

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**EXPRESIÓN DE MICRORNA - 22 Y MICRORNA - 150 EN
CÉLULAS MONONUCLEARES PERIFÉRICAS DE
PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 1 Y SU
RELACIÓN CON LA AUTOINMUNIDAD Y
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD**

Holguer Santiago Estrella Benavides

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN GENÉTICA

**Director de Tesis: Prof. Dr. Francisco Pérez Bravo
Co-Director de Tesis: Prof. Dr. Diego García Díaz**

2015

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por el candidato

HOLGUER SANTIAGO ESTRELLA BENAVIDES

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Genética en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 05 de Noviembre de 2015.

Prof. Dr. Francisco Pérez Bravo
Director de Tesis
Universidad de Chile

Prof. Dr. Diego García Díaz
Co-Director de Tesis
Universidad de Chile

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Patricio Gonzales

Prof. Dr. Miguel Arredondo

Prof. Dra. Rosa Andrea Pardo

Prof. Dr. Patricio Olguín
Presidente Comisión

*....a mis padres Carmen y Holguer
Quienes siempre han estado a mi lado
Con todo mi cariño...*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a quienes con su colaboración y apoyo me permitieron culminar esta tesis de magister: a mi familia, directores de tesis, miembros de la comisión, docentes y amigos.

De manera especial a mis padres y hermanos por todo su cariño, apoyo y comprensión. Sin ustedes nada hubiese sido posible.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Diabetes mellitus tipo 1	3
1.2. Factores de riesgo para DM1	4
1.3. Debut de un paciente con DM1	6
1.4. Mecanismo autoinmune contra células β en DM1	7
1.5. MicroRNAs	10
1.6. Biogénesis de MicroRNAs	11
1.7. Diabetes y MicroRNAs	12
1.8. Rol de miR-22 en patologías autoinmunes	13
1.9. Rol de miR-150 y su relación con autoinmunidad	14
2. HIPÓTESIS	15
3. OBJETIVOS	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS	16
4.1. Participantes del estudio	16
4.2. Toma de muestras	17
4.3. Extracción de células mononucleares	17
4.4. Cultivo de células mononucleares periféricas	18
4.5. Análisis serológico	18
4.6. Extracción de RNA total y síntesis de cDNA de miRNAs	19
4.7. PCR en tiempo real para miRNAs	20

4.8. Análisis estadísticos	21
5. RESULTADOS	22
5.1. Evaluación de la expresión de MicroRNAs	22
5.2. Determinación de autoanticuerpos: Anti-GAD65, Anti-IA-2 y Anti-ZnT8, mediante ensayos de ELISA	24
5.3. Relación entre marcadores relacionados con autoinmunidad y perfil de expresión de miRNAs	25
5.4. Relación entre el perfil de expresión de miRNAs y características clínicas de la enfermedad	29
6. DISCUSIÓN	33
6.1. Expresión de miRNAs en pacientes con DM1	33
6.2. miR-22 y su relación con células T	35
6.3. miR-150 y su relación con DM1	37
6.4. Determinación de autoanticuerpos en DM1 en pacientes chilenos	39
6.5. Relación entre perfil de auto-anticuerpos y perfil de expresión de miRNAs.	40
6.6. Relación entre el perfil de expresión de miRNAs y características clínicas de la enfermedad.	41
7. CONCLUSIONES	42
8. BIBLIOGRAFÍA	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reactivos y volúmenes para la reacción de amplificación de DNA complementario (cDNA) específico para cada miRNA.	20
Tabla 2. Reactivos y volúmenes para reacción de qPCR.	21
Tabla 3. Porcentaje de sujetos con Anticuerpos Positivos en muestras de suero de pacientes con DM1 y controles.	24
Tabla 4. Parámetros clínicos de pacientes DM1 recopilados de historias clínicas de cada paciente.	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Línea de tiempo del proceso autoinmune que se desarrolla en la DM1.	8
Figura 2. Expresión relativa de miR 22 en pacientes DM1 (n=20) y sujetos controles (n=20) a distintos estímulos de glucosa (0 mM, 11 mM, 25 mM).	23
Figura 3. Expresión relativa de miR 150 en pacientes DM1 (n=20) y sujetos controles (n=20) a distintos estímulos de glucosa (0 mM, 11 mM, 25 mM).	23
Figura 4. Expresión relativa de miR 22 en pacientes DM1 positivos para GAD65 (n=14) y pacientes DM1 negativos para GAD65 (n=6) a distintos estímulos de glucosa (0 mM, 11 mM, 25 mM).	25
Figura 5. Expresión relativa de miR 22 en pacientes DM1 positivos para IA2 (n=14) y pacientes DM1 negativos para IA2 (n=6) a distintos estímulos de glucosa (0 mM, 11 mM, 25 mM).	26
Figura 6. Expresión relativa de miR 22 en pacientes DM1 positivos para ZnT8 (n=11) y pacientes DM1 negativos para ZnT8 (n=9) a distintos estímulos de glucosa (0 mM, 11 mM, 25 mM).	26
Figura 7. Expresión relativa de miR 150 en pacientes DM1 positivos para GAD65 (n=14) y pacientes DM1 negativos para GAD65 (n=6) a distintos estímulos de glucosa (0 mM, 11 mM, 25 mM).	27
Figura 8. Expresión relativa de miR 150 en pacientes DM1 positivos para IA2 (n=14) y pacientes DM1 negativos para IA2 (n=6) a distintos estímulos de glucosa (0 mM, 11 mM, 25 mM).	28
Figura 9. Expresión relativa de miR 150 en pacientes DM1 positivos para ZnT8 (n=11) y pacientes DM1 negativos para ZnT8 (n=9) a distintos estímulos de glucosa (0 mM, 11 mM, 25 mM).	28

Figura 10. Expresión relativa de miR 22 en pacientes DM1 con cetoacidosis (n=10) y pacientes DM1 sin cetoacidosis (n=10) a distintos estímulos de glucosa (0 mM, 11 mM, 25 mM). **30**

Figura 11. Expresión relativa de miR 150 en pacientes DM1 con cetoacidosis (n=10) y pacientes DM1 sin cetoacidosis (n=10) a distintos estímulos de glucosa (0 mM, 11 mM, 25 mM). **30**

Figura 12. Expresión relativa de miR 22 en pacientes DM1 con glicemia de debut alta (n=9) y pacientes DM1 con glicemia de debut baja (n=11) a distintos estímulos de glucosa (0 mM, 11 mM, 25 mM). **31**

Figura 13. Expresión relativa de miR 150 en pacientes DM1 con glicemia de debut alta (n=9) y pacientes DM1 con glicemia de debut baja (n=11) a distintos estímulos de glucosa (0 mM, 11 mM, 25 mM). **32**

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	Asociación Americana de Diabetes
CMPs	Células Mononucleares Periféricas
DM1	Diabetes Mellitus Tipo 1
Drosha	Endoribonucleasa humana clase III
dsRBDs	dominio de unión a RNA de doble hebra
ER α	Receptor Estrógeno α
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
<i>FoxP3</i>	<i>Forkhead box Protein 3</i>
GAD65	Anticuerpo anti-D Descarboxilasa del Ácido Glutámico
HbA1C	Hemoglobina Glicosilada A1C
HDAC-4	Histona deacetilasa 4
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
IA-2	Anticuerpo anti Tirosina Fosfatasa Pancreática
ICA	Anticuerpo anti-Células Beta del Islote
IL-1B	Interleuquina 1 Beta
IL-6	Interleuquina 6
INF- α	Interferón Alfa
INF- γ	Interferón Gamma
INS	Gen que codifica para Insulina
LB	Linfocito B
LT	Linfocito T
LTc	Linfocito T citotóxico
LTH	Linfocito T Ayudador

MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
miRISC	<i>miRNA-containing RNA-induced silencing complex</i>
Myb	Proto-oncogen Myb
NF-KB	Factor nuclear kapa beta
NOD	<i>Non obese diabetic mice</i>
Notch3	Factor de transcripción Notch 3
PBS	Buffer Fosfato Salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PKC	Protein Kinasa C
PTOG	Consumo Postprandial de Glucosa
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SIRT-1	Enzima Sirtuína 1
TRBP	<i>TAR RNA-binding protein</i>
TGF-β1	Factor de Crecimiento Transformador –Beta 1
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
VEGF	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis</i>
ZnT8	Anticuerpo Transportador de Zinc 8
3'UTR	Región 3' no traducible

RESUMEN

La Diabetes tipo 1 (DM1) es una enfermedad de carácter autoinmune con una etiología compleja en la cual los mecanismos que se asocian al proceso autoinmune no se conocen en su totalidad. En este contexto, los nuevos mecanismos de regulación post-transcripcional como los microRNAs (miRNAs) han generado gran expectativa. Diversos miRNAs han sido relacionados con la patogénesis de diversas enfermedades autoinmunes.

El objetivo de este estudio fue analizar la posible asociación de los miRNAs: miR-22 y miR-150 con marcadores de autoinmunidad y severidad clínica de la enfermedad. El estudio se realizó en una muestra de células mononucleares periféricas (CMPs) provenientes de 20 pacientes con debut reciente de DM1 y 20 sujetos controles. El diseño contempló la determinación de perfiles de expresión de miR-22 y miR-150 a través de la utilización de sondas TaqMan en CMPs a diferentes concentraciones de glucosa (0mM, 11mM y 25mM).

Nuestros resultados mostraron que la expresión de miR-22 se encuentra aumentada en pacientes con DM1 respecto de controles. Este efecto se observó con mayor claridad en la condición basal sin estímulo de glucosa y disminuyó en condiciones con estímulo de 11 y 25 mM. En el caso de miR-150 la expresión de este miRNA fue menor en pacientes con DM1 versus controles. No hubo asociación entre el perfil de autoinmunidad (GAD65; IA-2 y ZnT8) y la expresión de miR-22 y miR-150. Por otro lado la comparación del perfil aumentado de miRNAs y características clínicas mostró que miR-22 (condición sin estímulo de glucosa) y miR-150 (condición 11 mM) se asociaron al componente de cetoacidosis.

Por lo cual podemos sugerir que estos miRNAs estarían participando en el desarrollo de DM1 no relacionada al componente autoinmune. La falta de asociación podría deberse al pequeño número de muestras analizadas.

SUMMARY

Type 1 Diabetes (T1D) is an autoimmune disease with a complex etiology in which the mechanisms that are associated with the autoimmune process is not fully known. In this context, new mechanisms of posttranscriptional regulation such as miRNAs have generated great expectation. Various miRNAs have been linked to the pathogenesis of various autoimmune diseases.

The aim of this study was to analyze the possible association of miRNAs: miR-22 and miR-150 with markers of autoimmunity and clinical severity of the disease. The study was conducted on a sample of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 20 patients with recent diagnosis of T1D and 20 control subjects. The design involved the determination of expression of miR-22 and miR-150 through the use of TaqMan probes on PBMPs treated with different glucose concentrations (0mM, 11mm, and 25mm).

Our results showed that the expression of miR-22 was increased in patients with T1D compared to controls. This effect was more clearly observed at baseline condition and decreased in the 11 and 25 mM glucose condition. Regarding to miR-150 expression profile, it was lower in patients with T1D versus controls. There was no association between the profile of autoimmunity (GAD65, IA-2 and ZnT8) and miR-22/miR-150, but the comparison of the increased profile miRNAs and clinical characteristics showed that miR-22 (condition without glucose) and miR-150 (condition 11 mM) were associated with the ketoacidosis component. In conclusion, both microRNAs showed a higher level of expression, however there was no associated with this autoimmune component in T1D. The lack of association could be due to the small number of samples analyzed.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Diabetes mellitus tipo 1 (DM1)

La DM1 es una enfermedad multifactorial caracterizada por la destrucción autoinmune de células beta pancreáticas (β) de los islotes de Langerhans, productoras de insulina, generando una deficiencia en la secreción y/o acción de insulina lo que provoca altos niveles de glucosa en sangre (hiperglicemia)(1). Aunque este tipo de diabetes generalmente aparece tempranamente en la vida, puede presentarse a cualquier edad (1, 2). Se sabe que aproximadamente 79.000 niños alrededor del mundo desarrollan DM1 cada año (3, 4) con una prevalencia similar en ambos sexos (5). Se ha estimado que este tipo de Diabetes afecta entre el 5- 10% de todos los pacientes diabéticos (4). La incidencia de DM1 varía significativamente a nivel mundial, desde las incidencias más altas en países europeos como Finlandia e Italia de aproximadamente 22,5 y 14,5 x 100.000 niños por año respectivamente, a las más bajas en países asiáticos y de América Latina como Venezuela y Perú con incidencias menores al 1,5 x 100.000 niños por año. Se conoce que la incidencia mundial de DM1 incrementa alrededor de un 3% anualmente, lo cual proyecta que la incidencia de DM1 en el 2020 será el doble que la del año 2000 (5-7).

En Chile no existe información sobre la incidencia de DM1, sin embargo, un estudio en población menor de 15 años de la Región Metropolitana realizado entre los años 2000 y 2004 mostró una incidencia de 6,58 por 100.000 habitantes/año. Esta incidencia se considera intermedia y ha tenido un incremento sustancial en los últimos 20 años (8).

1.2 Factores de riesgo para DM1

En la etiopatogenia de la DM1 se distinguen diversos factores (genéticos y ambientales) que se ven reflejados en la respuesta autoinmune que se observa en la mayoría de los casos de DM1. Aun cuándo se ha demostrado que el componente hereditario en el desarrollo de la DM1 es primordial, los estudios sobre mellizos monocigóticos demuestran que los factores ambientales son igualmente importantes (9). De los pacientes con diagnóstico de DM1, sólo el 15% presentan antecedentes familiares de esta patología (10).

