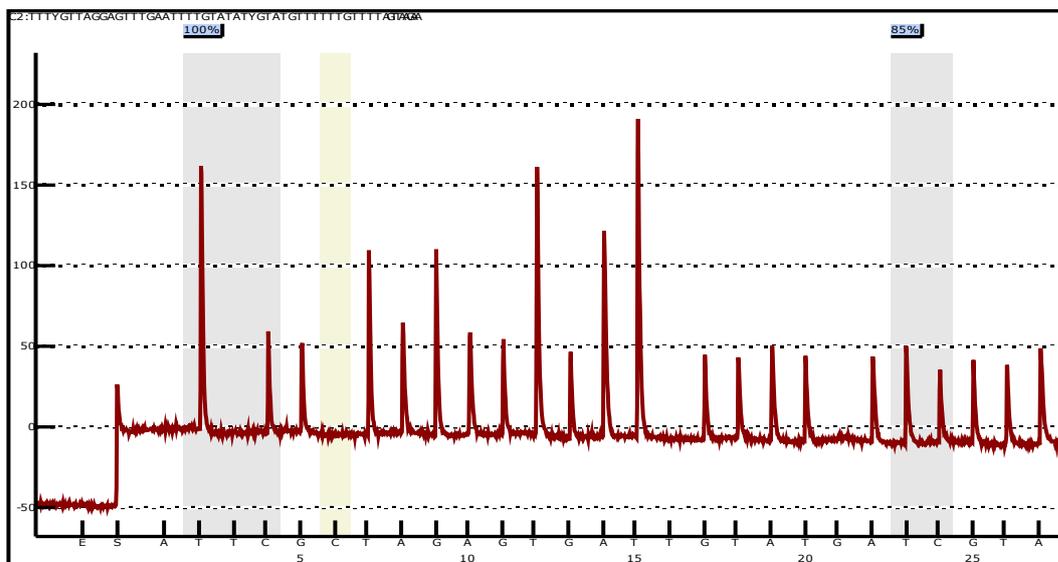


Figura 13: Región M7 analizada por pirosecuenciación con un *primer forward* de secuenciación

Región M8

AATATACATTATTTTCTCAACAAT**CR**TTATACAATTAAATATCCACATTAATAACTAAATTTTCCACRTTAA**AAA** AAA
TATTTAA ATTTAATAT

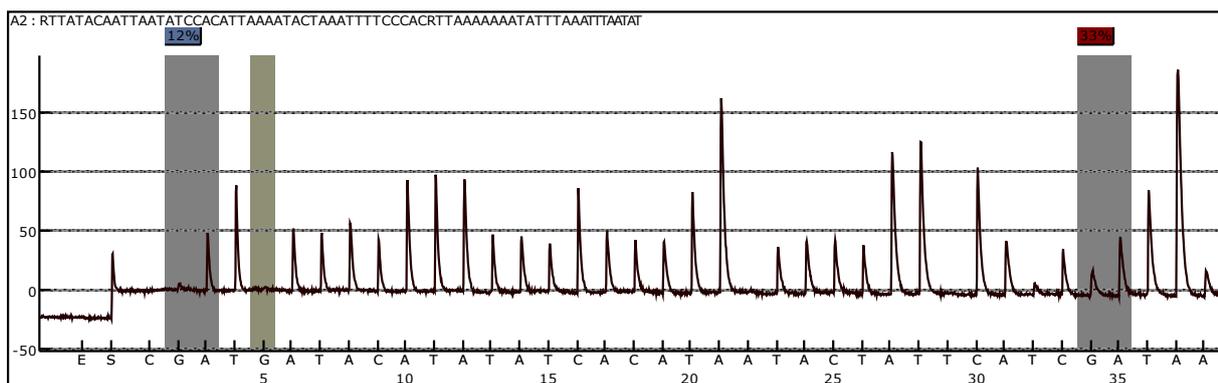


Figura 14: Región M8 analizada por pirosecuenciación con un *primer reverse* de secuenciación

Como se puede observar a partir del análisis de secuenciación de las **Figuras 12 a 14** y que son representativas de los valores observados para los pacientes, las regiones M2 y M7 presentan niveles de metilación mayores al 70%. La región M8 que se encuentra a 300 bases del inicio de transcripción, presentó niveles muy bajos de metilación que en algunas muestras alcanzó el 0%.

Mediante esta metodología de secuenciación, se identificaron las secuencias CpG correspondientes al promotor cuyos niveles de metilación variaron en los pacientes diabéticos sometidos a tratamientos de compensación metabólica.

