



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DETERMINACIÓN DE LA ABUNDANCIA RELATIVA DE RNA_m DE GENES
INVOLUCRADOS EN INFLAMACIÓN Y METABOLISMO DE HIERRO EN
CÉLULAS MONONUCLEARES PERIFÉRICAS DE SUJETOS OBESOS,
DIABÉTICOS Y OBESO/DIABÉTICOS

DANIELA ISABEL HORMAZÁBAL MUÑOZ

Memoria para optar al Título

Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Fomento de la Producción Animal

PROFESOR GUÍA: MIGUEL ARREDONDO OLGUÍN

Financiamiento Fondecyt 1110080

SANTIAGO, CHILE

2014



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DETERMINACIÓN DE LA ABUNDANCIA RELATIVA DE RNAm DE GENES
INVOLUCRADOS EN INFLAMACIÓN Y METABOLISMO DE HIERRO EN
CÉLULAS MONONUCLEARES PERIFÉRICAS DE SUJETOS OBESOS,
DIABÉTICOS Y OBESO/DIABÉTICOS

DANIELA ISABEL HORMAZÁBAL MUÑOZ

Memoria para optar al Título

Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Fomento de la Producción Animal

PROFESOR GUÍA: MIGUEL ARREDONDO OLGUÍN	NOTA	FIRMA
PROFESOR CORRECTOR: DRA. MARIA SOL MORALES	NOTA	FIRMA
PROFESOR CORRECTOR: DRA. CAROLINA VALENZUELA	NOTA	FIRMA

SANTIAGO, CHILE

2014

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer la invaluable ayuda de todos aquellos, que directa o indirectamente, colaboraron en la realización de mi memoria de título.

Deseo agradecer especialmente al Profesor Miguel Arredondo y a todos los integrantes del laboratorio de Micronutrientes del INTA, en especial a mi amiga, Ingrid Acevedo, por su constante compañía, paciencia y enseñanzas.

Al Doctor Luis Alberto Raggi, por su incondicional comprensión y apoyo en momentos difíciles.

A la Sra. Susana Venegas, por su noble amistad y a la Sra. Estela Lagos por su ayuda y apoyo permanentes.

Especialmente quiero agradecer a todas aquellas personas con quienes formé entrañables lazos de amistad durante mi vida universitaria, con ellos compartí una de las etapas más importantes de mi vida, sobre todo a mi gran amigo y compañero de estudios, Christian Leiva.

Y por último, a mi familia, mi madre, hermana y principalmente a la personita que me dio el impulso final y las fuerzas para terminar lo que me parecía imposible, mi amada hija Valentina.

RESUMEN

Para determinar si la condición de diabetes y/u obesidad está definida por la variación en la expresión de genes relacionados al metabolismo de Fe e inflamación se estudió la abundancia relativa de RNAm de Hecpcidina, IL-6, TNF- α , TLR2, TLR4 y NF- κ B en células mononucleares periféricas (CMPs) de individuos obesos (OB), diabéticos (DM), diabéticos obesos (OBDM) y controles (Cn), de sexo masculino, mayores de 30 años. Se estudió a 173 individuos, pertenecientes a cuatro grupos: OB, OBDM, DM y Cn. Se les extrajo una muestra de sangre y se aislaron CMPs. Luego, se extrajo RNA total, que fue cuantificado con espectrofotometría y su integridad analizada por electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente, se sintetizó cDNA con transcriptasa reversa y finalmente se realizó PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR) para medir la abundancia relativa de los genes en estudio.

Individuos OB, DM y OBDM presentaron expresión alterada de genes IL-6, TNF- α , NF- κ B, TLR2, TLR4 y hepcidina con respecto a Cn. Esto explicaría el estado inflamatorio y hace constante la resistencia a la insulina que precede a la diabetes. La presencia de inflamación explicaría la aumentada expresión de hepcidina en el grupo OB. Sin embargo, en el grupo OBDM, la condición de diabetes propiamente tal, podría influir sobre la expresión de hepcidina, inhibiendo la mayor expresión del gen con respecto al grupo Cn.

Se puede concluir que individuos OB y OBDM presentan un estado inflamatorio crónico que predispone y perpetúa la resistencia a la insulina y que modifica la distribución del Fe corporal.

Palabras clave: Hierro, inflamación, diabetes mellitus, obesidad.

ABSTRACT

Relative abundance of mRNA of genes involved in inflammation and iron metabolism in peripheral mononuclear cells from obese, diabetic and obese diabetic subjects

To determine whether the condition of diabetes and/or obesity are defined by the variation in the expression of genes related to iron metabolism and inflammation, we studied the relative abundance of mRNA of Hecpidin, IL-6, TNF- α , TLR2, TLR4 and NF- κ B genes in mononuclear cells from obese, diabetic, obese diabetics and controls subjects, male, aged 30 years. We studied 173 individuals, separated in 4 groups: obese (OB), obese diabetic (OBDM), diabetic (DM) and controls (Cn). Peripheral mononuclear cells (PMCs) were isolated from blood sample and then total RNA was extracted, quantified by UV spectrophotometry and its integrity analyzed by agarose gel electrophoresis. DNase digestion was carried out to remove undesired fractions of DNA and then cDNA was synthesized with reverse transcriptase. A quantitative real time PCR (qRT-PCR) was performed to measure the relative abundance of each gene under study.

Obese and obese diabetic individuals have a chronic inflammatory state predisposing and perpetuating insulin resistance. Individuals in groups OB, DM no OB and OBDM had altered genes expression of IL-6, TNF- α , NF- κ B, TLR2, TLR4 and hepcidin compared to control group. This could explain the constant inflammatory state and causes insulin resistance that precedes diabetes.

The condition of diabetes in OBDM group might have some influence in hepcidina mRNA expression, preventing its increase compared to control group.

Keywords: Iron, inflammation, diabetes mellitus, obesity.

INTRODUCCIÓN

El hierro (Fe) es un micronutriente esencial que interviene en numerosos procesos bioquímicos y fisiológicos (Boccio *et al.*, 2003). Los alimentos son su fuente primaria y natural. Forma parte de dos grupos: Fe hemínico (presente en hemoglobina, mioglobina, citocromos y otras hem proteínas de alimentos de origen animal) y Fe no hemínico (formado por sales inorgánicas, presente en alimentos de origen vegetal). La absorción del Fe ocurre en duodeno y yeyuno superior y su metabolismo y balance están controlados por variados mecanismos de captación, transporte y almacenamiento. A diferencia del resto de los minerales trazas, la homeostasis del Fe está regulada a través de su absorción y no de su eliminación o excreción (Boccio *et al.*, 2003).