Sabemos que los factores genéticos explican en parte la variabilidad geográfica en la ocurrencia de DM1, pero no pueden explicar su incidencia cada vez mayor (6). Entre los factores ambientales implicados en el desarrollo de DM1 encontramos: la infección por enterovirus o retrovirus endógenos, el consumo de proteínas de la leche, la influencia de contaminantes ambientales, las variaciones en la flora intestinal, y la exposición de la vitamina D (11, 12). Estos factores son ahora capaces de desencadenar DM1 en los genotipos que anteriormente no habían desarrollado la enfermedad en la infancia (6).

Se sabe que la aparición clínica de esta enfermedad es precedida por una fase prodrómica caracterizada por la detección de anticuerpos anti-islotos (*Islet Cell Antibodies*, ICA), anti-dehidrogenasa del ácido glutámico (GAD), y antitirosina fosfatasa (IA-2). Estos en concentraciones elevadas persistentes, y junto a un deterioro de la respuesta de la fase rápida de secreción de insulina, permiten predecir en cierto grado la aparición de la enfermedad (13). La presencia de altos niveles de estos autoanticuerpos refleja una reacción autoinmune en curso (14, 15). Estudios realizados en pacientes con DM1, en los que se evaluó especificidad de autoanticuerpos, mostraron que al medir solo un autoanticuerpo la especificidad oscilaba entre un 85 a 99%, y que esta mejoraba al medir más de un autoanticuerpo (16, 17).

Como se mencionó anteriormente la DM1 se debe a la destrucción de células secretoras de insulina las cuales contienen antígenos para IA-2 y GAD (18). Los autoanticuerpos GAD y IA-2 pueden ser detectados en pacientes con DM1 antes y después de la aparición de la enfermedad (19). La presencia de autoanticuerpos IA-2 es superior al 80% en niños y adolescentes con diagnóstico DM1. Los autoanticuerpos IA-2 están relacionados con el proceso inmune y la destrucción de células β productoras de insulina (20). Estudios posteriores han descrito la presencia de autoanticuerpos anti-ZnT8 en el 60-80% de los pacientes con DM1, sugiriendo que este autoanticuerpo sería un buen predictor de la enfermedad (21). A diferencia de los otros autoanticuerpos, los anti-ZnT8 no parecen estar asociados con el antígeno leucocitario humano (HLA) de clase II, y por lo tanto podrían ser de especial valor en las personas con bajo riesgo genético o en aquellos donde el perfil de los autoanticuerpos clásicos es negativo (22). Si bien la presencia de autoanticuerpos es utilizada como biomarcadores de DM1, estos tienen algunas limitaciones importantes por lo que la búsqueda de nuevos biomarcadores de predicción son necesarios para manejar de forma más efectiva el cuadro de un paciente con DM1 (23).

Varios estudios genéticos de agregación familiar en los parientes de primer grado mostraron 15 veces más riesgo en hermanos y un riesgo 50 veces mayor en mellizos monocigóticos comparados con la población general (24). Esta agregación supone la existencia de susceptibilidad genética en DM1. Algunos estudios han observado una mayor predisposición genética en individuos que expresan ciertos antígenos de la región del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), y en especial los genes HLA de clase II (25). La región HLA se localiza en el cromosoma 6p2.1 con una longitud de 4.000 pares de bases (pb). Esta región contiene más de 200 genes, de los cuales se estima que el 40% están relacionados con la respuesta inmune (26, 27).

La asociación entre serotipos HLA y DM1 se conoce desde hace varias décadas, siendo esta región genómica responsable de alrededor del 50% de la agrupación familiar de esta enfermedad. La región HLA presenta una fuerte tendencia a mantener haplotipos compuestos de marcadores genéticos que muestran un alto desequilibrio de ligamiento, es decir, los marcadores HLA se presentan en combinaciones de alelos que forman un bloque conservado entre los pacientes con DM1 (25). La presencia de estos haplotipos de reconocimiento establece una clara relación entre la predisposición genética y la posibilidad de un fenómeno autoinmune (28). Estudios posteriores han demostrado que algunas de sus variantes alélicas pueden otorgar susceptibilidad y/o protección frente a la patología (29).

En Chile se han realizado estudios sobre la asociación entre HLA y DM1, uno de ellos encontró que los alelos HLA-DQB1(*)0302 y HLA-DQB1(*)0201 se encontraban fuertemente asociados a DM1 en la población de Santiago de Chile (30).

1.3 Debut de un paciente con DM1.

Una de las complicaciones en el debut de un paciente con DM1 es la cetoacidosis (CDA), que es la emergencia hiperglicémica más severa en pacientes con DM1 y está asociada con una morbimortalidad significativa (31). Está conceptualizado que la CDA ocurre más frecuentemente en pacientes con DM1. Esto no es totalmente cierto ya que CDA es también reportada en DM2, sin embargo es raro encontrarla sin un evento precipitante (32, 33). Los criterios bioquímicos para el diagnóstico de CDA consisten en una hiperglicemia (mayor a 11 mmol/L o ≥ 200 mg/dL) con un pH venoso < 7.3 y un nivel de bicarbonato (HCO_3) < 15 mmol/L; cetonemia y cetonuria (34, 35).

1.4 Mecanismo autoinmune contra células β en DM1.

La destrucción celular en DM1 está mediada por una interacción entre células inmunes como linfocitos y macrófagos, y por una serie de mediadores químicos entre ellos algunas citoquinas (36, 37). La apoptosis o muerte celular programada está involucrada en la destrucción tanto de Linfocitos T (LT) como de células β , y este evento es requerido para la activación de LT específicos, que son los desencadenantes del proceso patológico (36).

En el páncreas las células β comienzan la producción de interferón α (INF- α) y, subsecuentemente, producen moléculas del MHC clase I, que las deja expuestas al ataque de LT CD8+ autoreactivos. Estos que conducen a que los antígenos liberados desde las células β sean transportados por las células presentadoras de antígenos (CPA) hacia el linfonodo pancreático. Durante este proceso se produce un ambiente proinflamatorio que favorece la acción de los LT CD8+ efectores por sobre la acción de los LT reguladores. En este contexto, los antígenos de las células β junto a los linfocitos CD4+ cooperadores favorecen la conversión de los linfocitos B (LB) en células plasmáticas, por lo tanto, comienzan a aparecer los primeros autoanticuerpos tales como: anticuerpos anti-islotes (ICA, 70-80% de los pacientes), anti-descarboxilasa del ácido glutámico (GAD, 70-80% de los pacientes) y anti-tirosina fosfatasa pancreática (IA-2, 60-80% de los pacientes)(38, 39). Por su parte, los LT CD8+ autoreactivos son estimulados, lo que genera que proliferen y vuelvan a migrar hacia el páncreas generando un nuevo ataque autoinmune con la destrucción de células β . En este punto, también se produce en paralelo la disminución en la producción de insulina por parte de las células β (pseudotrofia) (2) (Figura 1).

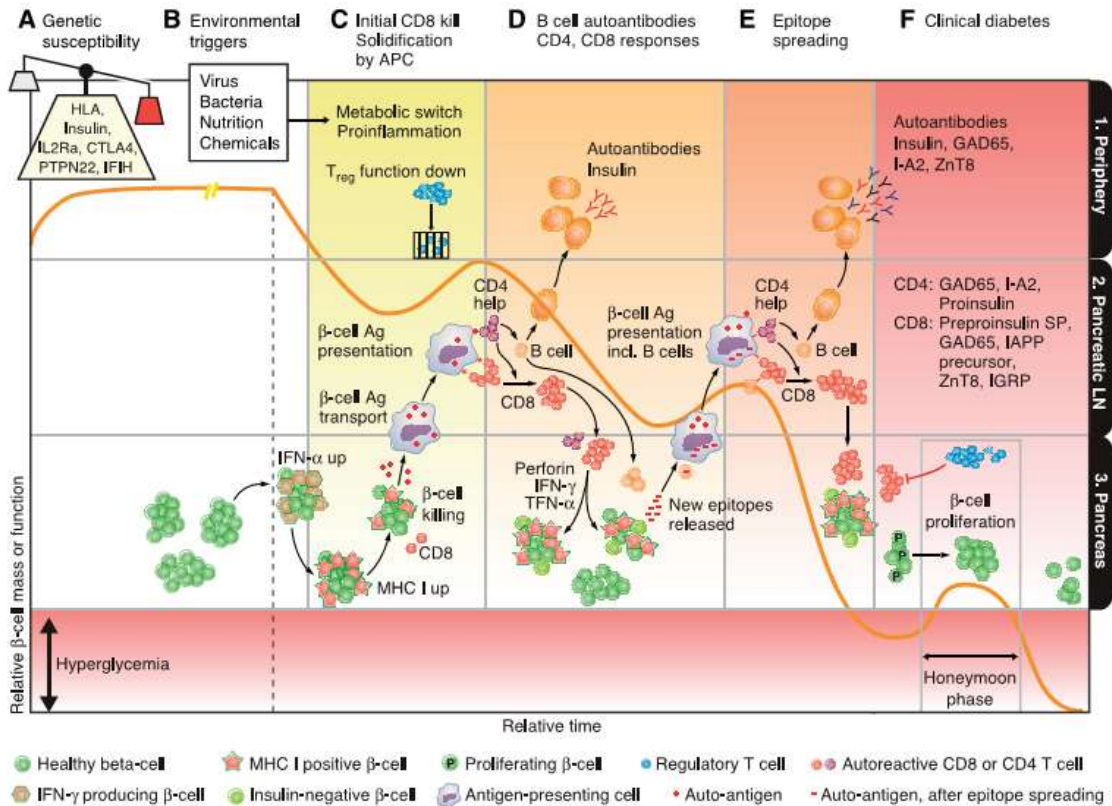


Figura 1. Línea de tiempo del proceso autoinmune que se desarrolla en la DM1. En este diagrama se describen los principales linajes celulares involucrados, que incluye LT CD4+ y LT CD8+, LT reguladores, LB y CPA. La línea naranja indica la masa de células β pancreáticas, la disminución observada se ha descrito como un modelo de “recaída y remisión” ya que pareciera haber una recuperación de la masa celular cada ciertos lapsos de tiempo, volviendo posteriormente a disminuir. La última fase de remisión, que ocurre después del diagnóstico clínico de la enfermedad, se conoce como “luna de miel” (*honeymoon*) y ha sido ampliamente estudiada como blanco terapéutico de la enfermedad. (Extraído de van Belle et al. 2011)

Estos ataques sucesivos contra las células β provocan la disminución de la masa pancreática, sin embargo, este proceso toma mucho tiempo antes de que aparezcan los primeros síntomas de la diabetes. Se estima que éstos tienen lugar después de que un 80% de las células del islote pancreático están destruidas. Sin embargo, muchos autores sostienen que el progreso de la enfermedad no es un proceso lineal, sino que procede a ritmos variables dependiendo de cada paciente (13).

La apoptosis es un proceso controlado que se caracteriza por un cambio morfológico celular, condensación de cromatina, fraccionamiento de DNA y a la posterior formación de cuerpos apoptóticos (40). Se sabe que los eventos apoptóticos están estrechamente relacionados con autoinmunidad y diabetes ya que éste es el principal mecanismo de destrucción de células β . Las señales que desencadenan la apoptosis pueden provenir ya sea de altas concentraciones de citoquinas inflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) o de la presencia y acción de los LT en el microambiente de los islotes (41).

La respuesta central y la tolerancia periférica del sistema inmune participan activamente en la regulación frente a auto-antígenos (42). El timo, órgano activo durante la infancia, se encarga de la eliminación de LT potencialmente auto-reactivos a través mecanismos apoptóticos (43). Cuando uno de los mecanismos de tolerancia periférica falla, es cuando se produce el fenómeno autoinmune que puede desencadenar la presentación de enfermedades autoinmunes graves como la DM1, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis, entre otras (44).

La apoptosis de LT es un proceso fundamental en la retracción de la respuesta inmune, luego de que el sistema inmune ha ejercido su función. Una vez que los LT son estimulados a través del receptor de LT y junto con las moléculas y señales de co-estimulación, las células son inducidas a proliferar y capaces de ejercer su acción efectora. Sin embargo, una vez que el antígeno invasor es erradicado, es necesario que los LT cesen su acción (41). Esto se logra a través de la activación de mecanismos apoptóticos, como muerte celular inducida por activación, que induce la muerte celular controlando la población de linfocitos (45, 46).

El bloqueo de la apoptosis se ha visto relacionado con la patogénesis de diversas enfermedades autoinmunes de entre ellas algunas como anemia hemolítica y trombocitopenia (46-48). Se ha visto que los pacientes con alguna enfermedad autoinmune exhiben un

decremento en la expresión de Caspasa 3 así como de otros marcadores pro-apoptóticos en células mononucleares de sangre periférica (CMPs) (47). Los mecanismos apoptóticos en CMPs de pacientes con DM1 bajo condiciones de estimulación alta de glucosa están alterados. Esto se propuso luego de comprobar que existe un decremento en la expresión de genes pro-apoptóticos como FAS y BAX y que la expresión de XIAP un gen anti-apoptótico estaba incrementada (48).

El componente genético en las enfermedades autoinmunes confiere cierta susceptibilidad y/o protección frente a una patología. El rol epigenético interviene en el desarrollo del sistema inmune, en especial en la maduración de LT y citoquinas (49).

Algunas clases de pequeños RNAs también son considerados en la regulación post-transcripcional al actuar sobre transcritos en el citoplasma como los miRNAs y los RNAs interferentes pequeños (50).

1.5 MicroRNAs

Los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA no codificante de 21-23 nucleótidos que funcionan como reguladores de la expresión de una gran variedad de genes a nivel post-transcripcional, uniéndose mayoritariamente a la región 3' UTR de mRNA blancos. En este caso se bloquea la traducción o se induce la degradación del mRNA cambiando los niveles de expresión de la proteína.