A partir del análisis de los resultados obtenidos se determinaron los posibles sitios de metilación implicados en la regulación del gen. Es por ello que en particular, se profundizó el análisis de la región M2 que ya que presentó los mayores cambios en los porcentajes de metilación en los pacientes estudiados. Se analizaron los patrones de metilación de los 30 pacientes iniciales, los 28 pacientes que continuaron con la intervención a los 6 meses, y en 15 pacientes a los 12 meses. Se realizó la determinación del porcentaje de metilación de 8 secuencias CpG en la región M2 del promotor del gen de IL-1 β , por tratamiento del ADN con bisulfito de sodio, amplificación por PCR y pirosecuenciación. Hasta el momento se analizaron 30 pacientes iniciales y a los 6 meses, y 18 a los 12 meses. Los resultados se muestran en la **Tabla 5**.

En la zona analizada del promotor del gen de IL-1 β , se encontraron 3 sitios CpG que disminuyeron significativamente su porcentaje de metilación luego del tratamiento. Más aún, el porcentaje de metilación en estos sitios se correlacionó negativamente con el nivel de expresión proteica de IL-1 β ($p=0.016$, $r=-0.519$; $p=0.022$, $r=-0.498$; y $p=0.048$, $r=-0.400$, respectivamente). Por otro lado, hubo 2 sitios que mostraron un aumento en el porcentaje de metilación (**Tabla 5**).

Tabla 5: Porcentaje de metilación de islas CpG en la región promotora del gen de IL-1 β

A		Sitio de Metilación							
		-1681		-1677		-1671		-1613	
		M	± SD	M	± SD	M	± SD	M	± SD
Tiempo de tratamiento (meses)	0	97,17	± 3,06	83,14	± 14,07	83,03	± 12,08	95,99	± 3,78
	6	99,19	± 2,16	57,01	± 10,81	66,24	± 12,55	96,27	± 3,53
	12	100,00	± 0,01	55,57	± 10,65	64,31	± 10,35	98,01	± 1,85
Comparación de datos pareados (p)	0-6	0,032		< 0,001		< 0,001		NS	
	0-12	NS		< 0,001		0,037		NS	
		-1606		-1589		-1583		-1559	
		M	± SD	M	± SD	M	± SD	M	± SD
Tiempo de tratamiento (meses)	0	92,15	± 2,66	92,99	± 4,73	99,91	± 0,38	87,09	± 7,66
	6	91,45	± 3,14	94,95	± 4,34	99,66	± 1,06	99,17	± 3,82
	12	91,78	± 3,38	97,17	± 2,61	99,71	± 0,77	100,00	± 0,00
Comparación de datos pareados (p)	0-6	NS		NS		0,003		NS	
	0-12	NS		NS		NS		0,033	

Se ha observado modificaciones en el patrón de metilación de la IL-1 β durante el tratamiento. Han podido identificarse sitios CpG (-1677 y -1671) que aumentarían la expresión de la IL-1 β mientras que el sitio -1179 estaría asociado a una disminución de la expresión de la misma. El resto de los sitios de metilación analizados no han presentado asociación con la variación en la expresión de IL-1 β . En otros tres sitios CpG (-1681, -1583 y -1559), si bien hubo variaciones estadísticamente significativas en el porcentaje de metilación en algunos de los intervalos dentro de la intervención, este hallazgo no puede considerarse relevante ya que todos estos sitios mantuvieron su porcentaje de metilación cercano al 100% antes y después del tratamiento. Los sitios CpG restantes (-1613, -1606 y -1589) también se mantuvieron con alto porcentaje de metilación, y no mostraron cambios significativos luego del tratamiento.

Al momento inicial del protocolo el porcentaje de metilación del sitio -1677 se correlacionó negativamente con el nivel circulante proteico de IL-1 β ($p=0,048$; $r=-0,400$). A los 6 meses de tratamiento hubo correlación negativa entre el circulante proteico de IL-1 β y el porcentaje de metilación de los sitios -1583 ($p=0,016$; $r=-0,519$) y -1559 ($p=0,022$; $r=-0,498$).

Cabe resaltar, que la regulación de la expresión génica resulta del balance entre todos los sitios de metilación del promotor del gen. En este caso se observó una concordancia con los resultados observados en las **Figura 4A y B** donde la expresión de ARNm de IL-1 β no mostró diferencias con el tiempo de tratamiento.

5.7 Correlación entre polimorfismo rs16944 y expresión de ARNm de IL-1 β

El polimorfismo rs16944 analizado se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg para esta población (**Tabla 6**, $p=0,995$). La frecuencia alélica del alelo T hallada en nuestra población fue 0,48, similar a la frecuencia hallada en caucásicos (0,36 of 226 Cromosomas, HapMapProject).

Encontramos una asociación significativa entre la presencia del alelo polimórfico T del rs16944 en el gen IL-1 β y la menor expresión de ARNm de IL-1 β ($p=0,006$; $r=2,76$; IC95% $r=0,86/4,67$) al inicio del tratamiento, pero no hubo asociación entre la expresión ARNm y la de proteína. No se halló asociación entre el genotipo rs16944 y la variación en ARNm de IL-1 β después de seis y doce meses de tratamiento.