La obesidad se define como un exceso de grasa corporal acompañada de un estado pro-inflamatorio crónico leve (Cancelo *et al.*, 2005). En obesidad y diabetes mellitus tipo 2 (DM2) se establece una hipo-ferremia o “anemia de procesos crónicos o inflamatorios”, explicada por el estado de inflamación crónica producida por ambas patologías, derivada de la expansión del tejido adiposo con microambientes hipóxicos que estimularían la expresión de citoquinas inflamatorias, modificando la distribución de Fe sistémico (Forrellat *et al.*, 2002).

La DM2 es un síndrome crónico de desequilibrio metabólico de carbohidratos, proteínas y grasas, causado por insuficiente secreción de insulina y/o defectos en su acción en tejidos debido a la insulino resistencia (IR). La activación de mediadores de inflamación está entre las causas comunes de DM2 en condiciones de obesidad. La obesidad e IR están asociadas a un estado inflamatorio leve debido a la activación crónica del sistema inmune innato (Fomusi, 2010). Se ha sugerido que el Fe también juega un rol en el desarrollo de DM2 y sus complicaciones, ya que los individuos con altos niveles de ferritina sérica, Fe sérico y actividad enzimática de hem oxigenasa (HO), presentan mayor predisposición a desarrollar DM2 (Arredondo *et al.*, 2007).

En el presente trabajo, se estudió la variación en la abundancia relativa de RNAm de genes asociados a inflamación (IL-6, TNF- α , NF- κ B, TLR2 y TLR4) y metabolismo de Fe (hepcidina) en células mononucleares periféricas (CMPs) de sujetos obesos, diabéticos y obesos diabéticos, con el fin de determinar si la condición de cada individuo está determinada por la variación en la expresión de estos genes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación corresponde a un estudio descriptivo transversal cuya muestra fue obtenida por muestreo por conveniencia. El estudio se realizó en el Laboratorio de Micronutrientes, del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile. Participaron 173 individuos provenientes del Hospital San Borja Arriarán, todos de sexo masculino, mayores de 30 años y divididos en cuatro grupos: 1) Obesos (OB: $IMC > 30 \text{ kg/mt}^2$; $n=48$); 2) Diabéticos tipo 2 no obesos (DM: $IMC < 26 \text{ kg/mt}^2$; $n=40$); 3) Obesos diabéticos tipo 2 (OBDM: $n=42$) y 4) Grupo control (Cn: $IMC < 26 \text{ kg/mt}^2$; $n=43$). Los grupos DM con y sin obesidad, fueron reclutados en el Consultorio de Diabetes del Hospital San Borja Arriarán. Los grupos Cn y OB en el Consultorio CEDINTA, INTA. Cada individuo presentó un examen físico normal, sin historial de hemorragias intestinales o hepatitis, sin consumo de suplementos vitamínicos y alimenticios, ni ser vegetariano. El protocolo y los procedimientos fueron aprobados por el Comité de ética del INTA y por el Comité de Ética del Servicio de Salud Metropolitano Central. Todos los participantes firmaron un consentimiento informado, donde se explicó en detalle los procedimientos del estudio antes de participar.

1) Antropometría, composición corporal y presión arterial.

A todos los sujetos se les midió peso, talla y circunferencia de cintura (Le Blanc *et al.*, 2012). Se realizaron mediciones de presión arterial sistólica y diastólica según la Asociación Americana del Corazón (American Heart Association; National Institute of Health, 2003). Fueron excluidos del estudio sujetos con anemia por deficiencia de Fe (concentraciones de hemoglobina $< 130 \text{ g/L}$); sujetos que utilizaran medicamentos que afecten el metabolismo de Fe; sujetos vegetarianos y con manifestación clínica inflamatoria o infecciosa. Se encuestó a cada individuo para conocer su estado general de salud y tener antecedentes familiares de enfermedades.

2) Parámetros bioquímicos

A cada participante se le tomó una muestra sanguínea de 20 mL, donde 3 mL se utilizaron para perfil hematológico (Contador celular CELL-DYN 1700, ABBOTT Diagnostics); 7 mL para perfil bioquímico, determinación de glucosa (kit comercial, método glucosa oxidasa), insulina (RIA), perfil lipídico y perfil hepático y 10 mL para obtención de CMPs. A los sujetos Cn y OB se les determinó glucosa e insulina pre y post

carga de 70 g de glucosa y a los pacientes DM y OBDM sólo glicemia e insulina de pre-carga. Se utilizó como criterio de estado inflamatorio los niveles de proteína C reactiva de alta sensibilidad (QuikRead CRP, Orion Diagnostica; límite superior 1 mg/dL).

3) Estado nutricional de Fe

Se determinó Fe sérico por Espectrofotometría de Absorción Atómica (AAS) con horno de grafito (Perkin Elmer, Simaa 6100); hemoglobina y volumen corpuscular medio (Contador electrónico celular CELL-DYN 1700, ABBOTT Diagnostics), capacidad total de fijación del Fe y porcentaje de saturación de transferrina, utilizando método colorimétrico (Fisher *et al.*, 1964), protoporfirina eritrocitaria libre (ZP Hematofluorímetro, modelo 206D, AVIV Biomedical Inc.) y ferritina sérica por enzima inmuno ensayo.

4) Obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMPs)

Fueron aisladas desde sangre por filtración en gradientes de Ficoll-Hystopaque (Le Blanc *et al.*, 2012). La sangre se diluyó en razón 1:1 con buffer fosfato salino estéril (PBS, pH 7.4), luego sedimentados en Histopaque 1077, densidad: 1.119 (Sigma Diagnostic, St. Louis, MO) y centrifugados a 400 g por 35 min a temperatura ambiente. El sedimento con las CMPs se lavó en PBS y se centrifugó a 180 g por 10 min. Luego se lavó con medio RPMI-1640 (Invitrogen Life Technology, Carlsbad, CA) y finalmente, las CMPs se resuspendieron en 500µL de medio RPMI-1640.

5) Obtención de RNA total y PCR cuantitativo en tiempo real (q-RT PCR).