Los miRNAs fueron descubiertos primero en *Caenorhabditis elegans* y luego en vertebrados y plantas (51, 52). De acuerdo a últimas estimaciones, el genoma humano codifica más de 1600 miRNAs precursores, generando más de 2237 miRNAs maduros (53). En la actualidad los miRNAs son universalmente reconocidos como importantes reguladores de la expresión

génica y de varios procesos biológicos como desarrollo, apoptosis, proliferación y se han estudiado en diversas patologías incluyendo DM1 (54). La falla de la regulación de algunos miRNAs está relacionada con algunas enfermedades humanas. Algunos miRNAs incluidos miR-155, miR-181a, miR-146 y miR-223 podrían estar involucrados en el desarrollo del sistema inmune (55).

1.6 Biogénesis de los miRNAs

Los miRNAs se pueden clasificar en dos grandes clases de acuerdo a su procesamiento: canónicos y no canónicos (56). En la vía canónica los genes de miRNAs son transcritos por una RNA polimerasa de tipo II generando los transcritos primarios conocidos como pri-miRNAs. Este es procesado por el microprocesador formado por Drosha y su cofactor DGCR8, que participa en el reconocimiento del sustrato (57) generando un pre-miRNA de aproximadamente 70 nucleótidos (nt), que posee un pequeño “tallo-bucle” (“*stem-loop*”). Esta estructura se sugiere que es un motivo clave para que sea reconocido por la exportina-5 (57, 58) para su exportación al citoplasma, donde es procesado por segunda vez por Dicer, una RNasa de tipo III citoplasmática que produce un RNA de doble hebra (dsRNA) de ~22 nt. Al igual que Drosha, Dicer se une a otro elemento que contiene un dsRBD, la proteína TRBP (TAR RNA-binding protein), que podría tener un efecto sobre la formación y estabilidad del complejo (57). Durante el ensamblaje del complejo miRISC (miRNA-containing RNA-induced silencing complex), el dsRNA es separado y una hebra es seleccionada como miRNA maduro, mientras que la otra hebra es degradada (57-59).

En la generación de miRNAs no canónicos no se requiere de todos los factores mencionados anteriormente. Por ejemplo, pre-miRNAs de mirtrones (un tipo de miRNA localizado en

intrones) son producidos por empalme alternativo (“*splicing*”) y no por el procesamiento a través de Drosha. Otro ejemplo es el pre-miR-451 que es cortado por Ago2 y no por Dicer. También algunos pri-miRNAs son pequeñas horquillas de RNAs que probablemente sirven como pre-miRNAs y sustratos directos de Dicer. Sin embargo, la mayoría de los miRNAs presentes en animales son originados a través de la vía canónica (56).

1.7 Diabetes y miRNAs

Si bien es poco lo que se sabe de la función de miRNAs en DM1, sabemos que las células β y los tejidos blanco de la insulina expresan un conjunto bien definido de miRNAs (60, 61). Un notable ejemplo es el miR-375, un miRNA altamente expresado en los islotes pancreáticos que regula la expresión de los genes que participan en la secreción de hormonas y en el incremento de células β en respuesta a la resistencia a la insulina (62, 63). La sobre expresión de miR-375 reduce el número de células β pancreáticas y con ello se suprime la estimulación en la secreción de insulina, por el contrario la inhibición de miR-375 mejora la secreción de insulina (64).

Otro estudio realizado en los islotes de ratones NOD (*Non obese diabetic mice*), simula un modelo murino de DM1 reportando un aumento de los niveles de varios miRNAs, incluyendo miR- 21, miR- 34a, miR- 29 y miR- 146a, que tienen efectos nocivos sobre la función de células β (65, 66). Se han descrito una serie de miRNAs con capacidad de regular la función β pancreática tales como miR-9, miR-410, miR-130a, (67) involucrados en el desarrollo del páncreas (68) y regeneración de la célula β (69). Si bien la evidencia es poca, los estudios realizados han generado una gran expectativa de la función de los miRNAs en la actividad pancreática y por lo tanto en DM1.

Con respecto a la inmunidad, datos recientes indican que el papel de los miRNAs es esencial para la función normal de células T inmunes. De hecho, algunos miRNAs se han encontrado alterados en varias patologías autoinmunes y han sido directa o indirectamente vinculadas a la función de células T o su desarrollo (70). Un ejemplo claro es miR-155 que ha demostrado ser un factor clave en la respuesta inmune innata y adaptativa, además de ser necesario para la diferenciación y función de células T (71).

En Chile hay limitados trabajos que relacionan al estudio de miRNAs en distintas patologías autoinmunes. Nuestro grupo ha comunicado que el perfil de expresión de miR-21 y miR-93 se encontraba disminuido en células CMPs de pacientes con DM1 en comparación con los controles (72). Resultados similares se han encontrado para miR-21 en la Enfermedad Celiaca (Bascuñan K. 2013, datos no publicados).

1.8 Rol de miR-22 en patologías autoinmunes

Se conoce que miR-22 se encuentra localizado en el cromosoma 17p13.3, y funciona como represor post-transcripcional de varios mRNA blancos relacionados con varios procesos oncológicos y enfermedades autoinmunes entre ellas la DM1. (74,75)

Este miRNA tiene la capacidad de desorganizar epigenéticamente la célula ya que actúa como un miRNA proto-oncogénico. Puede antagonizar a miR-200, un miRNA antimetastásico, al actuar directamente sobre la familia TET (*10-eleven translocation*) de metilcitosina dioxigenasa, inhibiendo así la desmetilación del promotor de mir-200 (73). Otros estudios han mostrado que la sobreexpresión de miR-22 se correlaciona con una pobre respuesta clínica y silenciamiento del eje TET-miR-200 en pacientes con cáncer de mama (74).

Evidencia reciente mostró que los niveles séricos de miR-22 están incrementados en pacientes con enfermedades tiroideas autoinmunes como Tiroiditis de Hashimoto y Enfermedad de Graves (75). En otros estudios miR-22 se encontró sobre expresado en el plasma de pacientes con Esclerosis Múltiple (76). Otro estudio de perfiles de miRNAs ha reportado que miR-22 se puede expresar en células pancreáticas humanas (77). También miR-22 se ha encontrado elevado en modelos *in vivo e in vitro* de ratones con pancreatitis adenomatosa aguda y se ha visto que la sobre expresión de este miRNA puede promover la apoptosis de células acinares pancreáticas (78).

1.9 Rol de miR-150 y su relación con autoinmunidad

Por otro lado miR-150 se encuentra localizado en el cromosoma 19q13.33. Está relacionado con varios procesos autoinmunes, entre ellos el desarrollo y diferenciación de linfocitos T y B (55, 79). Además se sabe que miR-150 esta expresado en células B y T maduras, donde puede bloquear el desarrollo de las formas inmaduras de células B cuando se expresa tempranamente (80). También se detectó una disminución en la expresión de este miRNA en un linaje mixto de leucemia, sugiriendo que la regulación en la expresión de miR-150 es necesaria para el desarrollo de células B (81).

Cabe mencionar que miR-22 hasta el momento no ha sido reportado en estudios de DM1 y que miR-150 ha sido vinculado con anterioridad en estudios de DM2 (82). Para este estudio se han seleccionado a miR-22 y miR-150 a través de una búsqueda bibliográfica e bioinformática pensando que podrían estar implicados en DM1 así como en otras enfermedades autoinmunes, ya sea regulando el proceso de desarrollo y diferenciación de linfocitos T y B o modulando de manera indirecta vía factores de transcripción, que se vean afectados por el estado de hiperglicemia presente en pacientes con DM1.

Por lo tanto en este trabajo de tesis se postula la siguiente hipótesis de trabajo

2. HIPÓTESIS

“Los pacientes con Diabetes Mellitus tipo 1 presentan un patrón de expresión aumentado de miR-22 y miR-150, el cual se asocia a una mayor frecuencia de marcadores relacionados con autoinmunidad y características clínicas agresivas en los pacientes con DM1”.

3. OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

1. Estimar la expresión de miR-22 y miR-150 en CMPs de pacientes con DM1.
2. Establecer una relación entre los niveles de expresión de miR-22 y miR-150 con marcadores de autoinmunidad y características clínicas agresivas en pacientes con DM1.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar la expresión de miR-22 y miR-150 en CMPs de pacientes con DM1 y pacientes controles bajo estímulos basales, 11mM y 25 mM de glucosa
2. Determinar el perfil de anticuerpos Anti-GAD65, Anti-IA-2 y Anti-ZnT8 en suero de pacientes con DM1 y controles.
3. Diferenciar la expresión de miRNAs en el grupo de pacientes con cetoacidosis y glicemias altas al momento del debut diabético.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Participantes del Estudio

Los participantes de este estudio fueron 20 pacientes con DM1 localizados en la Región Metropolitana de Santiago con un rango de edad que osciló entre los 4 a 19 años.

Utilizando el programa QUANTO, se estimó que un tamaño de muestra de 20 pacientes y 20 controles, entrega un poder estadístico de 80% y una confianza del 95% valor estimado a través de las diferencias en el perfil autoinmune entre los pacientes con DM1 (regularmente este perfil es negativo en los controles). Estudios previos han demostrado una positividad promedio de al menos un anticuerpo positivo en el 60 % de los casos, por lo que considerando esta diferencia (60% positividad versus 40 % negatividad), en la muestra de 20 pacientes se podrán detectar diferencias entre los grupos.

El diagnóstico de DM1 fue realizado por un médico endocrinólogo pediatra de acuerdo a los criterios emitidos por la Asociación Americana de Diabetes (ADA 2013) (1). Glicemia en Ayunas ≥ 126 mg/dL, Glicemia plasmática a las 2 horas de PTOG ≥ 200 mg/dL, Glicemia plasmática al azar ≥ 200 mg/dL y HbA1C $\geq 6,5\%$. Todos los pacientes seleccionados fueron encuestados sobre sus antecedentes clínicos, patológicos personales y patológicos familiares. Además, se utilizó un grupo control conformado por 20 personas sanas cuyo rango de edad fue de entre 20 a 45 años para descartar la presencia de enfermedad. Fueron excluidos de este grupo las personas con antecedentes personales y familiares de DM1 y otras enfermedades autoinmunes. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, y por el Servicio de Salud Metropolitano Central.

4.2. Toma de muestras

Las muestras de sangre periférica fueron recolectadas en el Instituto de Investigación Materno Infantil (IDIMI) del Hospital San Borja Arriarán por el personal más experto para este procedimiento, previo a la explicación y firma del consentimiento informado a los padres de niños menores de 10 años y/o explicación y firma de los niños mayores a 10 años.

Las muestras de sangre del grupo control se recolectaron en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile en el Departamento de Nutrición previo a firma de consentimiento informado. En ambos casos, 10 ml de sangre venosa fue colectada y almacenada en tubos heparinizados para la extracción de células mononucleares, y otros 10ml de sangre venosa fueron colectados y almacenados en tubos vacutainer sin anticoagulante (tapa roja).

Ambas muestras fueron depositadas inmediatamente en una caja refrigerada y transportadas al laboratorio para finalmente ser almacenadas a -80°C hasta su procesamiento.

4.3. Extracción de células mononucleares

Los 10 ml de sangre periférica almacenada se procedieron a diluir con Buffer Fosfato Salino (PBS) en una proporción de 1:1 para facilitar el manejo de la muestra. Luego de ello, la muestra diluida se vertió lentamente sobre una solución de Ficoll (Lymphocyte Separation Medium, density 1,077g/ml Cellgro, EEUU), solución que tiene una densidad conocida y permite realizar una separación por gradiente de densidad al final del cual se obtienen células mononucleares periféricas. La separación ocurrió mediante centrifugación durante 30 minutos a 1.840 rpm (410 g) y 4°C . Este proceso generó un anillo que contiene las células mononucleares, las cuales fueron trasvasadas a un nuevo tubo y lavadas dos veces con PBS, luego se centrifugó a 2400 rpm (730 g) por diez minutos.

Por último, el pellet celular obtenido fue resuspendido en medio de RPMI – 1640 (medio sin glucosa) (Gibco, Invitrogen). Las células fueron contadas utilizando la tinción de azul tripán (Trypan Blue Stain 0,4%, Gibco, Invitrogen) en una cámara de Neubauer.

4.4. Cultivo de células mononucleares periféricas

Las células mononucleares periféricas fueron incubadas con una atmósfera de 5% de CO₂, a 37 °C, en placas Petri de 6 pocillos con medio de cultivo RPMI -1640, antibióticos (Penicilina y Estreptomina al 1,5%) y suero fetal bovino al 5% inactivado. Las células provenientes de pacientes o controles fueron expuestas en duplicado a dos concentraciones de glucosa: 11 mM para simular una hiperglicemia moderada y 25 mM para simular una hiperglicemia severa crónica, además de una condición basal sin estímulo de glucosa por 20 horas. Estas concentraciones de glucosa como estímulo, han sido utilizadas en diversos estudios experimentales en nuestro grupo con el modelos de CMPs (74) y en otros modelos celulares de células β (83-85). La recuperación de las células se realizó mediante la recolección y centrifugación del medio de cultivo a 3000 rpm (1100 g) por 5 minutos. Finalmente la población de células fue lavada dos veces con PBS y el pellet obtenido resuspendido en TRIZOL® (Invitrogen, USA), una solución de fenol e isocianato de guanidina que permite la ruptura de la célula y conserva la integridad del RNA, para aislarlo posteriormente y permitir su preservación a – 80 °C.

4.5. Análisis serológico

La muestra de sangre sin anticoagulante fue centrifugada a 2.500 rpm (760 g) por 10 minutos a una temperatura de 4°C. El sobrenadante corresponde al suero, que fue almacenado a – 80 °C hasta la cuantificación de autoanticuerpos.