El genotipo homocigota TT se asoció a un mejor control metabólico, demostrado por una mayor disminución de la glucemia en ayunas luego de 6 ($p=0,002$; $r=-0,631$) y 12 ($p=0,007$; $r=-0,734$) meses de tratamiento.

Tabla 6: rs16944 SNP -511 C/T del gen IL-1 β

	Frecuencia genotípica		Ley de Hardy-Weinberg
	n	(%)	p
CC	8	26,7	0.995
TC	15	50,0	
TT	7	23.3	

Análisis estadístico: prueba de Chi cuadrado.

6. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha estudiado el grado de expresión del gen codificante para IL-1 β , a través de la determinación de los niveles de RNAm y los niveles de proteína circulante, así como los porcentajes de metilación y polimorfismos en el promotor del gen. El estudio se realizó en pacientes con reciente diagnóstico de DM2, metabólicamente descompensados, y después de un tratamiento para lograr su compensación metabólica.

La epigenética transmite influencias ambientales específicas a los rasgos fenotípicos a través de una variedad de mecanismos que persisten en tejidos diferenciados, con el poder de modular la expresión de los genes⁵¹. Hay estudios que revelan que la diabetes y la hiperglucemia sostenida provocan modificaciones epigenéticas de histonas con significativo efecto en la modulación de la expresión génica renal, promoviendo la acumulación de proteínas de la Matriz Extra Celular en el glomérulo, desencadenando la fibrosis renal en la etapa final de la Enfermedad Renal Diabética⁵². Así como fue descrito que los cambios en la concentración de glucosa producen modificaciones epigenéticas sobre las Histonas, el presente trabajo revela el impacto del tratamiento sobre los sitios CpG del promotor del gen de IL-1 β .

Se ha descrito que el tratamiento con citoquinas inflamatorias *in vitro*, puede causar modificaciones en el estado de metilación del ADN en sitios CpG claves, lo que resulta en la inducción aberrante y sostenida de IL-1 β en condrocitos articulares humanos. Sin embargo, cómo el grado de metilación de estos sitios determina la actividad del promotor del gen, aún no ha sido dilucidado⁴⁰.

No existen estudios longitudinales previos que evalúen la influencia de la variación en la metilación de las islas CpG de la región promotora del gen de IL-1 β en células mononucleares de sangre periférica. Es decir, no existen estudios que revelen modificaciones epigenéticas por cambios metabólicos, solo se han descrito ensayos *in vitro* en condrocitos articulares humanos, por lo tanto, en este sentido el presente ensayo es inédito.

El análisis de la variación de los niveles de metilación en la región promotora del gen se realizó para dilucidar cuáles son las regiones susceptibles de ser modificadas epigenéticamente. Se plantearon cambios en los hábitos alimentarios y el aumento de actividad física de los pacientes intervenidos, o la regulación de la glucemia como eventos modificadores. El análisis de la metilación del ADN por secuenciación genómica del ADN convertido con bisulfito, es un método bien establecido y versátil que facilita la identificación y cuantificación de la metilación del ADN con una resolución de sitios

CpG únicos. Para la evaluación de los patrones de metilación se hicieron dos abordajes metodológicos de secuenciación.

La secuenciación de los productos de amplificación por PCR de ADN metilado, se realizó por la técnica de Sanger y por pirosecuenciación, para las 3 zonas del promotor en estudio.

Cabe resaltar la dificultad técnica que reviste el estudio de ADN sometido al tratamiento con bisulfito. La conversión de bisulfito y el posterior análisis se basa en la premisa de que el ADN se ha convertido completamente. Si la conversión es incompleta, pueden surgir problemas con el análisis ya que las citosinas no metiladas no convertidas pueden ser interpretadas incorrectamente como citosinas metiladas. La conversión de Bisulfito debió ser optimizada para maximizar el porcentaje de conversión. Para que el ADN se convierta por completo, primero debe ser monocatenario, de modo que los residuos de citosina se expongan a los iones bisulfito. El primer paso, la desnaturalización del ADN, es crítica y puede ser la fuente de una conversión incompleta si el ADN no está completamente desnaturalizado. La concentración de ADN y su calidad también pueden afectar la eficiencia de la reacción de bisulfito y el rendimiento máximo de PCR. La degradación del ADN es una limitación del protocolo de conversión de bisulfito. El tratamiento químico del ADN introduce varias roturas de cadena en ADNsc y algunas de las condiciones necesarias para la conversión completa de bisulfito. La concentración alta de bisulfito y los largos tiempos de incubación pueden acelerar la degradación del ADN. Durante este trabajo se utilizaron y compararon diferentes kit comerciales. Luego se eligió el más adecuado de acuerdo al rendimiento y calidad, tanto del ADN bisulfitado como de la amplificación por PCR de los productos deseados.

