

SPANISH SUMMARY

El sistema inmune está compuesto por un complejo grupo de moléculas, células y tejidos con diversas funciones beneficiosas tales como la defensa contra patógenos y tumores a través de reacciones inflamatorias y reparación de tejidos. Sin embargo, las respuestas inmunes inflamatorias excesivas son la causa de alergias, auto-inflamación y enfermedades-autoinmunes.

En esta tesis nos centramos sobre todo en un grupo especial de células del sistema inmune; los fagocitos mononucleares, y más específicamente en los monocitos de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Los monocitos humanos constituyen el 2-10% de todos los leucocitos en la sangre periférica; normalmente expresan el marcador de superficie celular CD14. Los monocitos son los precursores de los macrófagos quienes son reconocidos como agentes fisiopatológicos en los procesos inflamatorios crónicos tales como la obesidad, el síndrome metabólico (SM) y DM2. Dependiendo del estímulo, los macrófagos pueden diferenciarse en dos fenotipos distintos (macrófagos M1 y M2). Los macrófagos M1 (también llamados macrófagos clásicamente activados) expresan numerosos mediadores pro-inflamatorios como TNF- α , IL-1, IL-6, especies reactivas del nitrógeno y del oxígeno. Estas sustancias poseen una fuerte actividad microbicida y tumoricida. Por el contrario, los macrófagos M2 (también llamados macrófagos activados alternativamente) expresan moléculas y factores de crecimiento asociados con reacciones anti-inflamatorias, de reparación de tejidos y de remodelación.

Un incremento patológico de tejido adiposo, especialmente el tejido visceral provoca la activación de células inmunitarias innatas y adaptativas locales que inducen la producción de quimiocinas y citoquinas pro-inflamatorias. Estas quimiocinas/citoquinas se vierten en la circulación y son capaces de inactivar los receptores de insulina en múltiples tipos de células, incluyendo las células musculares y hepáticas. Como consecuencia se induce una resistencia a la insulina e inevitablemente DM2. La disfunción del tejido adiposo se manifiesta no sólo para la secreción de citoquinas (ej. TNF- α , IL-6, IL-1 β , PAI 1) y quimiocinas (CCL2, CCL4, CCL20, CXCL14), sino también por la secreción de adipoquinas proinflamatorias (ej. leptina). Este patrón de secreción proinflamatorio en el tejido adiposo se perpetúa crónicamente, provocando una retroalimentación positiva de inflamación.

La prevalencia de obesidad, SM y DM2 está aumentando de manera exponencial en Ecuador al igual que en todo el mundo. Los factores sociales parecen ser los factores inductores más importantes para el desarrollo de esta enfermedad. La prevalencia de la enfermedad aumenta con la edad y es particularmente alta en la población más vieja,

alcanzando una prevalencia del 10% en los grupos de 50-59 años. En las zonas urbanas la prevalencia oscila entre el 7 y el 8%, mientras que en las zonas rurales es sólo de 1 a 2%.

Los microARNs son importantes reguladores de la traducción y estabilidad del ARN mensajero (ARNm). Estas moléculas regulan negativamente la expresión génica a nivel post-transcripcional reprimiendo la traducción o degradando el ARNm. Los microARNs han sido altamente conservados durante la evolución, actualmente casi 2.000 microARNs maduros se han identificado en el ser humano. La desregulación de los microARNs ha sido implicada en el desarrollo de SM y DM2. Varios factores inflamatorios parecen inducir la expresión selectiva de microARNs en monocitos/ macrófagos, que a su vez afectan funcionalmente la expresión de varias proteínas implicadas en la cascada inflamatoria. Además, se han sugerido que los patrones de expresión de microARNs circulantes en suero/ plasma podría tener un valor predictivo como biomarcadores de diabetes.

El primer objetivo de los estudios descritos en esta tesis fue establecer un patrón de microARNs en monocitos de pacientes con DM2 que sea capaz de distinguir a los pacientes de los controles no diabéticos (estudio de biomarcadores); en segundo lugar nuestro objetivo fue correlacionar la expresión alterada de microARNs, genes y moléculas pro-inflamatorias de los monocitos y del suero de los pacientes entre sí, y con las características clínicas para entender mejor los procesos patogénicos de esta enfermedad.