Se cuantificaron los autoanticuerpos anti-GAD65, anti-IA2 y anti-ZnT8 mediante inmunoensayo enzimático (ELISA) con el uso de kits comerciales de la marca MedizymR (Berlín, Alemania). Los inmunoensayos se basan en la habilidad de anticuerpos para formar un puente entre el antígeno respectivo unido a la placa de ELISA (GAD65, IA2) y un segundo anticuerpo biotilado. La unión de este segundo anticuerpo se correlaciona con la cantidad de anticuerpo a determinar presente en el suero estudiado, siendo cuantificado mediante la adición de estreptavidina-peroxidasa más un sustrato (3,3',5,5'- tetrametilbencidina; TMB utilizado como cromóforo).

Se procedió según las indicaciones del fabricante, la placa se examinó a través de un Nanodrop ND-1000 (Spectrophotometer Thermo Scientific) lector óptico a 450 nm y a 620 nm a modo de control. La detección de anticuerpos se realizó de manera semi-cuantitativa tomando como referencia el valor de 5 UI/mL para GAD65 y 10 UI/mL para IA2 y 15 UI/mL para ZnT8. Las muestras con un título mayor o igual al valor considerado fueron “muestras positivas” o con “presencia del anticuerpo analizado”.

4.6. Extracción de RNA total y síntesis de cDNA de miRNAs

La extracción de RNA total se realizó con el método de TRIZOL® (Invitrogen), según las indicaciones del fabricante. Se midió la razón entre la densidad óptica (DO) a 260 nm y 280 nm. Se cuantificó el RNA haciendo uso de un espectrofotómetro ND- 1000 (Spectrophotometer Thermo Scientific) y se sintetizó cDNA de hebra simple a partir de 2 ng de RNA total en cada muestra utilizando un termociclador programado con el siguiente esquema de ciclos: 16°C/30 minutos, 42°C/30 minutos, 85°C/5 minutos, y se utilizó los partidores para transcripción reversa contenidos en un Kit Taqman® MicroRNA Reverse

Transcription (Applied Biosystems by Life Technology, CA, USA) (ID 002301 para hsa-miR-22, ID 002637 para hsa-miR-150) (Tabla 1).

Tabla 1. Reactivos y volúmenes para la reacción de amplificación de DNA complementario (cDNA) específico para cada miRNA.

Componentes	Volumen por reacción
dNTP mix (100mM total)	0.15µl
Multiscribe™ Enzima Transcriptasa Reversa (50U/µl)	1.00µl
Buffer RT 10X	1.5µl
Inhibidor de RNAsa (20U/ µl)	0.19µl
Agua Libre de Nucleasas	4.16µl
RT Primers	3.00µl
RNA	5.00µl
Volumen final	15.00µl

4.7. PCR en tiempo real para miRNAs

Para evaluar la expresión relativa de los miRNAs se realizó una PCR en tiempo real RT-stem loop (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), específica para cada miRNA. Los niveles de expresión fueron determinados con sondas TaqMan MGB y TaqMan Universal PCR Master Mix II (2x), no UNG en duplicado en el equipo (Stratagene Mx 3000P Real-Time PCR Agilent Technologies, CA, USA) (Tabla 2). Los niveles de expresión de miRNA 22 y 150 fueron normalizados con RNU48 como control interno.

Tabla 2. Reactivos y volúmenes para reacción de qPCR.

Componentes	Volumen master mix 20 µl por reacción
TaqMan microRNA assays 20X	1µl
cDNA	1,33µl
TaqMan Universal PCR Master Mix II (2x)	10µl
H2O libre de nucleasas	7,67µl

Nota: Volumen del Master Mix 18,67µl y del producto de PCR 1,33µl.

Se normalizó las muestras tanto de pacientes como de controles mediante el método de $\Delta\Delta Ct$, diseñado para analizar resultados de qPCR y permitir comparar la totalidad de los resultados, es decir los Ct de pacientes, controles y controles endógenos.

4.8. Análisis estadísticos

Se realizó el test de normalidad de Shapiro-Wilk para determinar la distribución de las variables, los datos presentaron una distribución normal y se representaron como media y error estándar de la media. Fueron analizados con estadística paramétrica, utilizando el test de ANOVA de dos vías seguido de una prueba posthoc de Sidak. En todos los casos se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. Se utilizó el paquete estadístico Graphpad Prism v6.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, EEUU).

5. RESULTADOS

5.1. Evaluación de la expresión de miRNAs

Se cuantificó la expresión de los miRNAs mediante qPCR en muestras de CMPs que fueron cultivadas a distintas concentraciones: sin glucosa, 11 mM y 25 mM de glucosa. Todos los análisis fueron realizados en duplicado.

miR-22

En la Figura 2 se observa la expresión relativa del miR-22 en relación a los distintos estímulos de glucosa tanto en CMPs de pacientes DM1 como de controles. Se pudo observar que hay una mayor expresión de miR-22 en las CMPs de pacientes con DM1 comparado con las CMPs de controles en la condición basal ($P < 0,05$). A medida que aumenta el estímulo de glucosa esta expresión tiende a disminuir a concentraciones de glucosa de 11 mM y 25 mM. Las CMPs de pacientes con DM1 exhiben un aumento en la expresión de miR-22 respecto el grupo control, pero este aumento no fue estadísticamente significativo en todas las comparaciones.

miR-150

En la Figura 3 se observa la expresión relativa de miR-150 en relación a los distintos estímulos de glucosa tanto para CMPs de pacientes DM1 como de CMPs de controles. Se pudo observar que hay una menor expresión de este miRNA en las células de pacientes DM1 tanto en los estímulos de 11 mM y 25 mM de glucosa comparado con los controles, y que esta disminución fue estadísticamente significativa para el estímulo de 11 mM de glucosa.

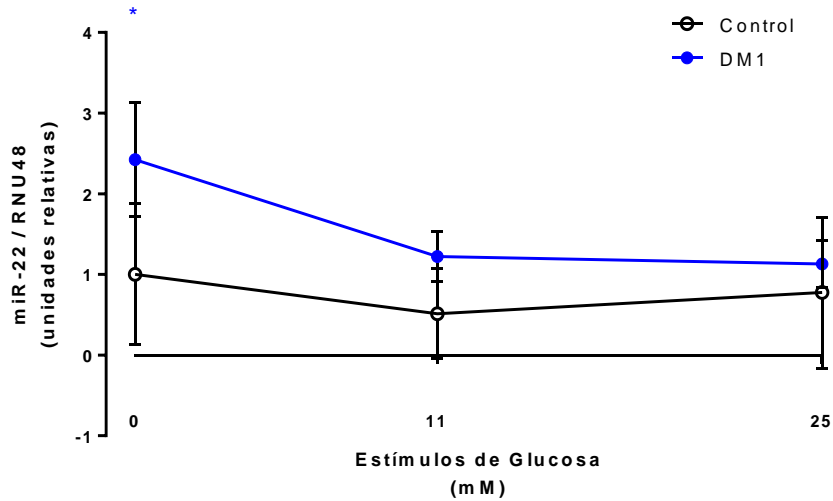


Figura 2. Expresión relativa de miR 22 en células mononucleares periféricas estimuladas a distintas concentraciones de glucosa. Se determinó la expresión relativa mediante qPCR en células de pacientes DM1 (n=20) y sujetos controles (n=20) a distintos estímulos de glucosa (0 mM, 11 mM, 25 mM). Se utilizó como control de normalización RNU48. Los datos se representaron como $X \pm EEM$ y fueron analizados con ANOVA de dos vías seguido de una prueba posthoc de Sidak * $p < 0,05$. Control: \ominus , DM1: \bullet , DM1: Diabetes Mellitus tipo 1, X: media, EEM: error estándar de la media.

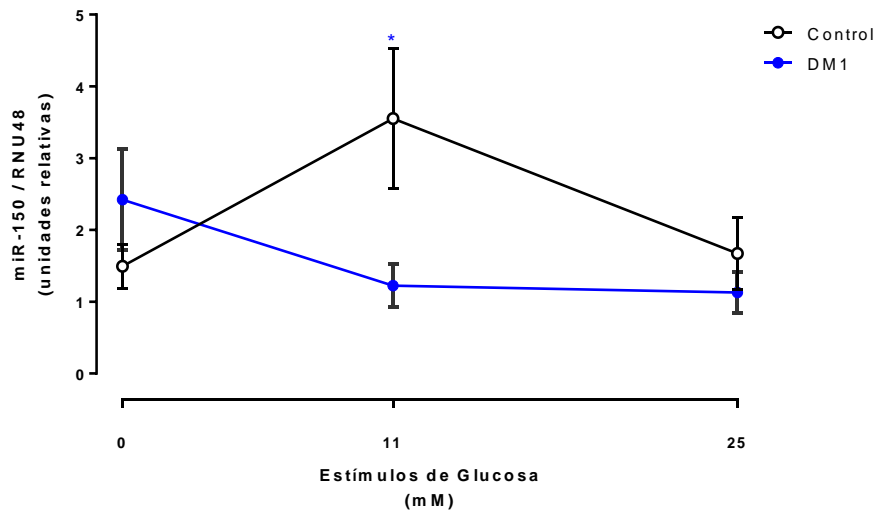


Figura 3. Expresión relativa de miR 150 en células mononucleares periféricas estimuladas a distintas concentraciones de glucosa. Se determinó la expresión relativa mediante qPCR en células de pacientes DM1 (n=20) y sujetos controles (n=20) a distintos estímulos de glucosa (0 mM, 11 mM, 25 mM). Se utilizó como control de normalización RNU48. Los datos se representaron como $X \pm EEM$ y fueron analizados con ANOVA de dos vías seguido de una prueba posthoc de Sidak * $p < 0,05$. Control: \ominus , DM1: \bullet , DM1: Diabetes Mellitus tipo 1, X: media, EEM: error estándar de la media.

5.2. Determinación de Autoanticuerpos: Anti-GAD65, Anti-IA-2 y Anti-ZnT8, mediante ensayos de ELISA.

Se realizó un “*screening*” serológico para los autoanticuerpos en las muestras obtenidas de los pacientes y controles. La determinación de todos los autoanticuerpos se realizó en muestras de suero recolectadas con posterioridad al diagnóstico en pacientes estables desde el punto de vista glicémico y en tratamiento con insulina. Se observó una alta frecuencia de anti-GAD65 y anti-IA-2 positivos (70%) en las muestras de los pacientes DM1, mientras que para las muestras de los sujetos controles no se encontró autoanticuerpos positivos. La frecuencia del autoanticuerpo anti-ZnT8 alcanzó un 55% mientras en los sujetos controles no hubo detección de autoanticuerpos positivos. En la Tabla 3 se observa una alta frecuencia en los pacientes con DM1 respecto de sujetos controles que no dieron positivos.

Tabla N°3: Porcentaje de sujetos con Autoanticuerpos Positivos en muestras de suero de pacientes con DM1 y controles.

Anticuerpos Positivos	Porcentaje de casos DM1 (n=20)	Porcentaje de controles (n=20)
Anti - GAD 65	70 %	0 %
Anti - IA2	70 %	0 %
Anti - Znt8	55 %	0 %

DM1: Diabetes Mellitus tipo 1

5.3. Relación entre marcadores relacionados con autoinmunidad y perfil de expresión de miRNAs.

Se analizó la expresión de miR-22 en las CMPs de pacientes con DM1 según el perfil serológico (positivo o negativo) para cada autoanticuerpo. Se observó que la expresión de miR-22 en CMPs de pacientes DM1 no presentó diferencias al evaluar los autoanticuerpos GAD 65, IA2. Al evaluar a ZnT8 se observó una tendencia hacia la mayor expresión en el grupo de pacientes con autoanticuerpos ZnT8 positivos, sin embargo este aumento no fue estadísticamente significativo. (Figuras 4,5 y 6)

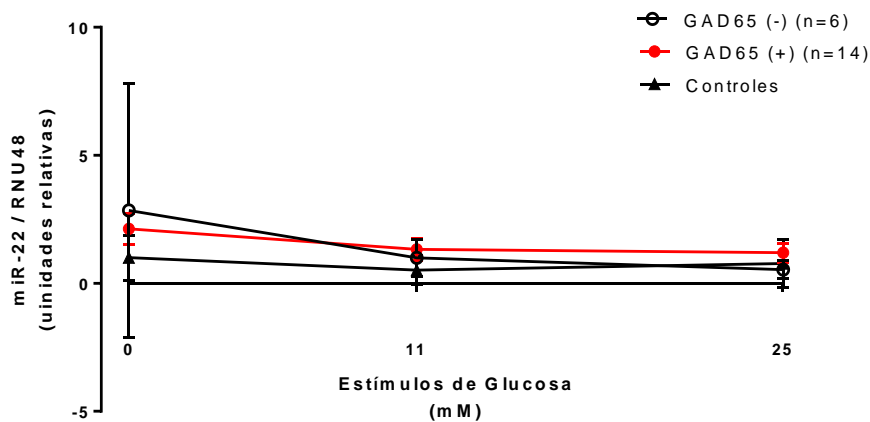


Figura 4. Expresión relativa de miR 22 en células mononucleares periféricas estimuladas a distintas concentraciones de glucosa. Se determinó la expresión relativa mediante qPCR en células de pacientes DM1 positivos para GAD65 (n=14) y pacientes DM1 negativos para GAD65 (n=6) a distintos estímulos de glucosa (0 mM, 11 mM, 25 mM). Se utilizó como control de normalización RNU48. Los datos se representaron como $X \pm EEM$ y fueron analizados con ANOVA de dos vías seguido de una prueba posthoc de Sidak. Negativos GAD 65: \ominus , Positivos GAD65: \bullet , Controles: \blacktriangle , DM1: Diabetes Mellitus tipo 1, X: media, EEM: error estándar de la media.