A través de la secuenciación de Sanger se identificaron los sitios con variaciones en los porcentajes de metilación entre las diferentes muestras, pero resultó compleja la determinación absoluta de los porcentajes de metilación para cada sitio CpG. Hemos realizado la identificación de los sitios de metilación a través de la comparación de las señales de C o T observadas en la secuenciación del ADN bisulfitado, con respecto a la secuencia de referencia. Luego se determinó el porcentaje de cada señal, siendo del 100% cuando solo se observaba C, del 0% ante la presencia de T; y se evaluó cada señal con respecto a la suma de ambas, en el caso de mezcla de secuencias con diferentes patrones de metilación (**Figuras 7 a 11**).

Las técnicas de secuenciación de nueva generación evolucionaron para lograr una resolución similar a la secuenciación genómica de bisulfito. La particular ventaja de la pirosecuenciación fue la posibilidad de realizar una cuantificación absoluta de la metilación de cada sitio CpG.

En este trabajo, observamos que dos de los ocho sitios CpG analizados evidenciaron una notoria disminución del porcentaje de metilación. El resto de los sitios analizados permaneció casi totalmente metilado con porcentajes cercanos al 100% antes y después del tratamiento, de lo que podría inferirse que estos últimos se ven poco influenciados por las regulaciones epigenéticas estudiadas.

El cambio en los patrones de metilación de los 2 sitios que mostraron una disminución evidente de la metilación, no se asoció a una mayor expresión del gen. Se observó una correlación positiva con los valores de IL-1 β circulante, pero no fue correlacionado con los niveles de ARNm de IL-1 β . De este hallazgo se desprende que, si bien hubo modificaciones epigenéticas que disminuyeron el porcentaje de metilación, esto no se vió reflejado en un aumento de la expresión del gen. Probablemente para obtener dicha correlación sea necesario un N mayor al estudiado, aunque tampoco puede descartarse que los sitios que variaron tengan escasa o nula influencia sobre la regulación de la transcripción del gen, siendo los sitios que se mantuvieron altamente metilados los que verdaderamente impactan en el proceso. En función de ésto se podrían proponer futuras líneas de investigación. Por otra parte solo se realizaron estudios de correlación para los CpG de solo una de las 3 regiones, quizás con un mayor N las otras regiones del promotor también podrían demostrar impacto en la expresión.

Asimismo, se ha evaluado la asociación entre polimorfismos de nucleótido único presentes en la región promotora del gen y numerosas variables bioquímicas y clínicas. Los resultados obtenidos mostraron que el genotipo del rs16944 presente en el promotor del gen de IL-1 β tiene un efecto sobre la transcripción del gen, en donde la presencia del alelo polimórfico T se asoció a una menor transcripción de ARNm de IL-1 β . Este hallazgo coincide con publicaciones previas donde un haplotipo específico (-3893G, -1464G, -511C y -31T) en la región promotora del gen de IL-1 β fue asociado con un aumento de ARNm de IL-1 β ⁵³. Adicionalmente, secreciones de esta proteína inflamatoria significativamente bajas, se han hallado asociadas al haplotipo GTC (-1470G/C, -511T/C y -31C/T) en el promotor del gen⁵⁴.

Los polimorfismos en la región promotora del gen IL-1 β alteran el efecto inductor del lipopolisacárido (LPS) sobre la transcripción del gen IL-1 β , lo que aumenta la susceptibilidad frente a enfermedades inflamatorias⁵⁵. Wen y cols. sugirieron que los haplotipos del promotor de IL-1 β influyen en la expresión y la actividad transcripcional del gen IL-1 β después de la exposición a LPS, y observaron aumento de la expresión en sujetos con haplotipo GCT (-1470G, -511C y -31T)⁵⁶.

Los análisis estadísticos realizados revelaron una asociación directa entre los niveles de IL-1 β circulante y la glucosa plasmática en ayunas (≥ 126 mg / dL).

En este sentido, Misaki y col. estudiaron una población masculina de mediana edad, con y sin sobrepeso, sana y preclínica donde hallaron que las concentraciones plasmáticas de IL-1 β se asociaron significativamente con niveles de glucemia de hasta 125 mg/dL⁵⁷.

En nuestro trabajo se han replicado estos resultados en individuos con estados hiperglucémicos (≥ 126 mg / dL), donde aquellos con niveles más altos de FPG presentaban niveles más altos de IL-1 β en suero.