En la primera parte del capítulo 3 se describe un estudio de microarray (Exiqon) en monocitos de 34 pacientes con DM2 reclutados en el Centro de Diabetes en Alemania, Düsseldorf (n = 10) y en tres centros médicos en Quito, Ecuador (n = 24) en el año 2009. En este estudio, identificamos 142 microARNs significativamente expresados; de los cuales 15 fueron capaces de discriminar entre pacientes y controles. Sin embargo, utilizando este método sólo pudimos hacer una separación parcial entre casos y controles (sensibilidad 66% y especificidad 90%). A partir de entonces continuamos utilizando los microARNs como bio-marcadores para determinar la función y el estado inflamatorio de los monocitos circulantes en pacientes diabéticos. Optamos por seleccionar los microARNs con diferencias más significativas (Fold Change de > 1,4 o <0,6). Los microARNs que cumplieron con este criterio de selección fueron miR-138; miR-34c-5p; miR-410; miR-574-3p y miR-576-3p. Adicionalmente, determinamos la expresión del miR-146a y miR-155, ya que estos microARNs son conocidos reguladores de inflamación, y han sido identificados en células mononucleares periféricas de pacientes diabéticos. Utilizando PCR en tiempo real (TaqMan) en un nuevo grupo de "validación"; 64 pacientes con DM2 (edad media=61; IMC=29,5; hipercolesterolemia=63% y LDL elevada 44%) y 44 controles sanos (edad media=53; IMC=28,7; hipercolesterolemia = 68% y LDL elevada 50%) fueron

reclutados en cuatro centros médicos en Quito, Ecuador desde 2009 hasta 2012. El microARN-34c-5p fue validado como significativamente sobreexpresado en los monocitos de pacientes con DM2. Una de las funciones de este microARN es regular la expresión de c-Met, el receptor del factor de crecimiento hepático (HGF). Además, este microARN participa en diversos procesos celulares, tales como crecimiento, apoptosis e invasión de células tumorales. Adicionalmente, en estos estudios determinamos la expresión de 24 genes en los monocitos de pacientes con DM2. Seleccionamos un primer grupo de 13 genes que codifican para la expresión de citoquinas y moléculas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF- α , TNFAIP3, PTGS2, CCL20, PTX3, PDE4B, DUSP2, ATF3, CXCL2 y BCL2A1); y un segundo grupo que comprende 12 genes con funciones de quimiotaxis, adhesión y motilidad (CCL2, CCL7, MAPK6, NAB2, CD9, STX1A, EMP-1, CDC42, PTPN7, DHRS3, FABP5, HSPA1A). Observamos la sobreexpresión de 3 ARNm (CD9, DHRS3 y PTPN7) pertenecientes al segundo grupo. Dado que los ARNm anormalmente expresados y el microARN-34c-5p cumplen importantes funciones en el cambio de morfología celular, adhesión y diferenciación celular; suponemos que los monocitos de los pacientes ecuatorianos con DM2 están involucrados en tales procesos. Creemos que los monocitos de estos pacientes podrían ser células pro-angiogénicas.

En general en los monocitos de los pacientes diabéticos ecuatorianos no encontramos una sobreexpresión de genes inflamatorios clásicos. Uno de los genes inflamatorios clásicos (ej. TNFAIP3) sólo fue expresado en los monocitos de pacientes con valores normales de lípidos. Sorprendentemente, en casos de dislipidemia, encontramos una reducción significativa de la expresión de genes inflamatorios (ej. ATF3, DUSP2 y PTGS2). Por lo tanto suponemos que los monocitos circulantes de pacientes ecuatorianos con dislipidemia son capaces de diferenciarse en células pro-angiogénicas con un perfil anti-inflamatorio.

El factor de crecimiento hepático (HGF) es una molécula que también ha sido relacionada con DM2. Esta molécula tiene propiedades angiogénicas y se la utiliza como un marcador de células pro-angiogénicas. Debido a los hallazgos antes descritos, también determinamos la expresión de HGF en los monocitos de los pacientes diabéticos (capítulo 3). Encontramos una importante sobreexpresión de HGF en los monocitos que correlacionó con el segundo grupo de genes.