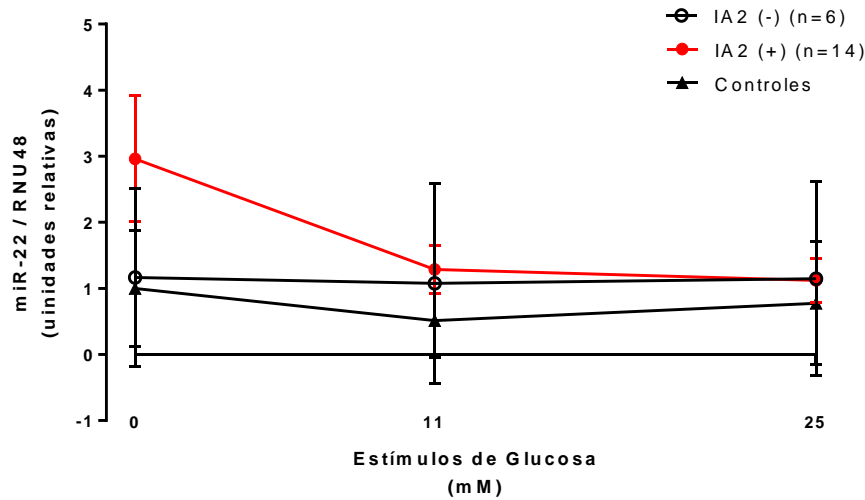


Figura 5. Expresión relativa de miR 22 en células mononucleares periféricas estimuladas a distintas concentraciones de glucosa. Se determinó la expresión relativa mediante qPCR en células de pacientes DM1 positivos para IA2 (n=14) y pacientes DM1 negativos para IA2 (n=6) a distintos estímulos de glucosa (0 mM, 11 mM, 25 mM). Se utilizó como control de normalización RNU48. Los datos se representaron como $X \pm EEM$ y fueron analizados con ANOVA de dos vías seguido de una prueba posthoc de Sidak. Negativos IA2: \ominus , Positivos IA2: \bullet , Controles: \blacktriangle , DM1: Diabetes Mellitus tipo 1, X: media, EEM: error estándar de la media.

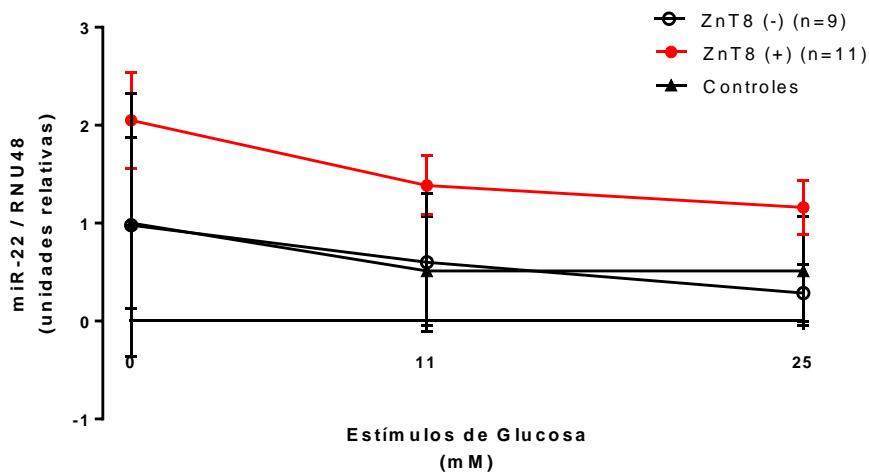


Figura 6. Expresión relativa de miR 22 en células mononucleares periféricas estimuladas a distintas concentraciones de glucosa. Se determinó la expresión relativa mediante qPCR en células de pacientes DM1 positivos para ZnT8 (n=11) y pacientes DM1 negativos para ZnT8 (n=9) a distintos estímulos de glucosa (0 mM, 11 mM, 25 mM). Se utilizó como control de normalización RNU48. Los datos se representaron como $X \pm EEM$ y fueron analizados con ANOVA de dos vías seguido de una prueba posthoc de Sidak. Negativos ZnT8: \ominus , Positivos ZnT8: \bullet , Controles: \blacktriangle , DM1: Diabetes Mellitus tipo 1, X: media, EEM: error estándar de la media.

Se analizó la expresión de miR-150 en las CMPs de pacientes con DM1 según su perfil serológico (positivo o negativo) para cada autoanticuerpo. Se observó que la expresión de miR-150 en pacientes DM1 positivos para GAD 65, IA2, ZnT8 tiende a ser mayor que en pacientes con perfiles negativos para cada autoanticuerpo, sin embargo este aumento no fue estadísticamente significativo. (Figuras 7,8 y 9)

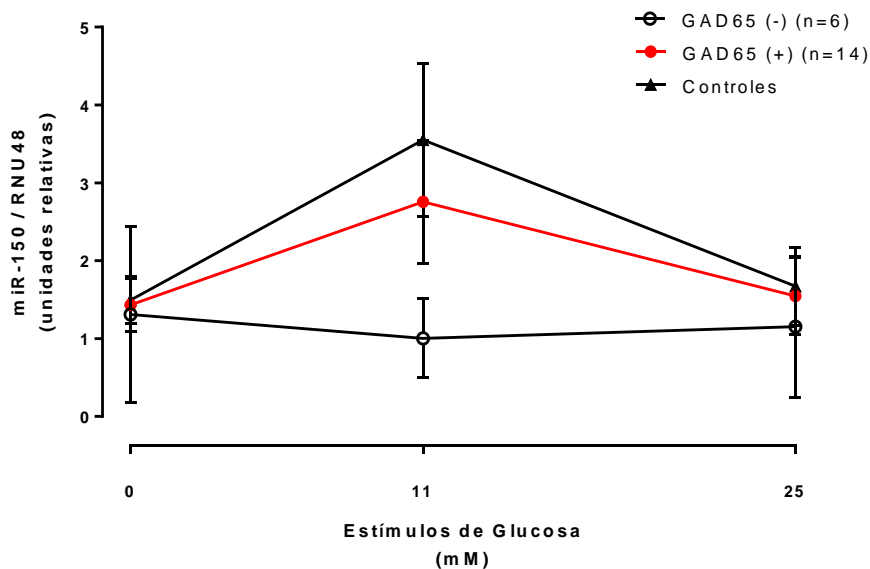


Figura 7. Expresión relativa de miR 150 en células mononucleares periféricas estimuladas a distintas concentraciones de glucosa. Se determinó la expresión relativa mediante qPCR en células de pacientes DM1 positivos para GAD65 (n=14) y pacientes DM1 negativos para GAD65 (n=6) a distintos estímulos de glucosa (0 mM, 11 mM, 25 mM). Se utilizó como control de normalización RNU48. Los datos se representaron como $X \pm EEM$ y fueron analizados con ANOVA de dos vías seguido de una prueba posthoc de Sidak. Negativos GAD 65: \ominus , Positivos GAD65: \bullet , Controles: \blacktriangle , DM1: Diabetes Mellitus tipo I, X: media, EEM: error estándar de la media.

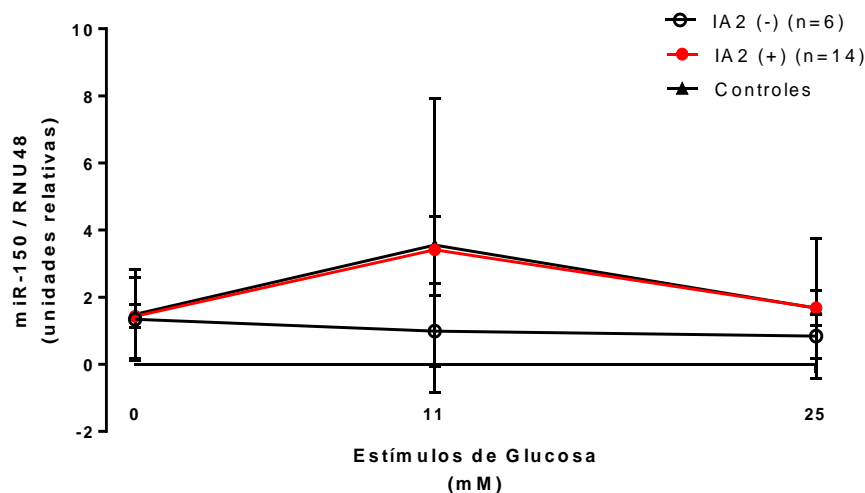


Figura 8. Expresión relativa de miR 150 en células mononucleares periféricas estimuladas a distintas concentraciones de glucosa. Se determinó la expresión relativa mediante qPCR en células de pacientes DM1 positivos para IA2 (n=14) y pacientes DM1 negativos para IA2 (n=6) a distintos estímulos de glucosa (0 mM, 11 mM, 25 mM). Se utilizó como control de normalización RNU48. Los datos se representaron como $X \pm EEM$ y fueron analizados con ANOVA de dos vías seguido de una prueba posthoc de Sidak. Negativos IA2: \ominus , Positivos IA2: \bullet , Controles: \blacktriangle , DM1: Diabetes Mellitus tipo 1, X: media, EEM: error estándar de la media.

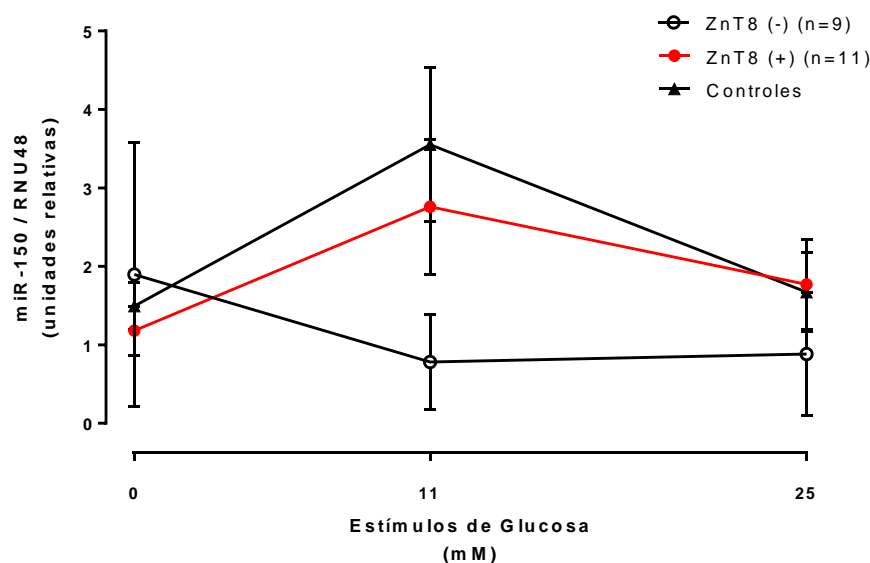


Figura 9. Expresión relativa de miR 150 en células mononucleares periféricas estimuladas a distintas concentraciones de glucosa. Se determinó la expresión relativa mediante qPCR en células de pacientes DM1 positivos para ZnT8 (n=11) y pacientes DM1 negativos para ZnT8 (n=9) a distintos estímulos de glucosa (0 mM, 11 mM, 25 mM). Se utilizó como control de normalización RNU48. Los datos se representaron como $X \pm EEM$ y fueron analizados con ANOVA de dos vías seguido de una prueba posthoc de Sidak. Negativos ZnT8: \ominus , Positivos ZnT8: \bullet , Controles: \blacktriangle , DM1: Diabetes Mellitus tipo 1, X: media, EEM: error estándar de la media.

5.4. Relación entre el perfil de expresión de miRNAs y características clínicas de la enfermedad.

En la Tabla 4 se resume las características clínicas de los pacientes estudiados conforme a si desarrollaron CDA o no. En ella se evidencia que no existen diferencias significativas entre los dos grupos.

Tabla N° 4. Parámetros Clínicos de pacientes DM1 recopilados de historias clínicas de cada paciente.

	Cetoacidosis n= 10	Sin Cetoacidosis n=10
Glicemia Debut (mg/dl)	563,5 ± 185,2	573,2 ± 192,6
Edad (años)	9,1 ± 3,8	8,9 ± 4
Hemoglobina Glicosilada (mg/dl)	10,9 ± 2,4	11 ± 2,2
Edad Debut (años)	6,4 ± 3,4	6,3 ± 3,3

No se encontraron diferencias significativas en los grupos de pacientes analizados.

Se analizó si existe una relación entre la expresión relativa de miR-22 y miR-150 en CMPs de pacientes con DM1, con la presencia o no de CDA en el debut del paciente. Se observó que la expresión de miR-22 en CMPs de pacientes DM1 sin CDA fue mayor que en pacientes DM1 con CDA, pero este aumento solo fue significativo en la condición basal sin estímulo de glucosa. (Figura 10)

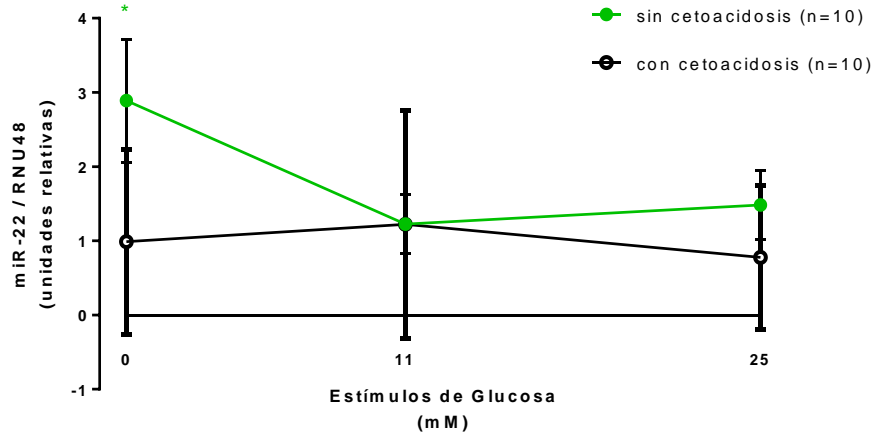


Figura 10. Expresión relativa de miR-22 mediante qPCR en células de pacientes DM1 con cetoacidosis (n=10) y pacientes DM1 sin cetoacidosis (n=10) a distintos estímulos de glucosa (0 mM, 11 mM, 25 mM). Se utilizó como control de normalización RNU48. Los datos se representaron como $X \pm EEM$ y fueron analizados con ANOVA de dos vías seguido de una prueba posthoc de Sidak * $p < 0,05$. Sin Cetoacidosis: ●, Con Cetoacidosis: ○, DM1: Diabetes Mellitus tipo 1, X: media, EEM: error estándar de la media.