Otro hallazgo indica que las citoquinas proinflamatorias en suero, incluida la IL-1 β , son significativamente más altas en individuos con crisis hiperglucémicas si se comparan con los controles. Esto parece estar relacionado con un estrés oxidativo significativamente aumentado⁵⁸. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que las células β pancreáticas producen IL-1 β si se exponen a niveles elevados de glucosa. Los islotes pancreáticos de donantes de órganos no diabéticos, expuestos *in vitro* a altos niveles de glucosa evidenciaron un aumento en la producción y liberación de IL-1 β , seguido de activación de NF-kB, regulación positiva de Fas, fragmentación de ADN y disfunción de las células β dañadas. Además, se ha observado que las células β producen IL-1 β en secciones pancreáticas de individuos con DM2, pero no en individuos no diabéticos⁵⁹. También se demostró en tejido adiposo humano y murino que los niveles altos de glucosa inducen un aumento en la expresión de ARNm y proteína de IL-1 β , mediante la activación de caspasa-1 y TXNIP⁶⁰. En el mismo sentido, otro estudio demuestra que los islotes pancreáticos de ratas con DM2 presentaron una mayor infiltración de macrófagos y una expresión aumentada de IL-1 β , entre otros marcadores proinflamatorios. En esta población, la expresión aumentada de IL-1 β también se observó en otros tejidos, principalmente en el hígado⁶¹.

La expresión de IL-1 β ARNm no se vió afectada significativamente por ninguna de las variables bioquímicas y clínicas analizadas en este trabajo.

Se ha descrito que la regulación de la expresión de IL-1 β es muy compleja, y depende de al menos dos mecanismos independientes, uno a nivel de la activación transcripcional, y otro a nivel de la eficiencia de traducción⁶² con lo cual no puede suponerse una correlación directa entre los niveles de ARNm de IL-1 β y los valores proteína de IL-1 β circulante. Además, al no hallar una asociación unívoca entre los niveles de ARNm de IL-1 β y de proteína IL-1 β circulante queda demostrado que los niveles de IL-1 β circulante se ven afectados también por otros factores que determinan la eficiencia de traducción.

Teniendo en cuenta que la disminución de niveles de glucemia y HbA1c, se asoció a un aumento en la concentración de proteína de IL-1 β circulante, pero no a la expresión de ARNm de IL-1 β , podemos

inferir que la glucemia es uno de los factores que ejercen un claro efecto sobre la expresión de IL-1 β a nivel de la traducción.

Es importante tener en cuenta que la población celular elegida para mensurar las variaciones en la expresión del gen en cuestión, fueron las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), las cuales si bien pueden reflejar cambios en la expresión de genes en células de otros tejidos frente a condiciones patológicas, no son las únicas células capaces de expresar IL-1 β .

Esto podría ser una de las consideraciones a tener en cuenta, al momento de justificar la falta de correlación entre mensajero y proteína. A favor de esta elección, pueden mencionarse trabajos que aseguran que PBMCs, pueden expresar casi el 80% del genoma humano y que muchas proteínas transportadoras presentes en tejidos afectados en Diabetes, son expresadas en PBMCs⁶³.

A pesar de haber asociado positivamente los niveles de IL-1 β circulante y la glucemia, los individuos mostraron un descenso significativo de la glucemia y la HbA1c luego del tratamiento, pero no mostraron cambios significativos en los niveles de IL-1 β circulante, e inclusive los mayores descensos de la glucemia y la HbA1c luego del tratamiento se asociaron a aumentos en los niveles de IL-1 β circulante.

El estrés de retículo endoplásmico (RE) en las células pancreáticas es uno de los mecanismos fisiopatogénicos que determinan el desarrollo de DM2⁶⁴. Se desencadena, entre otras cosas, por el estado de hiperglucemia, y trae como consecuencias una menor producción de insulina y la activación de señales de autofagia. Considerando que los niveles de hiperglucemia puedan tener los mismos efectos sobre el RE de leucocitos mononucleares, al disminuir la glucotoxicidad se favorecería la expresión de proteínas como la IL-1 β . Esto justificaría la asociación negativa encontrada entre los niveles de IL-1 β circulante vs. la glucemia en ayunas y la HbA1c, después del tratamiento, sin relacionarse con cambios en la expresión de ARNm de IL-1 β en leucocitos mononucleares.

Es necesario resaltar que se ha encontrado una asociación muy significativa en el aumento de los niveles séricos de IL-1 β relacionado con la glucemia en ayunas y la HbA1c, después de 6 y 12 meses de tratamiento. Pero ésta asociación no fue suficiente para reafirmar un aumento en niveles séricos de IL-1 β después del tratamiento en nuestra población; ya que se halló una asociación positiva entre los niveles séricos de IL-1 β y la glucemia al comienzo del estudio, y no se correspondió con cambios significativos en los niveles séricos de IL-1 β después del tratamiento.