La extracción de RNA se realizó según Le Blanc *et al.*, (2012), desde CMPs homogeneizadas en Tri-Reagent® (Ambion) e incubadas 15 min a T° ambiente. Se adicionó 0,2 volúmenes de cloroformo, se agitó e incubó 10 min a T° ambiente. La solución fue centrifugada a 12.000 g por 15 min a 4°C y el RNA se recuperó desde la fase acuosa. El RNA se precipitó con 0,5 volúmenes de alcohol isopropílico e incubó 10 min a T° ambiente y se centrifugó a 12.000 g por 8 min a 4°C. El “pellet” fue lavado con 1 volumen de etanol 75%. Se agitó en vórtex 5 a 10 segundos y se centrifugó a 14.000 g por 7 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se secó a T° ambiente. Finalmente, el RNA fue resuspendido en agua libre de nucleasas. Se realizó digestión de RNA con DNAsa (200U de DNAsa I; Turbo DNAsa-free, Ambion) e inhibidor de RNAsa (40U RNAsin, Promega). La reacción se realizó por 20 min a 37°C y la enzima se inactivó con DNase inactivation reagent (Ambion), se centrifugó a 12.000 g durante 2 min.

Para verificar calidad e integridad del RNA, alícuotas de RNA total (1 μ l) fueron diluidas en agua (99 μ l) y cuantificadas a 260nm (Biowave DNA WPA). La integridad fue verificada por electroforesis en geles de agarosa 2% en tampón MOPS 10X, formaldehído 37% v/v, formamida desionizada 1X. Los geles fueron teñidos con bromuro de Etidio 0,1% y las bandas observadas en transiluminador de luz ultravioleta (Vilber Lourmat). Los geles fueron fotografiados con cámara Kodak Dc-290 para su registro y análisis. La calidad del RNA fue evaluada mediante la razón de absorbancias 260/240nm (relación entre ácidos nucleicos y fenoles) y razón de absorbancias 260/280nm (relación entre ácidos nucleicos y proteínas).

El cDNA de hebra simple fue sintetizado usando como templado RNA total (1,5 μ g). El RNA se incubó con 0,5 μ g de partidador oligo-dT (Promega), por 5 min a 70°C. Luego, se agregó enzima transcriptasa reversa M-MLV (200U; Promega) y 12,5 μ M de dNTP (Promega) y se incubó a 42°C durante 90 minutos, posteriormente se inactivó la enzima a 70°C por 15 min. El cDNA fue guardado a -20°C.

La abundancia relativa de los genes se determinó mediante PCR cuantitativo en tiempo real (“kit” Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG, Invitrogen). Cada reacción de amplificación se realizó utilizando 12 ng de cDNA, 2,5mM de cada partidador, 3 mM de MgCl₂, 0,75 μ g de BSA y 7,5 μ L de SYBR Green-mix, en 15 μ L de reacción total. Las reacciones del qPCR se realizaron en termociclador “Light Cycler Instrument” (Roche) y el programa de amplificación “Light Cycler” v.3.5 (Roche), con una fase de activación a 50°C durante 120 s y luego 95°C por 120 s. Luego, fase de amplificación de 40 ciclos que incluye alineamientos de partidadores de 15 s a 60°C, elongación por 15 s a 72°C y separación por 5 s a 95°C. Posteriormente, se realizó una fase de fusión (“melting”) con 15 s a 60°C y luego un incremento de 0,1°C/s hasta los 99°C. Finalmente, una fase de enfriamiento desde 99°C hasta 40°C con disminución de 15°C/s. La expresión de los RNAm de los genes de gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GADPH) y beta-2-microglobulina (B2M) fueron usados como genes normalizadores controles. La eficiencia de amplificación de los partidadores se calculó con el “software Linreg PCR”. La medida de la abundancia de cada transcrito se calculó a partir de la ecuación 1, que relaciona la eficiencia de amplificación de los partidadores del gen de interés (E^f_x) y gen normalizador (E^f_{HK}), con los ciclos umbrales del gen normalizador (C^t_{HK}) y gen de interés (C^t_x).

$$\text{Ec. 1: Expresión relativa} = \left\{ \frac{((^{\text{Ef}}\text{X})^{\text{Ct}}\text{X}))}{((^{\text{Ef}}\text{HK})^{\text{Ct}}\text{HK}))} \right\} * 100$$

Partidores utilizados:

GENES	PARTIDORES (5' y 3')
Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GADPH)	CCAGCAAGAGCACAAAGAGGA TCAAGGGGTCTACATGGCAA
Beta-2-microglobulina (B₂M)	GATGCCGCATTTGGATTGGA TGGAGCAACCTGCTCAGATA
Hepcidina	GACACCAGAGCAAGCTCAA GAAAACAGAGCCACTGGTCA
Factor nuclear kappa-B (NF-κB)	TGCATCCAAAGGTGCTCAGA GCAGCTGGCAAAGCTTAGTA
Interleucina-6 (IL-6)	ATGTCTGAGGCTCATTCTGC GCGGCTACATCTTTGGAATC
Factor de Necrosis Tumoral-α (TNF-α)	GTTCTCAGCCTCTTCTCCT ACAACATGGGCTACAGGCTT
Receptor tipo Toll 2 (TLR2)	AGATGCCTCCCTCTTACCCATGTT AAGACTTTGGCCAGTGCTTGCT
Receptor tipo Toll 4 (TLR4)	AGGAACAGTGGGTACAGGATGCAA TCACCCTTAGCATAAGGCCTGACA

6) Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad Prisma 5.0. Se realizó análisis de normalidad de las variables (Test de Shapiro-Wilk). Los resultados para las pruebas bioquímicas fueron expresados como promedio ± desviación estándar (DE) y para expresión génica como promedio ± error estándar de la media (EEM). Para las variables normales se realizó test de ANOVA de una vía con post hoc de Dunnett's (para comparar con el grupo control) o Bonferroni (para comparar entre los distintos grupos). Para variables no paramétricas los resultados fueron expresados como promedio geométrico + rango (± 1 DE) y se utilizó análisis de Kruskal Wallis con post hoc Dunn's. Se consideró estadísticamente significativas las diferencias con un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

1) Antropometría, composición corporal y presión arterial.

Los individuos DM y OBDM presentaron mayores edades, siendo diferentes con respecto a los Cn (ANOVA una vía, post test Dunnett's $p < 0,001$). Los grupos de OB y OBDM mostraron mayor peso, mayor IMC, mayor circunferencia de cintura, mayor presión sistólica y diastólica (Tabla 1).

2) Parámetros bioquímicos

Los niveles de glicemia, como era de esperarse, fueron mayores en individuos DM y OBDM (ANOVA una vía, post test Dunnett's $p < 0,001$). La insulina basal fue mayor sólo en OBDM en comparación a Cn (ANOVA una vía, post test Dunnett's $p < 0,001$). Solamente el colesterol HDL y los triglicéridos fueron diferentes con respecto a los controles (ANOVA una vía, post test Dunnett's $p < 0,001$). Los niveles de proteína C reactiva ultrasensible (PCRus) fueron mayores en los pacientes OB y OBDM (ANOVA una vía, post test Dunnett's $p < 0,001$) (Tabla 2).