Se analizó la expresión de miR-150 en CMPs de pacientes con DM1 según su cuadro de presentación (con CDA o sin CDA). Se observó que la expresión de miR-150 en CMPs de pacientes DM1 sin CDA fue mayor que en pacientes DM1 con CDA, pero este aumento solo fue significativo en la condición de 11mM de glucosa. (Figura 11).

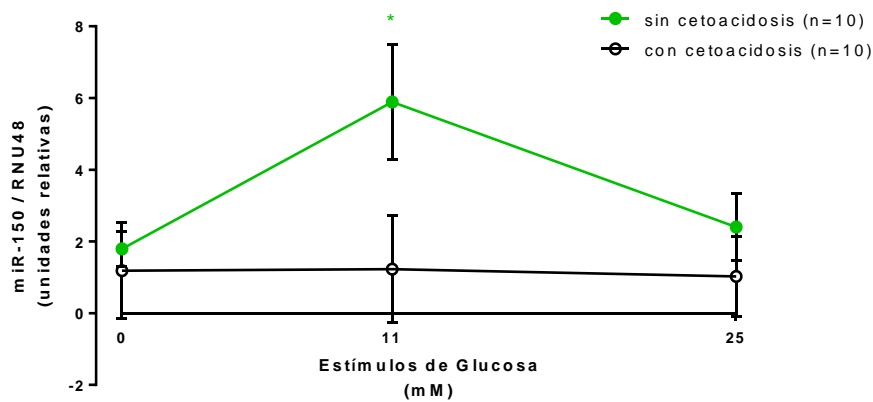


Figura 10. Expresión relativa de miR-150 mediante qPCR en células de pacientes DM1 con cetoacidosis (n=10) y pacientes DM1 sin cetoacidosis (n=10) a distintos estímulos de glucosa (0 mM, 11 mM, 25 mM). Se utilizó como control de normalización RNU48. Los datos se representaron como $X \pm EEM$ y fueron analizados con ANOVA de dos vías seguido de una prueba posthoc de Sidak * $p < 0,05$. Sin Cetoacidosis: ●, Con Cetoacidosis: ○, DM1: Diabetes Mellitus tipo 1, X: media, EEM: error estándar de la media.

Otra característica clínica que se analizó fue la glicemia al momento del debut (glicemia alta o glicemia baja). Para este estudio fueron categorizadas como glicemias altas, todas las glicemias mayores a la mediana y como glicemias bajas todas las glicemias inferiores a la mediana.

La mediana fue estimada entre la glicemia más alta (1054 mg/dl) y la glicemia más baja (300 mg/dl). La expresión relativa de miR-22 y miR-150 en pacientes no fue significativa en ninguna condición con respecto a la glicemia de debut. (Figuras 12 y 13)

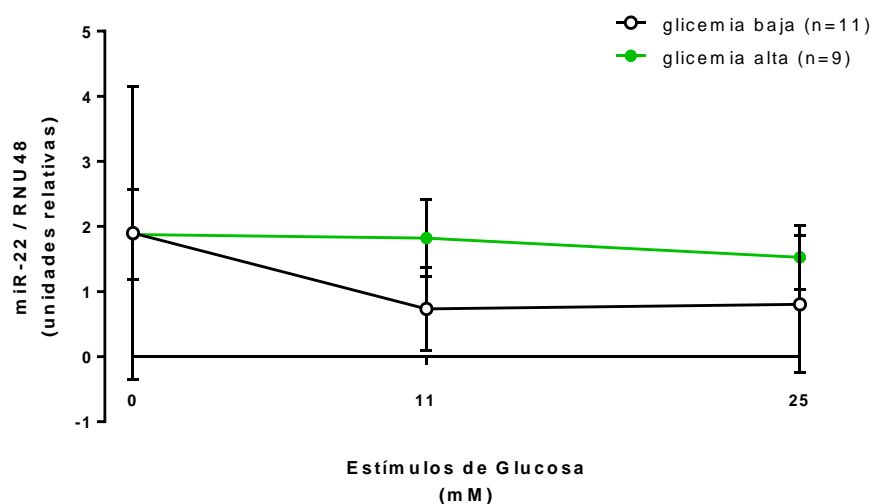


Figura 12. Expresión relativa de miR-22 mediante qPCR en células de pacientes DM1 con glicemia de debut alta (n=9) y células de pacientes DM1 con glicemia de debut baja (n=11) a distintos estímulos de glucosa (0 mM, 11 mM, 25 mM). Se utilizó como control de normalización RNU48. Los datos se representaron como $X \pm EEM$ y fueron analizados con ANOVA de dos vías seguido de una prueba posthoc de Sidak * $p < 0,05$. Glicemia Baja: \circ , Glicemia Alta: \bullet , DM1: Diabetes Mellitus tipo 1, X: media, EEM: error estándar de la media.

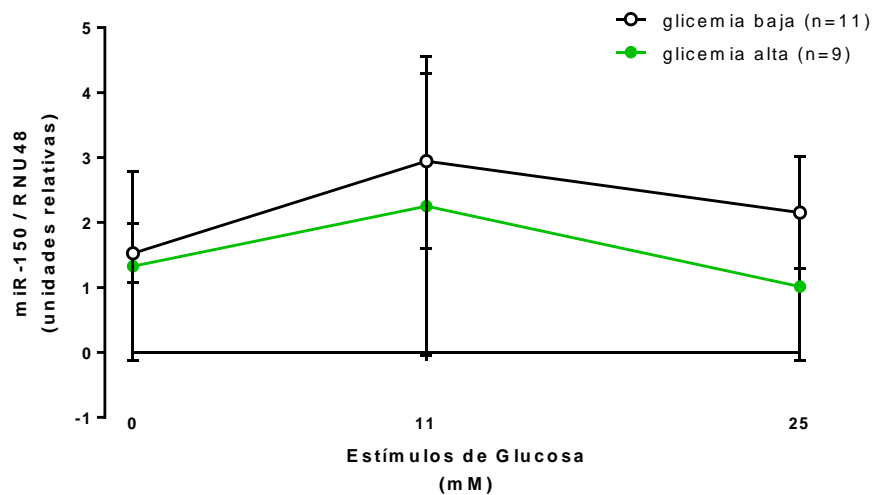


Figura 13. Expresión relativa de miR-150 mediante qPCR en células de pacientes DM1 con glicemia de debut alta (n=9) y células de pacientes DM1 con glicemia de debut baja (n=11) a distintos estímulos de glucosa (0mM, 11 mM, 25 mM). Se utilizó como control de normalización RNU48. Los datos se representaron como $X \pm EEM$ y fueron analizados con ANOVA de dos vías seguido de una prueba posthoc de Sidak * $p < 0,05$. Glicemia Baja: \ominus , Glicemia Alta: \bullet , DM1: Diabetes Mellitus tipo 1, X: media, EEM: error estándar de la media.

6. DISCUSIÓN

6.1. Expresión de miRNAs en Pacientes con DM1.

Las muestras de sangre recolectadas para este estudio fueron tomadas posteriormente a la estabilización de los niveles de glucosa en sangre de los pacientes, ya que la mayoría de éstos acudieron en primera instancia al servicio de emergencia por un cuadro de cetoacidosis con rangos de glicemia muy altos (entre 300 y 1054 mg/dl). Bajo este contexto clínico pensamos que los mecanismos celulares e inmunológicos pueden verse alterados como producto de la alza en los niveles de glucosa. En este sentido, para evaluar el efecto de la hiperglicemia en la expresión de miRNAs y su relación con autoinmunidad y características clínicas, las CMPs de pacientes DM1 fueron expuestas a diferentes estímulos de glucosa (0mM, 11mM simulando hiperglicemia moderada y 25mM simulando hiperglicemia severa crónica).

Diversos miRNAs se han encontrado incrementados en los linfocitos de sangre periférica de pacientes con enfermedades autoinmunes, entre ellas DM1 (86, 87). Otros estudios han reportado cambios en los niveles de expresión de miRNAs asociados con DM1 o sus complicaciones pero, aún no se llega a entender la relevancia de estas variaciones en todo el contexto de la enfermedad (63). Es por esto que nos resulta importante evaluar los niveles de expresión de estos miRNAs para conocer su potencial como posibles biomarcadores de la enfermedad, especialmente ligada a la hiperglicemia presente ya que se ve relacionada con los efectos más indeseados de esta condición así como de sus futuras complicaciones.

Actualmente las posibles relaciones de los miRNAs con los mecanismos de regulación post-transcripcional en complicaciones diabéticas son un área de gran interés tanto para entender las vías moleculares que conducen a las complicaciones así como para el descubrimiento de

nuevos blancos terapéuticos (88). Tal es el caso de miR-22 que hasta la fecha no ha sido documentado en estudios de DM1 pero si se ha encontrado aumentado en cardiomiopatía diabética que es una de las complicaciones macrovasculares más severas ya que representa la más alta mortalidad asociada a diabetes (89). Se ha sugerido que miR-22 actúa como regulador en la hipertrofia de cardiomiocitos y en el remodelamiento cardíaco teniendo a SIRT-1 y HDAC-4 como blancos (90).

Por otro lado el análisis de los niveles de expresión de estos miRNAs es importante ya que se ha señalado que la expresión de varios de ellos puede verse alterada o ser susceptible de cambio dependiendo de la concentración de glucosa a la que hayan sido sometidos (91) como por ejemplo la expresión del miR-21 que está usualmente incrementado en pacientes DM1, y esto se debe a los altos niveles de glucosa en sangre que ellos presentan (92).

De acuerdo a lo descrito previamente en el estudio publicado por Salas-Pérez et al en el año 2013 (72), en CMPs de pacientes con DM1 donde se compararon el perfil de expresión de miRNAs (miR-21 y miR-93) a diferentes condiciones de glucosa (Basal, 11mM y 25mM), se observó una disminución de la expresión de miR-21 y miR-93 en el grupo de pacientes en todas las condiciones con respecto a los controles.

Nuestro estudio mostró que el nivel de expresión de miR -22 en CMPs de pacientes con DM1 se encuentra aumentado con respecto a los controles, bajo la condición sin estímulo de glucosa y que la expresión de este miRNA disminuyó en las condiciones de 11 y 25 mM de glucosa pero esta disminución no fue estadísticamente significativa. Este hecho podría indicar cierto grado de sensibilidad de este miRNA a variaciones de glucosa del orden hiperglicémico.

Un estudio realizado en células β demostró que diversos miRNAs, entre ellos miR-22, presentaban un patrón de expresión aumentado luego de ser expuestos a dosis altas de glucosa

(25mM), mientras que solo un grupo pequeño de miRNAs presento un patrón de expresión disminuido luego de ser sometidos a dosis altas de glucosa (25mM) (85).

6.2. miR-22 y su relación con células T.

Existe importante evidencia que ha reportado que los miRNAs son esenciales para un funcionamiento inmune normal de células T. Es así que diversos estudios con miRNAs han revelado un patrón expresión alterado en variadas patologías autoinmunes en donde están directa o indirectamente relacionados con la función o desarrollo de células T (70).

miR -22 actúa sobre el mRNA del receptor de estrógeno alfa (ER α) resultando en la represión de la señalización de estrógeno la cual es requerida para la diferenciación de células T (93).

Por lo tanto la señalización de estrógeno a través ER α podría estar asociado con efectos regulatorios inmunes caracterizados por una fuerte inhibición auto antígeno específica de linfocitos TH1 y TH17 (94). De esta forma miR-22 podría jugar un rol importante en la estimulación de activación del sistema inmune en DM1.

El reclutamiento de las células TH1 y TH2 hacia los islotes es un paso crítico en la patogenia de la enfermedad. Las quimioquinas, citoquinas que promueven la migración de células mononucleares, podrían dirigir el tráfico hacia la célula diana, la expresión temporal de quimioquinas y la polarización de su expresión por células TH1 frente a TH2 determinaría la composición de la insulitis y la posterior destrucción o protección de las células β (95, 96).

Los linfocitos TH17 han sido relacionados con anterioridad en la patogénesis y severidad de varias enfermedades autoinmunes (97, 98). Es por esto que creemos que miR-22 al inhibir esta vía de señalización estrogénica, aumentaría el número de linfocitos TH involucrados en el mecanismo autoinmune contra células β de DM1.

También es conocido que los estrógenos participan en una variedad de enfermedades autoinmunes como en esclerosis múltiple y artritis reumatoide donde el tratamiento con estrógenos es beneficioso, mientras que en lupus eritematoso sistémico el tratamiento estrogénico empeora la enfermedad (99). Se ha demostrado que el efecto protector de los estrógenos depende de la presencia de un ER α intacto. Además se ha observado que los estrógenos inducen alteraciones en la producción de citoquinas durante la respuesta auto-antígeno específica la cual se realiza a través del ER α (100).

Se conoce que los estrógenos inducen protección en varias enfermedades autoinmunes y podrían estar mediados por varios mecanismos incluyendo los efectos en células T autoreactivas (101, 102), inducción de células T regulatorias (Treg) (103) y modulación de la función de CPA (104). FoxP3 es un represor transcripcional requerido para el desarrollo y función de células T regulatorias (Treg). La deficiencia de FoxP3 conduce a varias enfermedades autoinmunes. Estudios *in vivo e in vitro* han demostrado que los estrógenos son capaces de aumentar la expresión de FoxP3 (103). Además, en estudios publicados por Marson et al, y Zheng et al, en el año 2007 (105, 106) identificaron a cuatro miRNAs como potenciales blancos de FoxP3 en ratones entre ellos miR-22.