7. CONCLUSIONES

- La regulación del gen a nivel de la transcripción tiene mecanismos complejos no totalmente dilucidados.
- Se corroboró que existe una asociación entre un polimorfismo en el promotor y la expresión del gen
- Se demuestra por primera vez que la intervención modificó la metilación de ciertos sitios de islas CpG del promotor.
- Se confirmó la asociación positiva entre los mayores niveles de Glucemia en ayunas y los altos niveles circulantes de IL-1 beta.
- Se describe por primera vez una asociación negativa entre los mayores descensos de glucemia y el aumento en los niveles circulantes de proteína.
- No se pudo establecer una correspondencia entre la expresión del gen en células mononucleares de sangre periférica y los niveles circulantes de proteína. Probablemente esto sea debido a que no constituyen la única población celular que la produce.

En base a estos puntos detallados, el presente trabajo abre nuevos caminos de investigación, como por ejemplo:

- Estudiar la expresión del gen en tejido adiposo (otra de las fuentes de IL-1 β circulante).
- Estudiar la expresión en los diferentes tipos celulares de mononucleares (monocitos en particular).
- Estudiar la producción de proteína IL-1 β dentro de este tipo celular.
- Estudiar otros mecanismos epigenéticos como la modificación de Histonas o los miARN.
- Aumentar el N estudiado definiendo estadísticamente el poder de la muestra.

Las personas con T2D constituyen un grupo heterogéneo, lo cual plantea objetivos de tratamiento individualizados. De esta forma, es importante el reconocimiento de nuevos blancos moleculares para el desarrollo de nuevos fármacos, guiando la estrategia terapéutica de forma personalizada (Farmacogenética). Por otro lado, favorecerá la identificación temprana de individuos con alto riesgo, lo que permitirá el desarrollo de estrategias de prevención individualizadas.

8. REFERENCIAS

1. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 2001 Dec 13;414(6865):782-7.
2. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004 May;27(5):1047-53.
3. Zimmet PZ, Magliano DJ, Herman WH, Shaw JE. Diabetes: a 21st century challenge. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014 Jan;2(1):56-64.
4. Golay A, Ybarra J. Link between obesity and type 2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2005 Dec;19(4):649-63.
5. Schargrofsky H, Hernández-Hernández R, Champagne BM, Silva H, Vinueza R, Silva Ayçaguer LC, Touboul PJ, Boissonnet CP, Escobedo J, Pellegrini F, Macchia A, Wilson E; CARMELA Study Investigators. CARMELA: assessment of cardiovascular risk in seven Latin American cities. *Am J Med*. 2008 Jan;121(1):58-65.
6. de Sereday MS, Gonzalez C, Giorgini D, De Loredo L, Braguinsky J, Cobeñas C, Libman C, Tesone C. Prevalence of diabetes, obesity, hypertension and hyperlipidemia in the central area of Argentina. *Diabetes Metab*. 2004 Sep;30(4):335-9.
7. Abelson P, Kennedy D. The obesity epidemic. *Science*. 2004 Jun 4;304(5676):1413.
8. Gallagher EJ, LeRoith D, Karnieli E. The metabolic syndrome-from insulin resistance to obesity and diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008 Sep;37(3):559-79, vii.
9. "Diabetes mellitus" Maximino Ruiz-Akadia editorial-2004.
10. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC Jr, Spertus JA, Costa F; American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. 2005 Oct 25;112(17):2735-52. Epub 2005 Sep 12. Review. Erratum in: *Circulation*. 2005 Oct 25;112(17):e298. *Circulation*. 2005 Oct 25;112(17):e297.
11. Taylor SI, Accili D, Imai Y. Insulin resistance or insulin deficiency. Which is the primary cause of NIDDM? *Diabetes*. 1994 Jun;43(6):735-40.
12. DeFronzo RA. Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes*. 1988 Jun;37(6):667-87.