Adicionalmente, en nuestros estudios también determinamos los niveles séricos de 12 compuestos relacionados con DM2 comercialmente disponibles (TNF α , IL-1 β , IL-6, NGF, HGF, PAI, resistin, CCL2, adiponectin, leptin, IL-8 y CCL4) y la expresión de los microARNs antes mencionados en el suero de los pacientes ecuatorianos del grupo de validación (Capítulo 4 y 5). En este estudio observamos una disminución del nivel sérico del microARN anti-inflamatorio 146a; un incremento del nivel de la citoquina pro-inflamatoria IL-8

y un incremento sérico del factor de crecimiento HGF. Notablemente, debido a que los controles no diabéticos tuvieron un índice de obesidad y dislipidemia comparable con los pacientes, estas moléculas séricas pueden servir como marcadores discriminantes de la falta de control de la glucosa en pacientes diabéticos.

En el capítulo 5, describimos un estudio en el cual comparamos los niveles séricos de los microARNs y los compuestos de activación/inflamatoria inmune con los niveles de expresión de microARNs y genes en monocitos circulantes de los pacientes con DM2. El objetivo de este estudio fue comprobar si los monocitos circulantes son la fuente de secreción de esas moléculas que son vertidas en el suero. Encontramos la expresión de HGF significativamente elevado en el suero y en los monocitos de los pacientes. Sin embargo no hubo una correlación positiva de expresión entre estos dos compartimentos. Tampoco encontramos correlación entre los niveles de citoquinas pro-inflamatorias y los 6 microARNs del suero y los monocitos. Los monocitos de pacientes ecuatorianos con DM2 mostraron en general una reducción de la expresión de los genes pro-inflamatorios típicos, mientras que los genes y microARN implicados en adhesión celular, diferenciación celular, crecimiento y reparación vascular (ej. HGF y miR-34c-5p) estuvieron sobre expresados. En el suero de estos pacientes, en contraste, encontramos signos de actividad pro-inflamatoria (ej. incremento de IL-8 y disminución de miR-146a). Estos hallazgos sugieren que la dinámica de los cambios relacionados con la inflamación en el compartimento intracelular (monocitos) y el suero tiene su propia dinámica. Al parecer diferentes mecanismos fisiopatológicos inducen la activación o desactivación de los procesos inflamatorios.

En la sección de discusión presentamos y comparamos los datos de los pacientes ecuatorianos con algunos hallazgos preliminares de pacientes holandeses con DM2 ($n = 28$) y sus respectivos controles no diabéticos ($n = 22$). El objetivo de esta comparación fue comprobar si también existía una disminución del estado inflamatorio en los monocitos y en el suero de los pacientes holandeses. Observamos, que en el suero de los pacientes diabéticos holandeses hubo una alta expresión de las citoquinas pro-inflamatorias clásicas (IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-8 y CCL4) en comparación con los pacientes ecuatorianos. Además es importante destacar que los niveles de leptina (molécula proinflamatoria) fueron casi tres veces mayor en los pacientes holandeses; por el contrario, los niveles de adiponectin (molécula antiinflamatoria) fueron dos veces más altos en los pacientes diabéticos ecuatorianos.

También analizamos la expresión de los genes seleccionados en los monocitos de los pacientes holandeses. Encontramos que la expresión de los compuestos inflamatorios que pertenecen al grupo A y B tales como CXCL2, PTX3, IL-6, IL1 β , CCL2, y CCL20 estuvieron

significativamente sobreexpresado en pacientes holandeses. Por el contrario, en pacientes ecuatorianos hubo una sobreexpresión de los genes del grupo C (genes de adhesión, motilidad y diferenciación celular), que fueron estadísticamente significativos para CD9, DHRS3 y HGF. En los monocitos de los pacientes holandeses además encontramos una elevada expresión de resistin así como el microARN-410, los cuales difirieron en los pacientes ecuatorianos.

Al fin de esta sección exploramos las posibles causas de las diferencias encontradas en los pacientes ecuatorianos en comparación con pacientes holandeses; hacemos referencia a las diferencias étnicas en los niveles de secreción de leptina, la deficiencia de micronutrientes en pacientes ecuatorianos (vitamina A, hierro y zinc), la infección crónica por helmintos en pacientes ecuatorianos (hipótesis de la higiene), y la afectación del Sistema Inmune en poblaciones que viven en grandes alturas (Andes). El efecto de la medicación también pudo haber causado las diferencias encontradas ya que todos los pacientes holandeses estuvieron tratados con estatinas, y los pacientes ecuatorianos no.