De acuerdo a los datos obtenidos en este trabajo para miR-22, se podría especular que este miRNA al reprimir la señalización de estrógenos a través del ER α podría actuar sobre FoxP3 un factor de transcripción requerido para la diferenciación de Treg, dificultando la acción de células regulatorias necesarias en el proceso autoinmune característico de DM1.

6.3. miR-150 y su relación con DM1

En nuestro estudio al realizar la cuantificación de miR-150 en CMPs se observó que los pacientes presentaron menor expresión de este miRNA en relación a los controles. Estos resultados se contraponen a la hipótesis planteada, que mencionaba que esta molécula se encontraría incrementada en CMPs de pacientes con DM1 básicamente por ser una molécula que se encuentra regulando múltiples pasos del desarrollo y diferenciación de Linfocitos T y B.

Se conoce que miR-150 se encuentra expresado en formas maduras de linfocitos T y B (82) , además participa en el desarrollo y diferenciación de estos linfocitos donde puede bloquear el desarrollo de formas inmaduras de linfocitos B (55). Además miR-150 controla la activación normal de células T al actuar sobre Myb, un factor de transcripción que controla múltiples pasos del desarrollo de Linfocitos T y B (107).

miR-150 es requerido en la diferenciación de linfocitos y sus progenitores, al actuar sobre Notch3, otro factor de transcripción relacionado con la diferenciación de células T. También se ha observado que durante la maduración de células T los niveles de mRNA y de la proteína de Notch3 disminuyen y que la expresión de miR-150 aumenta, hecho que indica que la presencia de dicho miRNA juega un papel importante en la diferenciación de linfocitos T (108, 109).

Al analizar miR-150 observamos una menor expresión bajo la concentración de 11mM glucosa, que fue la concentración que utilizamos para simular el cuadro de un paciente expuesto a una hiperglicemia moderada leve. La menor expresión de miR-150 nos podría indicar que, a diferencia de otros microRNAs, la hiperglicemia se relacionaría con los bajos niveles de expresión en CMPs de pacientes con DM1. No es sorprendente encontrar que los

niveles de expresión de miRNAs se vean alterados con nutrientes como la glucosa, ya que se ha descrito en otros estudios que la hiperglicemia y los cambios de glucosa en sangre controlan estrechamente la transcripción del gen de insulina, la estabilidad del mRNA de insulina, y la secreción de insulina (110, 111).

miR-150 en nuestro estudio no presentó una mayor expresión y por lo tanto su rol en el desarrollo y diferenciación de Linfocitos T y B no pudo ser relacionado. Existe un estudio realizado *in vivo e in vitro*, el cual demostró que las dosis altas de glucosa causan una disminución en la expresión de miR-150 e incrementan la expresión del factor de transcripción p300 concomitantemente con la hipertrofia de cardiomiocitos en ratas diabéticas, esto debido a la activación de PKC β_2 (protein kinase C beta 2) (112). Es probable, que este miRNA en nuestro sistema de CMPs no sea tan sensible a la glucosa como lo observado en la hipertrofia de cardiomiocitos donde la hiperglicemia es uno de los eventos que estimulan la hipertrofia celular, sin embargo se abre la posibilidad de que la disminución en la expresión miR-150 se vincule con la activación de vías de señalización relacionadas con glucosa.

Se conoce que la activación de la señalización de PKC β_2 es una de las principales vías inducidas por glucosa en complicaciones diabéticas (113, 114). Además se ha demostrado que varias isoformas de PKC pueden alterar la expresión de miRNAs relacionados con el sistema inmune y con la regulación de proliferación y diferenciación celular. Por ejemplo un estudio mostró que la PKC θ puede regular negativamente la expresión de miRNAs en LT humanos (115-117).

Es por esto que se podría especular que la disminución de miR-150 activando la vía de señalización de PKC θ podría relacionarse con el proceso autoinmune en DM1, ya que se conoce que la hiperglicemia y consecuente incremento en los niveles de estrés oxidativo pueden activar varias vías de señalización como PKC y MAP quinasas (MAPKs) que

conducen al incremento de activación de factores de transcripción como NF-KB (factor nuclear kapa beta), el cual promueve la expresión de un grupo importante de genes inflamatorios los cuales promueven la activación y proliferación de células T (118, 119).

6.4. Determinación de Autoanticuerpos en DM1 en pacientes chilenos

Con respecto a la determinación de autoanticuerpos en los pacientes con DM1 se realizó un análisis serológico para los autoanticuerpos GAD-65 (descarboxilasa del ácido glutámico) e IA-2 (tirosina fosfatasa pancreática). Se observó una alta frecuencia (70%) de los pacientes que fueron positivos para ambos autoanticuerpos, resultado que es esperable de acuerdo a lo registrado en la literatura (19) donde la presencia de los autoanticuerpos GAD-65 e IA-2 representa un riesgo alto de asociación a DM1.

Cabe mencionar que las altas frecuencias solo se presentan en muestras de pacientes con DM1. Si bien es reconocido que los autoanticuerpos GAD65 e IA2 son propios de DM1, la determinación de ZnT8 presento una frecuencia de 55% de casos positivos. Su importancia radica en que, a diferencia de los otros autoanticuerpos mencionados, el anti-ZnT8 aparentemente no estaría asociado con el antígeno leucocitario humano (HLA) de clase II y por lo tanto podría ser muy útil en la detección de personas con bajo riesgo genético de desarrollar la enfermedad (22). Por esto es importante mencionar que la determinación de este autoanticuerpo podría ser de gran utilidad en la búsqueda de nuevos casos de DM1, así como en el análisis de progresión y desarrollo de DM1.

6.5. Relación entre perfil de auto-anticuerpos y perfil de expresión de miRNAs.

Los antígenos IA-2 IA-2B y el GAD-65 son los principales autoantígenos en DM1. Como hemos mencionado, los autoanticuerpos de estos autoantígenos aparecen años antes de la aparición clínica de la enfermedad y son usados como marcadores predictivos (120). Poco se conoce acerca de cómo ocurre la regulación de la expresión de los autoantígenos en DM1. Estudios recientes demuestran que los miRNAs están relacionados en la regulación de la expresión de los principales autoantígenos en DM1. Estos estudios encontraron que 32 miRNAs están localizados en la misma región genómica localizada en el cromosoma 14q32 y podrían actuar sobre el mRNA de los autoantígenos en DM1 y que 12 de estos miRNAs son sensibles a cambios de glucosa (85, 121).

Al analizar el perfil de autoanticuerpos (GAD65; IA-2 y ZnT8) y compararlos con la expresión de miRNAs (miR-22 y miR-150) no se encontraron diferencias significativas entre estas variables, por lo que se podría decir que los valores de la expresión de miRNAs son independientes del perfil de auto-anticuerpos para DM1. Sin embargo, se observó cierta tendencia en la expresión de miR-22 al analizar el anticuerpo ZnT8 en el grupo de pacientes positivos para este autoanticuerpo, lo que podría indicar que este autoanticuerpo frecuentemente asociado al grupo de pacientes con bajo riesgo de desarrollar la enfermedad mantiene cierta relación con la expresión de mir-22. Esta observación se hizo más evidente al incorporar al grupo de sujetos controles que por definición fueron negativos para ZnT8 y que muestran un comportamiento similar al de los pacientes DM1 negativos. Hasta el momento existen pocos estudios que han relacionado perfil de autoinmunidad y el perfil de expresión de miRNAs. Uno de ellos encontró que miR-326 estaba incrementado en linfocitos de sangre periférica de pacientes con DM1 (87).

6.6. Relación entre el perfil de expresión de miRNAs y características clínicas de la enfermedad.

Respecto de la comparación del perfil de expresión de miRNAs y características clínicas, el grupo de pacientes sin CDA mostró un aumento en la expresión de miR-22 y miR-150, siendo observado este efecto con mayor impacto en la condición basal para miR-22 y en la condición de 11mM de glucosa para miR-150.

Este es el primer estudio que busca encontrar una relación entre la expresión de miRNAs y el componente de CDA, ya que la mayoría de estudios se encuentran enfocados en el abordaje clínico y terapéutico de esta complicación en DM1 (32, 33). Un estudio reciente identificó un aumento de dos citoquinas pro-inflamatorias (IL-6 y TNF- α) en el plasma de pacientes con CDA indicando la importancia de seguir realizando estudios que ayuden a revelar su función y su potencial como posibles biomarcadores (122).

Es posible que esto se deba a la dificultad que representa acceder a una muestra en el debut de estos pacientes. Sin embargo, este aumento de expresión de miR-22 y miR-150 en pacientes sin CDA nos demuestra la importancia de explorar nuevos biomarcadores bioquímicos o genéticos que puedan ayudarnos a entender el cuadro de CDA.

Respecto de la comparación del perfil de expresión de miRNAs y la glicemia al momento del debut (categorizados como glicemia alta o glicemia baja) no se encontró significancia estadística para ninguno de los miRNAs analizados. Es probable que la expresión de estos miRNAs no se relacione con la glicemia al momento del debut ya que todos eran valores de glicemia eran elevados (entre 300 y 1054 mg/dl) y esto pudo haber influido en que no se encontraran diferencias significativas.

Dichos resultados contrastan con la hipótesis planteada en la que esperábamos encontrar una relación de mayor expresión de ambos miRNAs en el grupo de pacientes DM1 que presentan características clínicas agresivas.

7. CONCLUSIONES

Las CMPs de pacientes con DM1 presentan una mayor expresión de miR-22 en comparación a sujetos controles. Esta mayor expresión se observó con más claridad en la condición basal sin estímulo de glucosa, además esta mayor expresión también se observó en el grupo de pacientes sin CDA y disminuyó en condiciones 11 y 25 mM de glucosa lo que indica que este miRNA es sensible a cambios de glucosa los cuales han sido relacionados frecuentemente a complicaciones diabéticas.

En el caso de miR-150 se observó una menor expresión que es dependiente del estímulo de glucosa ya que se conoce que la hiperglicemia puede activar varias vías de señalización como de PKC que promueven la activación y proliferación de células T.

Si bien no se encontró relación entre la expresión de miRNAs y el perfil de autoinmunidad, este trabajo abre un campo importante respecto de regulación génica que subyace en las CMPs de pacientes con DM1 y la posibilidad de que diversos miRNAs regulen la expresión de los principales autoantígenos en DM1. A raíz de estas diferencias encontradas, se podría proponer el estudio de diversos genes que son regulados por estos pequeños RNAs no codificantes, entre ellos, los genes SIRT-1, Myb, ER α , FoxP3, blancos predichos bioinformáticamente y validados en otros tipos celulares y en modelos de otras patologías como cáncer, enfermedades autoinmunes, DM2 o asociados a complicaciones diabéticas en varios estudios. El estudio en detalle de estas posibles interacciones permitiría comprender mejor este eje de regulación que

se observa en las CMPs y que podrían tener relevancia en los procesos de regulación autoinmune que se han observado en linfocitos T de pacientes con DM1 y en el desarrollo de la enfermedad.

Este estudio demostró que estos miRNAs tienen un perfil de expresión diferencial en CMPs de pacientes con DM1 comparados con los controles sugiriendo que estos miRNAs estarían involucrados en la regulación de Linfocitos T.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. ADA. Summary of revisions for the 2013 clinical practice recommendations. *Diabetes care*. 2013;36 Suppl 1:S3. Epub 2013/01/04.
2. van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiological reviews*. 2011;91(1):79-118. Epub 2011/01/21.
3. Dang MN, Buzzetti R, Pozzilli P. Epigenetics in autoimmune diseases with focus on type 1 diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2013;29(1):8-18. Epub 2012/11/28.
4. IDF. Five questions on the IDF Diabetes Atlas. 2013 [updated Nov; cited 102 2]; 2013/12/03:[147-8].
5. Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E, Libman I, LaPorte R, Tuomilehto J. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. *Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. Diabetes care*. 2000;23(10):1516-26. Epub 2000/10/07.
6. Borchers AT, Uibo R, Gershwin ME. The geoepidemiology of type 1 diabetes. *Autoimmunity reviews*. 2010;9(5):A355-65. Epub 2009/12/09.
7. Onkamo P, Vaananen S, Karvonen M, Tuomilehto J. Worldwide increase in incidence of Type I diabetes--the analysis of the data on published incidence trends. *Diabetologia*. 1999;42(12):1395-403. Epub 2000/01/29.
8. Carrasco E, Perez-Bravo F, Dorman J, Mondragon A, Santos JL. Increasing incidence of type 1 diabetes in population from Santiago of Chile: trends in a period of 18 years (1986-2003). *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2006;22(1):34-7. Epub 2005/05/14.
9. Dahlquist G. Environmental factors and type 1 diabetes. *Diabetes care*. 2001;24(1):180-2. Epub 2001/02/24.
10. Huber A, Menconi F, Corathers S, Jacobson EM, Tomer Y. Joint genetic susceptibility to type 1 diabetes and autoimmune thyroiditis: from epidemiology to mechanisms. *Endocrine reviews*. 2008;29(6):697-725. Epub 2008/09/09.
11. Thomas IH, Pietropaolo M. Type 1 diabetes: a genetic Pandora's box? *Pediatric diabetes*. 2010;11(8):511-2. Epub 2010/12/02.
12. Sugihara S. Genetic susceptibility of childhood type 1 diabetes mellitus in Japan. *Pediatric endocrinology reviews : PER*. 2012;10 Suppl 1:62-71. Epub 2013/01/22.
13. Chatenoud L, Bluestone JA. CD3-specific antibodies: a portal to the treatment of autoimmunity. *Nature reviews Immunology*. 2007;7(8):622-32. Epub 2007/07/21.
14. Narendran P, Estella E, Fourlanos S. Immunology of type 1 diabetes. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. 2005;98(8):547-56. Epub 2005/06/16.
15. Knip M, Siljander H. Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes. *Autoimmunity reviews*. 2008;7(7):550-7. Epub 2008/07/16.
16. Herold KC, Brooks-Worrell B, Palmer J, Dosch HM, Peakman M, Gottlieb P, et al. Validity and reproducibility of measurement of islet autoreactivity by T-cell assays in subjects with early type 1 diabetes. *Diabetes*. 2009;58(11):2588-95. Epub 2009/08/14.
17. Seyfert-Margolis V, Gisler TD, Asare AL, Wang RS, Dosch HM, Brooks-Worrell B, et al. Analysis of T-cell assays to measure autoimmune responses in subjects with type 1 diabetes: results of a blinded controlled study. *Diabetes*. 2006;55(9):2588-94. Epub 2006/08/29.
18. Leslie RD, Atkinson MA, Notkins AL. Autoantigens IA-2 and GAD in Type I (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*. 1999;42(1):3-14. Epub 1999/02/23.
19. Kulmala P, Savola K, Petersen JS, Vahasalo P, Karjalainen J, Loppinen T, et al. Prediction of insulin-dependent diabetes mellitus in siblings of children with diabetes. A population-based study. *The Childhood Diabetes in Finland Study Group. The Journal of clinical investigation*. 1998;101(2):327-36. Epub 1998/02/07.
20. Hawa MI, Fava D, Medici F, Deng YJ, Notkins AL, De Mattia G, et al. Antibodies to IA-2 and GAD65 in type 1 and type 2 diabetes: isotype restriction and polyclonality. *Diabetes care*. 2000;23(2):228-33. Epub 2000/06/27.
21. Lampasona V, Petrone A, Tiberti C, Capizzi M, Spoletini M, di Pietro S, et al. Zinc transporter 8 antibodies complement GAD and IA-2 antibodies in the identification and characterization of adult-onset autoimmune diabetes: Non Insulin Requiring Autoimmune Diabetes (NIRAD) 4. *Diabetes care*. 2010;33(1):104-8. Epub 2009/10/08.
22. Long AE, Gooneratne AT, Rokni S, Williams AJ, Bingley PJ. The role of autoantibodies to zinc transporter 8 in prediction of type 1 diabetes in relatives: lessons from the European Nicotinamide Diabetes