13. Arteaga A, Maiz A., Olmos P. y Velasco N. Manual de Diabetes y Enfermedades Metabólicas. Depto.Nutrición, Diabetes y Metabolismo. Escuela de Medicina. P. Universidad Católica de Chile. 1997.
14. Marcano Yamileth, Torcat Jeaneth, Ayala Luisa, Verdi Beatriz, Lairer Carolina, Maldonado Merling, de Vegas Josefa. Funciones Endócrinas del Tejido Adiposo. Revisión. Rev Venez Endocrinol Metab 2006; 4(1): 15-21.
15. Prins JB. Adipose tissue as an endocrine organ. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2002 Dec;16(4):639-51.
16. Sjöholm A, Nyström T. Endothelial inflammation in insulin resistance. Lancet.2005 Feb 12-18;365(9459):610-2.
17. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1family. Annu Rev Immunol. 2009;27:519-50.
18. Ramírez-Bello J, Vargas-Alarcón G, Tovilla-Zárate C, Fragoso JM. [Single nucleotide polymorphisms (SNPs): functional implications of regulatory-SNP (rSNP)and structural RNA (srSNPs) in complex diseases]. Gac Med Mex. 2013 Mar-Apr;149(2):220-8.
19. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Vølund A, Ehse JA, Seifert B, Mandrup-Poulsen T, Donath MY. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. N Engl J Med. 2007 Apr 12;356(15):1517-26.
20. Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T. A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. Diabetologia. 2001 Dec;44(12):2115-33.Review. Erratum in: Diabetologia. 2002 Jun;45(6):936.
21. Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka HI, Spinas GA, Kaiser N, Halban PA, Donath MY. Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. J Clin Invest. 2002 Sep;110(6):851-60.
22. Maedler K, Spinas GA, Lehmann R, Sergeev P, Weber M, Fontana A, Kaiser N, Donath MY. Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. Diabetes. 2001 Aug;50(8):1683-90.
23. Ehse JA, Perren A, Eppler E, Ribaux P, Pospisilik JA, Maor-Cahn R, Gueripel X, Ellingsgaard H, Schneider MK, Biollaz G, Fontana A, Reinecke M, Homo-Delarche F, Donath MY. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. Diabetes. 2007 Sep;56(9):2356-70.

24. Fukaya N, Mochizuki K, Shimada M, Goda T. The alpha-glucosidase inhibitor miglitol decreases glucose fluctuations and gene expression of inflammatory cytokines induced by hyperglycemia in peripheral leukocytes. *Nutrition*. 2009 Jun;25(6):657-67.
25. Dasu MR, Devaraj S, Jialal I. High glucose induces IL-1beta expression in human monocytes: mechanistic insights. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007 Jul;293(1):E337-46.
26. Misaki Y, Miyauchi R, Mochizuki K, Takabe S, Shimada M, Ichikawa Y, Goda T. Plasma interleukin-1 β concentrations are closely associated with fasting blood glucose levels in healthy and preclinical middle-aged nonoverweight and overweight Japanese men. *Metabolism*. 2010 Oct;59(10):1465-71.
27. Kallio P, Kolehmainen M, Laaksonen DE, Pulkkinen L, Atalay M, Mykkänen H, Uusitupa M, Poutanen K, Niskanen L. Inflammation markers are modulated by responses to diets differing in postprandial insulin responses in individuals with the metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr*. 2008 May;87(5):1497-503.
28. Motton DD, Keim NL, Tenorio FA, Horn WF, Rutledge JC. Postprandial monocyte activation in response to meals with high and low glycemic loads in overweight women. *Am J Clin Nutr*. 2007 Jan;85(1):60-5.
29. Sauter NS, Schulthess FT, Galasso R, Castellani LW, Maedler K. The antiinflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist protects from high-fat diet-induced hyperglycemia. *Endocrinology*. 2008 May;149(5):2208-18.
30. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Ehses JA, Donath MY, Mandrup-Poulsen T. Sustained effects of interleukin-1 receptor antagonist treatment in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2009 Sep;32(9):1663-8.
31. Joy T, Lahiry P, Pollex RL, Hegele RA. Genetics of metabolic syndrome. *Curr Diab Rep*. 2008 Apr;8(2):141-8.
32. Doria A, Patti ME, Kahn CR. The emerging genetic architecture of type 2 diabetes. *Cell Metab*. 2008 Sep;8(3):186-200.
33. Mariano J. Taverna "Genética de la Diabetes Mellitus No Insulinodependiente" AKADIA Editorial 1997.
34. Kolb H, Mandrup-Poulsen T. The global diabetes epidemic as a consequence of lifestyle-induced low-grade inflammation. *Diabetologia*. 2010 Jan;53(1):10-20.
35. Cook J, Turner R, Family Studies: perspectives on the genetic and environmental determinants of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Causes of Diabetes*. 219-47, 1993.