3) Estado nutricional de Fe

Los parámetros hematológicos mostraron que los niveles de hemoglobina no presentaron diferencias significativas entre los grupos ($p > 0,05$). La zinc protoporfirina (Zpp) fue mayor en individuos DM y OBDM (ANOVA una vía, post test Dunnett's $p < 0,002$). Se observó mayor concentración de Fe sérico en OBDM. Sólo la capacidad total de fijación de Fe (TIBC) fue menor en OB y OBDM (ANOVA una vía, post test Dunnett's $p < 0,001$). El nivel de ferritina sérica fue significativamente mayor sólo en OBDM con respecto al grupo Cn (ANOVA una vía, post test Dunnett's $p < 0,008$). La actividad de la enzima hem oxigenasa fue mayor en los grupos DM y OBDM (ANOVA una vía, post test Dunnett's $p < 0,001$) (Tabla 3). Los niveles de receptor para transferrina fueron mayores en individuos OB y OBDM (ANOVA una vía, post test Dunnett's, $p < 0,01$) (Tabla 3). El grupo DM sólo mostró un leve aumento de RTf sobre los individuos control. En tanto, el Fe corporal total (TBI) mostró niveles elevados en sujetos OB, OBDM y DM en comparación al grupo Cn (Tabla 3).

4) Abundancia relativa de genes asociados con inflamación

La expresión relativa del RNAm de IL-6 fue mayor en individuos OB en comparación a los otros tres grupos (ANOVA una vía, post test Bonferroni, $p < 0,01$) (Figura 1). La expresión de TNF- α fue mayor en todos los grupos con respecto al grupo Cn. Sin embargo, sólo los DM y OBDM fueron diferentes al grupo Cn (ANOVA una vía, post test Bonferroni, $p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente) (Figura 2).

La expresión relativa del receptor tipo Toll 2 (TLR-2) fue mayor en los tres grupos con respecto al grupo Cn (ANOVA una vía, post test Bonferroni, $p < 0,001$) (Figura 3). A diferencia de TLR-2, TLR-4 mostró una expresión relativa menor en los grupos DM y OBDM con respecto al Cn (ANOVA una vía, post test Bonferroni, $p < 0,001$ y $p < 0,05$, respectivamente) (Figura 4).

La expresión relativa del factor nuclear kappa B (NF- κ B) fue mayor en todos los grupos (OB, DM y OBDM) con respecto al Cn (ANOVA una vía, post test Bonferroni, $p < 0,001$; $p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente) (Figura 5). Finalmente, la expresión relativa de Hepsidina sólo aumentó en el grupo OB con respecto al grupo Cn (ANOVA una vía, post test Bonferroni, $p < 0,001$) (Figura 6).

DISCUSIÓN

En esta investigación se estudió la expresión de genes relacionados con metabolismo de Fe (hepcidina) e inflamación (IL-6, TNF- α , NF- κ B, TLR2 y TLR4) en sujetos obesos (OB), obesos con diabetes mellitus tipo 2 (OBDM) y diabéticos no obesos (DM). Se utilizó como marcador inicial, la presencia de inflamación determinada por los niveles de proteína C reactiva ultra sensible. Los sujetos OB y OBDM presentaron mayores niveles de inflamación, acompañada de mayor peso, IMC, circunferencia de cintura y presión sistólica y diastólica. Estos sujetos, debido a su condición de obesidad, mostraron una inflamación de característica crónica a nivel tisular. Similares resultados fueron observados por Fomusi (2010), quien estableció que la obesidad y la insulino resistencia están asociadas a un estado de inflamación debido a la activación crónica del sistema inmune innato. Se ha observado un gradiente biológico con la edad y el IMC, es decir, a mayor edad e IMC, mayor riesgo de presentar glicemia elevada (Roselló-Araya, 2003). Esto coincide con la presentación de diabetes en individuos que muestran en sus antecedentes mayores edades, pesos, IMC y circunferencia de cintura.

El nivel de glicemia fue mayor en individuos DM y OBDM, lo que se explica por la falta de producción o insuficiente acción de la insulina para incorporar la glucosa desde la sangre a nivel celular. Una glicemia elevada es uno de los elementos determinantes a la hora de diagnosticar diabetes. Además, los antecedentes familiares de diabetes, presencia de hipertensión arterial, edad avanzada e IMC elevado, son factores que se asocian positivamente con una glicemia elevada. Así, individuos con glicemia elevada presentan los mismos factores de riesgo descritos en personas con diabetes (Roselló-Araya, 2003). Los niveles de insulina basal fueron superiores en sujetos DM y OBDM, lo que refleja un mecanismo compensatorio para utilizar e internalizar la glucosa por la célula.

La ferritina sérica, proteína de fase aguda, se encuentra elevada durante el proceso inflamatorio en ausencia de niveles elevados de Fe. Los niveles séricos de ferritina, se encontraron elevados en individuos OB y DM. Este aumento puede ser explicado por un aumento en los niveles de Fe o por efecto de la presencia de inflamación. Lipinski (2011), propuso que una mayor concentración de ferritina en estos

sujetos DM, refleja mayores niveles de Fe circulante y de almacenaje, lo que podría alterar la depuración de insulina hepática, produciendo una hiper-insulinemia.

A nivel de nutrición de Fe, no se detectó presencia de anemia por deficiencia de Fe, lo cual fue confirmado por los resultados de los distintos parámetros de nutrición de Fe (hemoglobina, ferritina y Fe sérico, % de saturación de transferrina y zinc protoporfirina). No se encontró diferencias en los niveles de Fe entre los distintos grupos, por lo que se sugiere, que el aumento de ferritina sérica se debería principalmente como respuesta al proceso inflamatorio y que además, sería uno de los componentes de la insulino resistencia (Lee *et al.*, 2008).

La HO, proteína de estrés térmico, participa activamente frente a estrés oxidativo (Li *et al.*, 2008), y presentó mayor actividad en pacientes DM y OBDM. Esto se explica por una mayor respuesta al estrés celular generada en ambas condiciones (diabetes y obesidad). Ndisang (2010), demostró que el aumento de actividad de HO en ratas hiperglicémicas se relacionó con una disminución significativa de la producción de súper-óxido, previniendo además, el daño en células endoteliales.

Con respecto a la medición de la abundancia relativa del RNAm de genes asociados a inflamación, se observó una elevada expresión de IL-6 en sujetos OB. En obesidad, el tejido adiposo, en especial el visceral, expresa y secreta citoquinas, como IL-6 e IL-1, lo que confirma, que en sujetos obesos los niveles circulantes de estas citoquinas se encuentran aumentados (Wellen, 2005).

Con respecto a NF- κ B y TNF α , se observó mayor expresión de sus RNAm en sujetos OB, DM y OBDM. Se ha demostrado que los adipocitos expresan TNF- α y que su expresión esta marcadamente elevada en ratones que presentan diabetes o IR (Hotamisligil *et al.*, 1993). El factor NF- κ B es un complejo proteico que controla la transcripción del ADN. NF- κ B participa además, en la respuesta celular frente a estímulos como estrés, citoquinas, radiación ultravioleta, LDL oxidadas y antígenos bacterianos o virales (Brasier, 2006). La regulación de NF- κ B está relacionada con el cáncer, infecciones, enfermedades inflamatorias y autoinmunes, shock séptico o desarrollo inmune inadecuado (Meffert *et al.*, 2003). En el presente estudio, todos los individuos mostraron mayor expresión del RNAm de NF- κ B con respecto al Cn, principalmente los

grupos OB y OBDM, lo que podría explicarse por la presencia de obesidad y por el mayor estrés oxidativo producto del estado inflamatorio crónico que presentan estos dos grupos (Brassier, 2006).

Los TLR son componentes del sistema inmune y recientemente se demostró que responden a moléculas endógenas liberadas desde las células que se encuentran bajo condición de estrés, así como también frente a estímulos con ácidos grasos libres, gatillando así, respuestas celulares inflamatorias (Moreno *et al.*, 2003). Se ha sugerido que el proceso inflamatorio inducido por exceso de nutrientes produce IR, a través de un mecanismo que implica la participación de TLR4 como mediador clave (Kim *et al.*, 2007). En este estudio, los niveles del RNAm de TLR2 estaban elevados en todos los grupos con respecto al grupo Cn. Se ha demostrado que la expresión de TLR2 se encuentra aumentada en diversos tipos celulares de sujetos con enfermedades crónicas como aterosclerosis y obesidad (Miller *et al.*, 2007). La activación de estos receptores, produce la activación de NF- κ B y por lo tanto, la amplificación de la respuesta inflamatoria a través de la inducción de la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias, en especial IL-6 e IL-1 β . Todo esto conduce a la exacerbación del síndrome de IR y en la mayoría de los casos a complicaciones mayores como diabetes (Nemeth *et al.*, 2006). A pesar de lo descrito, la abundancia del RNAm de TLR4, no mostró el mismo comportamiento que TLR2, observándose valores de expresión menores al grupo Cn en sujetos DM y OBDM. Los sujetos OB mostraron expresión relativa similar al grupo Cn.

En el estudio de homeostasis y nutrición de Fe se ha implicado a diversos genes y proteínas. Entre ellos, la hepcidina, proteína reguladora del Fe circulante, considerada además, una proteína de fase aguda. Su principal función es disminuir la salida de Fe desde el enterocito o macrófago, a través de la internalización y posterior degradación de ferroportina (proteína de eflujo de Fe) (Pérez *et al.*, 2005). En países industrializados, se han encontrado altas tasas de deficiencia de Fe en adultos obesos, lo que se ha asociado a secreción aumentada de hepcidina por el hígado, que junto a la hepcidina producida por tejido adiposo, reducirían la absorción de Fe dietario (Thurnham *et al.*, 2007). Por sus propiedades antibacterianas, el principal estímulo para la expresión y secreción de hepcidina es la inflamación, en especial a través de las citoquinas IL-6, IL-1 β , LPS y Fe (Theurl *et al.*, 2008). En el presente estudio, la expresión de hepcidina se encontró significativamente aumentada en individuos OB con respecto a Cn. Estos resultados

sugieren que la hepcidina sintetizada en hepatocitos, adipocitos y CMPs, tienen una función paracrina en la regulación del Fe bajo un ambiente pro-inflamatorio (Fleming, 2008). En esta investigación, la expresión de IL-6 se observó especialmente aumentada en sujetos OB, lo que estimularía la expresión de hepcidina en estos sujetos (Barrios *et al.*, 2007). Así, la inflamación existente en el grupo OB, induciría el aumento de hepcidina y con ello produciría una alteración en la distribución de Fe corporal de los individuos.

Según el presente estudio, se puede concluir que:

- ✓ Individuos OB, DM y OBDM mostraron una expresión alterada de los genes en estudio (IL-6, TNF- α , NF- κ B, TLR2, TLR4 y hepcidina) con respecto al grupo Cn. Los grupos OB y OBDM presentan un estado inflamatorio crónico que predispone y perpetúa la IR, antesala de la diabetes.
- ✓ Producto de dicho proceso inflamatorio, los mismos grupos de individuos mostraron altos niveles de ferritina sérica, que sería uno de los componentes de la IR.
- ✓ De igual forma, en respuesta al estrés celular que se genera bajo inflamación crónica y estrés oxidativo, los grupos DM y OBDM mostraron mayor actividad de HO, NF- κ B y TNF- α . Lo mismo ocurrió con TLR2, sin embargo TLR4 mostro una menor expresión en individuos diabéticos, probablemente debido a que es un mediador clave en los mecanismos de IR.
- ✓ Sujetos obesos presentan una mayor expresión de citoquinas inflamatorias, principalmente IL-6, lo que resulta ser un estímulo para la expresión de hepcidina, hormona que produce una redistribución del Fe corporal.
- ✓ No se detectó anemia por deficiencia de Fe en ninguno de los grupos estudiados, sin embargo, se puede afirmar que, individuos con obesidad y/o diabetes presentan una redistribución del Fe corporal y los resultados del presente estudio, confirman que individuos con niveles elevados de Fe de almacenaje (ferritina sérica) y actividad de HO, tendrían una mayor predisposición a desarrollar DM2 (Arredondo *et al.*, 2007).

Tabla 1
Características generales, antropometría, composición corporal y presión arterial de la población estudiada

	Controles	Obesos	DM2	DM Obesos	P*
N	43	48	40	42	
Edad (años)	41,3 ± 10,5	44,1 ± 9,8	61,7 ± 8,9 [*]	58,2 ± 9,9 [*]	<0,001
Peso (Kg)	68,4 ± 7,1	95,9 ± 12,9 [*]	72,1 ± 5,9	87,9 ± 9,4 [*]	<0,001
Talla (mts)	1,70 ± 0,06	1,70 ± 0,07	1,69 ± 0,06	1,67 ± 0,06	NS
IMC ¹ (kg/mt ²)	23,5 ± 1,6	33,1 ± 3,0	25,2 ± 1,3	31,3 ± 2,2	<0,001
C. Cint ² (cms)	87,1 ± 5,5	108,0 ± 8,6 [*]	97,5 ± 6,6 [*]	107,9 ± 9,3 [*]	<0,001
P. Sistólica (mm ³ Hg)	129,7 ± 11,3	138,4 ± 17,3	132,3 ± 16,4	135,0 ± 20,4	NS
P. Diastólica (mm ³ Hg)	78,3 ± 9,9	85,2 ± 13,8	75,6 ± 10,9	82,2 ± 11,2	<0,002

Valores promedio ± DE; *Test: ANOVA una vía, post test Dunnett's (diferencias contra el grupo control).