36. Ogihara T, Mirmira RG. An islet in distress: β cell failure in type 2 diabetes. *J Diabetes Investig.* 2010 Aug 2;1(4):123-33.
37. Fujimoto K, Polonsky KS. Pdx1 and other factors that regulate pancreatic beta-cell survival. *Diabetes Obes Metab.* 2009 Nov;11 Suppl 4:30-7.
38. Pinney SE, Simmons RA. Epigenetic mechanisms in the development of type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab.* 2010 Apr;21(4):223-9.
39. Ling C, Groop L. Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. *Diabetes.* 2009 Dec;58(12):2718-25.
40. Hashimoto K, Oreffo RO, Gibson MB, Goldring MB, Roach HI. DNA demethylation at specific CpG sites in the IL1B promoter in response to inflammatory cytokines in human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2009 Nov;60(11):3303-13.
41. Dhingra R, Gona P, Nam BH, D'Agostino RB Sr, Wilson PW, Benjamin EJ, O'Donnell CJ. C-reactive protein, inflammatory conditions, and cardiovascular disease risk. *Am J Med.* 2007 Dec;120(12):1054-62.
42. Ogino S, Gulley ML, den Dunnen JT, Wilson RB; Association for Molecular Pathology Training and Education Committee. Standard mutation nomenclature in molecular diagnostics: practical and educational challenges. *J Mol Diagn.* 2007 Feb;9(1):1-6. Erratum in: *J Mol Diagn.* 2009 Sep 1;11(5):494.
43. McNeely T. Pyrosequencing AB. *Pharmacogenomics.* 2003 Mar;4(2):217-21.
44. Neve B, Froguel P, Corset L, Vaillant E, Vatin V, Boutin P. Rapid SNP allele frequency determination in genomic DNA pools by pyrosequencing. *Biotechniques.* 2002 May;32(5):1138-42.
45. Tost J, Dunker J, Gut IG. Analysis and quantification of multiple methylation variable positions in CpG islands by Pyrosequencing. *Biotechniques.* 2003 Jul;35(1):152-6.
46. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods.* 2001 Dec;25(4):386-401.
47. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002 May 1;30(9):e36.
48. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* 2005 Jun;6(4):279-84.

49. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 2004 Aug 1;64(15):5245-50.
50. Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct method. *Methods*, 25, 402–408, 2001.
51. Fradin D, Bougnères P. T2DM: Why Epigenetics? *J Nutr Metab.* 2011;2011:647514.
52. Sun J, Wang Y, Cui W, Lou Y, Sun G, Zhang D, Miao L. Role of Epigenetic Histone Modifications in Diabetic Kidney Disease Involving Renal Fibrosis. *J Diabetes Res.* 2017;2017:7242384.
53. Landvik NE, Hart K, Skaug V, Stangeland LB, Haugen A, Zienolddiny S. A specific interleukin-1B haplotype correlates with high levels of IL1B mRNA in the lung and increased risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis.* 2009 Jul;30(7):1186-92.
54. Wen AQ, Gu W, Wang J, Feng K, Qin L, Ying C, Zhu PF, Wang ZG, Jiang JX. Clinical relevance of IL-1beta promoter polymorphisms (-1470, -511, and -31) in patients with major trauma. *Shock.* 2010 Jun;33(6):576-82.
55. Hall SK, Perregaux DG, Gabel CA, Woodworth T, Durham LK, Huizinga TW, Breedveld FC, Seymour AB. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein. *Arthritis Rheum.* 2004 Jun;50(6):1976-83.
56. Wen AQ, Wang J, Feng K, Zhu PF, Wang ZG, Jiang JX. Effects of haplotypes in the interleukin 1beta promoter on lipopolysaccharide-induced interleukin 1beta expression. *Shock.* 2006 Jul;26(1):25-30.
57. Misaki Y, Miyauchi R, Mochizuki K, Takabe S, Shimada M, Ichikawa Y, Goda T. Plasma interleukin-1 β concentrations are closely associated with fasting blood glucose levels in healthy and preclinical middle-aged nonoverweight and overweight Japanese men. *Metabolism.* 2010 Oct;59(10):1465-71.
58. Li J, Huang M, Shen X. The association of oxidative stress and pro-inflammatory cytokines in diabetic patients with hyperglycemic crisis. *J Diabetes Complications.* 2014 Sep-Oct;28(5):662-6.

59. Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka HI, Spinas GA, Kaiser N, Halban PA, Donath MY. Glucose-induced β cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest*. 2017 Apr 3;127(4):1589.
60. Koenen TB, Stienstra R, van Tits LJ, de Graaf J, Stalenhoef AF, Joosten LA, Tack CJ, Netea MG. Hyperglycemia activates caspase-1 and TXNIP-mediated IL-1beta transcription in human adipose tissue. *Diabetes*. 2011 Feb;60(2):517-24.
61. Ehses JA, Lacraz G, Giroix MH, Schmidlin F, Coulaud J, Kassis N, Irminger JC, Kergoat M, Portha B, Homo-Delarche F, Donath MY. IL-1 antagonism reduces hyperglycemia and tissue inflammation in the type 2 diabetic GK rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 18;106(33):13998-4003.
62. Schindler R, Clark BD, Dinarello CA. Dissociation between interleukin-1 beta mRNA and protein synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *J Biol Chem*. 1990 Jun 25;265(18):10232-7.
63. Liew CC, Ma J, Tang HC, Zheng R, Dempsey AA. The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. *J Lab Clin Med*. 2006 Mar;147(3):126-32.
64. Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev*. 2008 Feb;29(1):42-61.