¹ IMC: Índice de Masa Corporal; ² C. Cint: Circunferencia de cintura; ³ NS: No significativo

Tabla 2
Características bioquímicas de la población estudiada

	Controles	Obesos	DM2	DM Obeso	P*
PCRus (mg/dl) ¹	0,7 (0,3-2,0)	3,4 (1,5-7,7) [*]	1,3 (0,5-3,5)	2,9 (0,9-8,8) [*]	<0,001
Glicemia B (mg/dl)	91,0 ± 8,0	106,6 ± 33,1	149,9 ± 66,0 [*]	169,1 ± 60,2 [*]	<0,001
Glicemia PP (mg/dl)	77,1 ± 22,6	98,7 ± 41,6	-----	-----	<0,002 ^{&}
Insulina B (μUi/ml) ¹	5,2 (2,8–9,6)	5,8 (3,1-10,7)	7,5 (3,7-15,4)	14,0 (6,6-29,6) [*]	<0,001
Insulina PP (μUi/ml) ¹	14,4 (4,4–47,0)	17,5 (5,0-61,0)	-----	-----	<0,007 ^{&}
Col Total (mg/dl)	181,0 ± 34,5	181,6 ± 34,3	171,7 ± 47,9	186,2 ± 61,1	NS
Col HDL (mg/dl)	45,8 ± 11,6	34,8 ± 8,7 [*]	40,1 ± 10,0	38,9 ± 11,8 [*]	<0,001
Col LDL (mg/dl)	108,6 ± 30,3	103,9 ± 25,7	106,1 ± 38,3	97,7 ± 28,0	NS
TGC (mg/dl) ¹	120 (76-190)	187 (107-329) [*]	124 (74-207)	177 (94-332) [*]	<0,001

Valores promedio ± DE; ¹: Promedio geométrico (rango ± 1 DE); *Test: ANOVA una vía, post test Dunnett's (diferencias contra el grupo control); [&]T-test; NS: No significativo

PCRus: Proteína C reactiva ultra sensible; Glicemia B: Glicemia basal; Glicemia PP: Glicemia post prandial; Insulina B: Insulina Basal; Insulina PP: Insulina post prandial; Col: Colesterol; TGC: Triglicéridos.

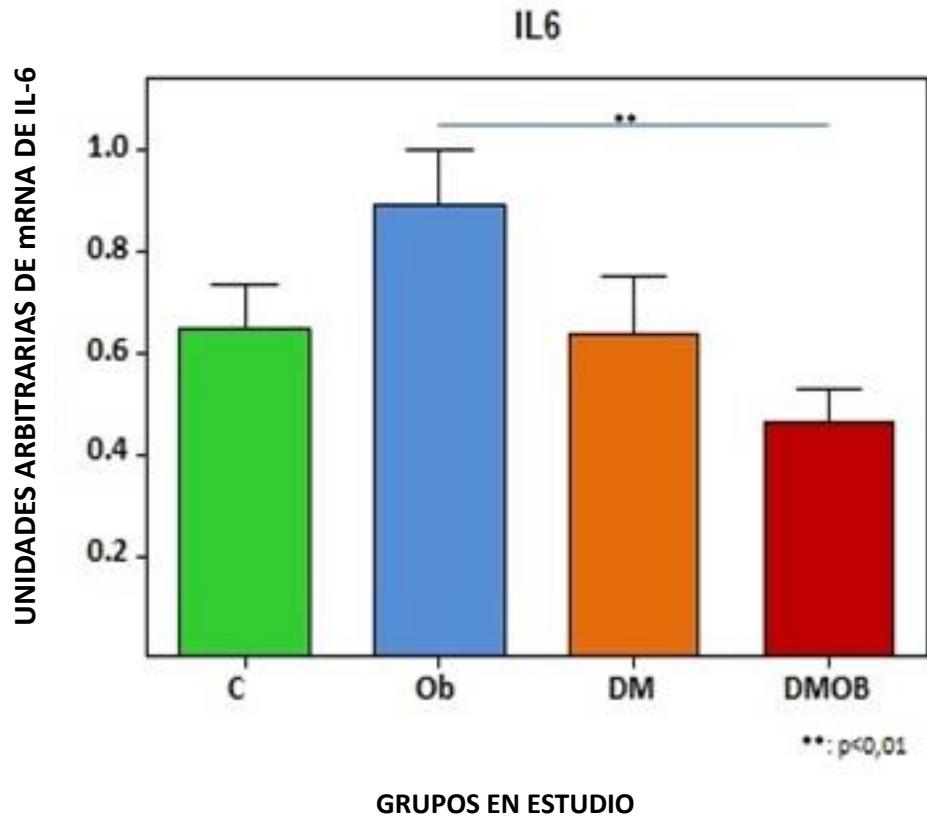
Tabla 3
Características Hematológicas de la población estudiada

	Controles	Obesos	DM2	DM Obeso	P*
Hb (g/dl)	16,2 ± 1,1	16,6 ± 1,3	15,9 ± 1,7	16,3 ± 1,4	NS
Zpp ²	58,3 ± 16,0	58,9 ± 11,9	67,7 ± 18,6	67,6 ± 14,4*	<0,002
Fe (µg/dl)	93,4 ± 21,9	85,3 ± 22,4	96,8 ± 30,3	99,4 ± 32,5	NS
TIBC (µg/dl)	343,1 ± 42,1	308,1 ± 47,2*	339,2 ± 53,0	303,9 ± 73,0*	<0,001
% Sat	27,4 ± 6,5	28,2 ± 7,9	29,0 ± 9,3	32,5 ± 9,7*	<0,03
FS ¹ (µg/L)	70 (51 - 97)	93 (68 -127)	81 (55 -120)	97 (64 -147)*	<0,008
HO ^{1,3}	3,0 (1,6-5,7)	3,5 (1,7-7,5)	8,6 (3,8-19,4)*	7,8 (2,8-21,2)*	<0,001
RTf (µg/mL)	4,3 ±1,1	5,1 ± 1,3*	4,7 ± 1,5	5,4 ± 1,5*	<0,01
TBI (mg/kg)	8,6 ± 1,4	9,1± 1,5	9,0 ± 2,0	9,0±1,9	NS

Valores promedio ± DE; ¹: Promedio geométrico (rango ± 1 DE); *Test: ANOVA una vía, post test Dunnett´s (diferencias contra el grupo control); NS: No significativo

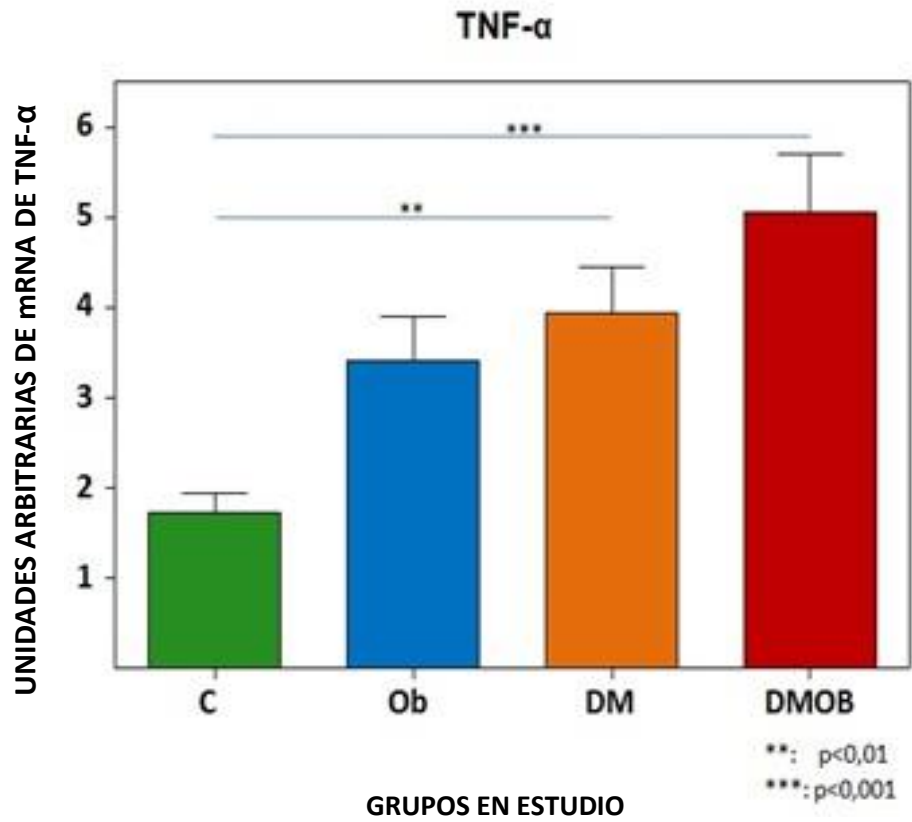
HB: hemoglobina; Zpp: Zinc protoporfirina (²: µg glóbulo rojo/dL); Fe: hierro sérico; TIBC: capacidad total de unión de Fe; % Sat: % de saturación transferrina; FS: ferritina sérica; HO: actividad enzimática hem oxigenasa (³: nmol bilirrubina * mg proteina⁻¹ * h¹); RTf: receptor para transferrina; TBI: hierro corporal total

Figura Nro. 1: Abundancia relativa del RNAm que codifica para IL-6 en sujetos controles, obesos, DM y DM obesos.



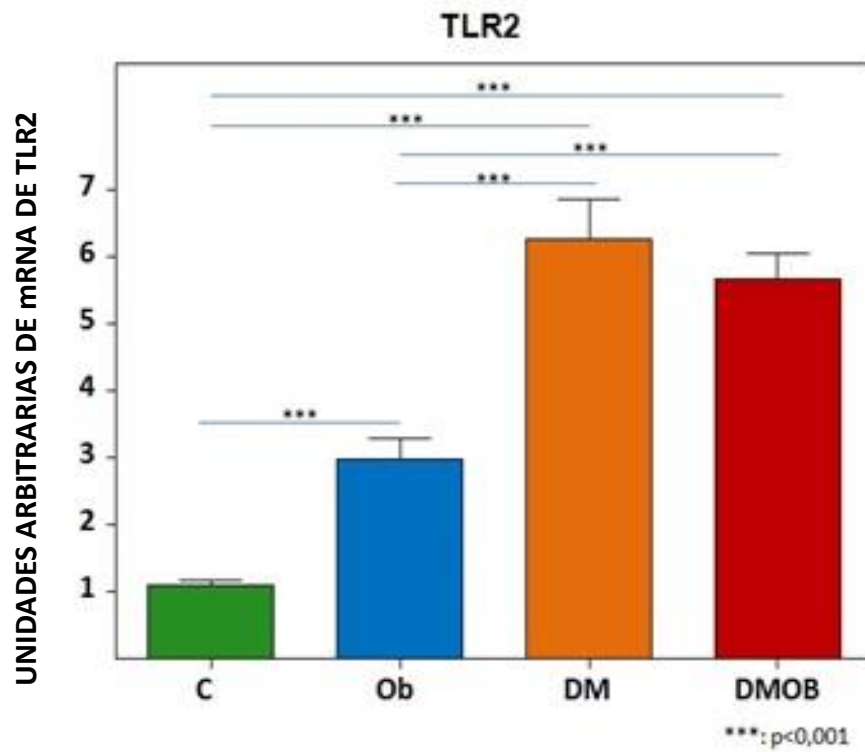
Valores expresados como promedio \pm EEM; Test Anova una vía, post test Bonferroni.

Figura No. 2: Abundancia relativa del RNAm que codifica para TNF- α en sujetos controles, obesos, DM y DM obesos.



Valores expresados como promedio \pm EEM; Test Anova una vía, post test Bonferroni.

Figura Nro. 3: Abundancia relativa del RNAm que codifica para TLR2 en sujetos controles, obesos, DM y DM obesos.



Valores expresados como promedio \pm EEM; Test Anova una vía, post test Bonferroni.

Figura Nro. 4: Abundancia relativa del RNAm que codifica para TLR4 en sujetos controles, obesos, DM y DM obesos.

Valores expresados como promedio \pm EEM; Test Anova una vía, post test Bonferroni.

Figura Nro. 5: Abundancia relativa del RNAm que codifica para NF-kB en sujetos controles, obesos, DM y DM obesos.

Valores expresados como promedio \pm EEM; Test Anova una vía, post test Bonferroni.

Figura Nro. 6: Abundancia relativa del RNAm que codifica para Hecpidina en sujetos controles, obesos, DM y DM obesos.

}

Valores expresados como promedio \pm EEM; Test Anova una vía, post test Bonferroni.

REFERENCIAS

1. ARREDONDO, M.; JORQUERA, D.; CARRASCO, E.; ALBALA, C.; HERTRAMPF, E. 2007. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 promoter is associated with iron status in persons with type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Clin. Nutr.* 86:1347-53.
2. BARRIOS, Y.; ACOSTA, E.; ESPINOZA, M.; MELÉNDEZ, A.; MÉNDEZ, D. 2007. La homeostasis del hierro y una hormona: La hepcidina. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud: Salus. Universidad de Carabobo.* 11(3):20-25.
3. BOCCIO, J.; SALGUEIRO, J.; LYSIONEK, A.; ZUBILLAGA, M.; GOLDMAN, C.; WEILL, R.; CARO, R. 2003. Metabolismo de hierro: conceptos actuales sobre un micronutriente esencial. *ALAN.* 53:2.
4. BRASIER, A.R. 2006. The NF- κ B regulatory network. *Cardiovasc. Toxicol.* 6(2):111–130.
5. CANCELO, R.; HENEGAR, C.; VIGUERIE, N.; TALEB, S.; POITOU, C.; ROUAULT, C.; COUYAPE, M.; PELLOUX, V.; HUGOL, D.; BOUILLLOT, J.L.; BOULOUMIÉ, A.; BARBATELLI, G.; CINTI, S.; SVENSSON, P.A.; BARSH, G.; ZUCKER, J.D.; BASDEVANT, A.; LANGIN, D.; CLÉMENT, K. 2005. Reduction of macrophage infiltration and chemo-attractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidity obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes.* 54:2277-2286.
6. FISHER, S.; PRICE, D. 1964. A simple serum iron method using the new sensitive chromogen tryridyl-s-triazine. *Clin. Chem.* 10:21-31.
7. FLEMING, RE. 2008. Iron and inflammation: cross-talk between pathways regulating hepcidin. *J. Mol. Med.* 86(5):491–494.
8. FOMUSI, J. 2010. Role of Heme Oxygenase in Inflammation, Insulin-signaling, Diabetes and Obesity. *Hin. Pub. Corp.* 2010:1-18.
9. FORRELLAT, M.; FERNÁNDEZ, N. 2002. Anemia de los procesos crónicos. Aspectos clínicos y de laboratorio. *Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter.* 18(3):1-1.
10. HOTAMISLIGIL, G.; SHARGILL, N.; SPIEGELMAN, B. 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 259(5091):87–91.

11. KIM, F.; PHAM, M.; LUTTRELL, I.; BANNERMAN, D.; TUPPER, J.; THALER, J.; HAWN, T.; RAINES, E.; SCHWARTZ, M. 2007. Toll-like Receptor-4 Mediates Vascular Inflammation and Insulin Resistance in Diet- Induced Obesity. *Circ. Res.* 100:1589-1596.
12. LE BLANC, S.; VILLARROEL, P.; CANDIA, V.; GAVILÁN, N.; SOTO, N.; PÉREZ-BRAVO, F.; ARREDONDO, M. 2012. Type 2 diabetic patients and their offspring show altered parameters of iron status, oxidative stress and genes related to mitochondrial activity. *Biometals.* 25:725-735.
13. LEE B-K.; KIM, Y.; KIM Y-I. 2008. Association of serum ferritin with metabolic syndrome and diabetes mellitus in the South Korean general population according to the Korean National Health and Nutrition Examination Survey. *Metabolism.* 60(10):1416–1424.
14. LI, M.; KIM, D.H.; TSENOVOY, P.L.; PETERSON, S.J.; REZZANI, R.; RODELLA, L.F. 2008. Treatment of Obese Diabetic Mice with a Heme Oxygenase Inducer Reduces Visceral and Subcutaneous Adiposity, Increases Adiponectin Levels, and Improves Insulin Sensitivity and Glucose Tolerance. *Diabetes.* 57(6):1526–1535.
15. LIPINSKI B. 2011. Hydroxyl Radical and Its Scavengers in Health and Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2011:1–9.
16. MEFFERT, M.K.; CHANG, J.M.; WILTGEN, B.J.; FANSELOW, M.S.; BALTIMORE, D. 2003. NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior. *Nat. Neurosci.* 6 (10):1072–1078.
17. MILLER, LS; PIETRAS, EM; URICCHIO, LH; HIRANO, K; RAO, S; LIN, H. 2007. Inflammasome-mediated production of IL-1beta is required for neutrophil recruitment against *Staphylococcus aureus* in vivo. *J. Inominal.* 179(10):6933–6942.
18. MORENO, C.; SÁNCHEZ-IBAROLA, A. 2003. Receptores tipo Toll: bases moleculares de la relación entre respuestas innatas y adaptativas del sistema inmunitario. *Rev. Med. Univ. Navarra.* 47(3):29-33.
19. NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. 2003. The sixth report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation and treatment of high blood pressure. *J. Am. Med. Assoc.* 289:560-2572.

20. NDISANG, JF; LANE, N; SYED, N; JADHAV, A. 2010. Up-Regulating the HemeOxygenase System with Hemin Improves Insulin Sensitivity and Glucose Metabolism in Adult Spontaneously Hypertensive Rats. *Endocrinology*. 151(2):549–560.
21. NEMETH, E; GANZ, T. 2006. Regulation of Iron Metabolism by Hepcidin. *Annu. Rev. Nutr.* 26(1):323–342.
22. PÉREZ, G.; VITTORI, D.; PREGI, N.; GARBOSSA, G.; NESSE, A. 2005. Homeostasis del hierro. Mecanismos de absorción, captación celular y regulación. *Acta bioquím. clín. latinoam.* 39(3):301-314.
23. ROSELLO-ARAYA M. 2003. Factores de riesgo asociados a glicemia elevada en ayunas en pacientes de la clínica de salud, de El Guarco de Cartago. *Rev. costarric. cienc. Méd.* [online]. 24(1):25-32.
24. THEURL, I; THEURL, M; SEIFERT, M; MAIR, S; NAIRZ, M; RUMPOLD, H. 2008. Autocrine formation of hepcidin induces iron retention in human monocytes. *Blood*. 111(4):2392–2399.
25. THURNHAM, D.; NORTHROP-CLEWES, C. 2007. Infection in the etiology of anemia. **In:** Kraemer, K.; Zimmermann, M. (Eds.). *Nutritional Anemia; Sight and Life*. Basilea, Suiza. pp.231-256.
26. WELLEN, KE. 2005. Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest.* 115(5):1111–1119.