- Intervention Trial (ENDIT) cohort. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(2):632-7. Epub 2011/12/14.
23. Purohit S, She JX. Biomarkers for type 1 diabetes. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2008;1(2):98-116. Epub 2008/12/17.
 24. Alizadeh BZ, Koeleman BP. Genetic polymorphisms in susceptibility to Type 1 Diabetes. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2008;387(1-2):9-17. Epub 2007/10/30.
 25. Salas F, Santos J, Pérez F. Genetic of type 1 Diabetes mellitus. *Revista chilena endocrinología* 2013; 6 (1):15-22.
 26. Undlien DE, Thorsby E. HLA associations in type 1 diabetes: merging genetics and immunology. *Trends in immunology*. 2001;22(9):467-9. Epub 2001/08/30.
 27. Pociot F, Akolkar B, Concannon P, Erlich HA, Julier C, Morahan G, et al. Genetics of type 1 diabetes: what's next? *Diabetes*. 2010;59(7):1561-71. Epub 2010/07/01.
 28. Sonderstrup G, McDevitt HO. DR, DQ, and you: MHC alleles and autoimmunity. *The Journal of clinical investigation*. 2001;107(7):795-6. Epub 2001/04/04.
 29. Nejentsev S, Howson JM, Walker NM, Szeszko J, Field SF, Stevens HE, et al. Localization of type 1 diabetes susceptibility to the MHC class I genes HLA-B and HLA-A. *Nature*. 2007;450(7171):887-92. Epub 2007/11/16.
 30. Santos JL, Perez-Bravo F, Carrasco E, Calvillan M, Albala C. Association between HLA-DQB1 alleles and type 1 diabetes in a case-parents study conducted in Santiago, Chile. *American journal of epidemiology*. 2001;153(8):794-8. Epub 2001/04/11.
 31. Kitabchi AE, Umpierrez GE, Fisher JN, Murphy MB, Stentz FB. Thirty years of personal experience in hyperglycemic crises: diabetic ketoacidosis and hyperglycemic hyperosmolar state. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008;93(5):1541-52. Epub 2008/02/14.
 32. Balasubramanyam A, Zern JW, Hyman DJ, Pavlik V. New profiles of diabetic ketoacidosis: type 1 vs type 2 diabetes and the effect of ethnicity. *Archives of internal medicine*. 1999;159(19):2317-22. Epub 1999/11/05.
 33. Misra S, Oliver N, Dornhorst A. Diabetic ketoacidosis: not always due to type 1 diabetes. *BMJ (Clinical research ed)*. 2013;346:f3501. Epub 2013/06/12.
 34. Kitabchi AE, Wall BM. Diabetic ketoacidosis. *The Medical clinics of North America*. 1995;79(1):9-37. Epub 1995/01/01.
 35. Raghupathy P. Diabetic ketoacidosis in children and adolescents. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2015;19(Suppl 1):S55-7.
 36. Pirot P, Cardozo AK, Eizirik DL. Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2008;52(2):156-65. Epub 2008/04/29.
 37. Atkinson MA, Bluestone JA, Eisenbarth GS, Hebrok M, Herold KC, Accili D, et al. How does type 1 diabetes develop?: the notion of homicide or beta-cell suicide revisited. *Diabetes*. 2011;60(5):1370-9. Epub 2011/04/29.
 38. Kukreja A, Maclaren NK. Autoimmunity and diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1999;84(12):4371-8. Epub 1999/12/22.
 39. Ounissi-Benkhalha H, Polychronakos C. The molecular genetics of type 1 diabetes: new genes and emerging mechanisms. *Trends in molecular medicine*. 2008;14(6):268-75. Epub 2008/05/17.
 40. Korsmeyer SJ. Regulators of cell death. *Trends in genetics : TIG*. 1995;11(3):101-5. Epub 1995/03/01.
 41. Riboulet-Chavey A, Diraison F, Siew LK, Wong FS, Rutter GA. Inhibition of AMP-activated protein kinase protects pancreatic beta-cells from cytokine-mediated apoptosis and CD8+ T-cell-induced cytotoxicity. *Diabetes*. 2008;57(2):415-23. Epub 2007/11/16.
 42. Miller JF, Flavell RA. T-cell tolerance and autoimmunity in transgenic models of central and peripheral tolerance. *Current opinion in immunology*. 1994;6(6):892-9. Epub 1994/12/01.
 43. Sprent J, Kishimoto H. The thymus and negative selection. *Immunological reviews*. 2002;185:126-35. Epub 2002/08/23.
 44. Fife BT, Bluestone JA. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunological reviews*. 2008;224:166-82. Epub 2008/09/02.
 45. Ryan A, Murphy M, Godson C, Hickey FB. Diabetes mellitus and apoptosis: inflammatory cells. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2009;14(12):1435-50. Epub 2009/04/11.
 46. Maher S, Toomey D, Condron C, Bouchier-Hayes D. Activation-induced cell death: the controversial role of Fas and Fas ligand in immune privilege and tumour counterattack. *Immunology and cell biology*. 2002;80(2):131-7. Epub 2002/04/10.

47. Vendrame F, Santangelo C, Misasi R, Dionisi S, Gizzi C, Realacci M, et al. Defective lymphocyte caspase-3 expression in type 1 diabetes mellitus. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2005;152(1):119-25. Epub 2005/03/15.
48. Valencia E, Codner E, Salas-Perez F, Pizarro C, Carrasco PE, Arredondo M, et al. High glucose concentration in T1D patients modulates apoptotic protein expression: down regulation of BAX and FAS and up regulation of XIAP. *Human immunology*. 2012;73(8):801-4. Epub 2012/06/02.
49. Meda F, Folci M, Baccarelli A, Selmi C. The epigenetics of autoimmunity. *Cellular & molecular immunology*. 2011;8(3):226-36. Epub 2011/02/01.
50. Castel SE, Martienssen RA. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nature reviews Genetics*. 2013;14(2):100-12. Epub 2013/01/19.
51. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-54. Epub 1993/12/03.
52. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993;75(5):855-62. Epub 1993/12/03.
53. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic acids research*. 2014;42(Database issue):D68-73. Epub 2013/11/28.
54. Flynt AS, Lai EC. Biological principles of microRNA-mediated regulation: shared themes amid diversity. *Nature reviews Genetics*. 2008;9(11):831-42. Epub 2008/10/15.
55. Iborra M, Bernuzzi F, Invernizzi P, Danese S. MicroRNAs in autoimmunity and inflammatory bowel disease: crucial regulators in immune response. *Autoimmunity reviews*. 2012;11(5):305-14. Epub 2010/07/16.
56. Graves P, Zeng Y. Biogenesis of mammalian microRNAs: a global view. *Genomics, proteomics & bioinformatics*. 2012;10(5):239-45. Epub 2012/12/04.
57. Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA. *Trends in genetics : TIG*. 2006;22(3):165-73. Epub 2006/02/01.
58. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-97. Epub 2004/01/28.
59. Guay C, Regazzi R. Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. *Nature reviews Endocrinology*. 2013;9(9):513-21. Epub 2013/05/01.
60. Kumar M, Nath S, Prasad HK, Sharma GD, Li Y. MicroRNAs: a new ray of hope for diabetes mellitus. *Protein & cell*. 2012;3(10):726-38. Epub 2012/10/12.
61. Guay C, Roggli E, Nesca V, Jacovetti C, Regazzi R. Diabetes mellitus, a microRNA-related disease? *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2011;157(4):253-64. Epub 2011/03/23.
62. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*. 2004;432(7014):226-30. Epub 2004/11/13.
63. Poy MN, Hausser J, Trajkovski M, Braun M, Collins S, Rorsman P, et al. miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(14):5813-8. Epub 2009/03/18.
64. Heneghan HM, Miller N, Kerin MJ. Role of microRNAs in obesity and the metabolic syndrome. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2010;11(5):354-61. Epub 2009/10/02.
65. Roggli E, Britan A, Gattesco S, Lin-Marq N, Abderrahmani A, Meda P, et al. Involvement of microRNAs in the cytotoxic effects exerted by proinflammatory cytokines on pancreatic beta-cells. *Diabetes*. 2010;59(4):978-86. Epub 2010/01/21.
66. Roggli E, Gattesco S, Caille D, Briet C, Boitard C, Meda P, et al. Changes in microRNA expression contribute to pancreatic beta-cell dysfunction in prediabetic NOD mice. *Diabetes*. 2012;61(7):1742-51. Epub 2012/04/28.
67. Plaisance V, Abderrahmani A, Perret-Menoud V, Jacquemin P, Lemaigre F, Regazzi R. MicroRNA-9 controls the expression of Granuphilin/Slp4 and the secretory response of insulin-producing cells. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(37):26932-42. Epub 2006/07/13.
68. Kloosterman WP, Lagendijk AK, Ketting RF, Moulton JD, Plasterk RH. Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development. *PLoS biology*. 2007;5(8):e203. Epub 2007/08/07.
69. Bonner-Weir S, Li WC, Ouziel-Yahalom L, Guo L, Weir GC, Sharma A. Beta-cell growth and regeneration: replication is only part of the story. *Diabetes*. 2010;59(10):2340-8. Epub 2010/09/30.
70. O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(2):111-22. Epub 2010/01/26.

71. Thai TH, Calado DP, Casola S, Ansel KM, Xiao C, Xue Y, et al. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science (New York, NY)*. 2007;316(5824):604-8. Epub 2007/04/28.
72. Salas-Perez F, Codner E, Valencia E, Pizarro C, Carrasco E, Perez-Bravo F. MicroRNAs miR-21a and miR-93 are down regulated in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with type 1 diabetes. *Immunobiology*. 2013;218(5):733-7. Epub 2012/09/25.
73. Song SJ, Poliseno L, Song MS, Ala U, Webster K, Ng C, et al. MicroRNA-antagonism regulates breast cancer stemness and metastasis via TET-family-dependent chromatin remodeling. *Cell*. 2013;154(2):311-24. Epub 2013/07/09.
74. Song SJ, Pandolfi PP. miR-22 in tumorigenesis. *Cell Cycle*. 2014;13(1):11-2.
75. Yamada H, Itoh M, Hiratsuka I, Hashimoto S. Circulating microRNAs in autoimmune thyroid diseases. *Clinical endocrinology*. 2014;81(2):276-81. Epub 2014/02/19.
76. Siegel SR, Mackenzie J, Chaplin G, Jablonski NG, Griffiths L. Circulating microRNAs involved in multiple sclerosis. *Molecular biology reports*. 2012;39(5):6219-25. Epub 2012/01/11.
77. Sun M, Estrov Z, Ji Y, Coombes KR, Harris DH, Kurzrock R. Curcumin (diferuloylmethane) alters the expression profiles of microRNAs in human pancreatic cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*. 2008;7(3):464-73. Epub 2008/03/19.
78. Qin T, Fu Q, Pan YF, Liu CJ, Wang YZ, Hu MX, et al. Expressions of miR-22 and miR-135a in acute pancreatitis. *Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao Yixue Yingdewen ban*. 2014;34(2):225-33. Epub 2014/04/09.
79. Dai Y, Huang YS, Tang M, Lv TY, Hu CX, Tan YH, et al. Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*. 2007;16(12):939-46. Epub 2007/11/29.
80. Zhou B, Wang S, Mayr C, Bartel DP, Lodish HF. miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(17):7080-5. Epub 2007/04/18.
81. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005;435(7043):834-8. Epub 2005/06/10.
82. Karolina DS, Tavintharan S, Armugam A, Sepsamaniam S, Pek SL, Wong MT, et al. Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(12):E2271-6. Epub 2012/10/04.
83. Kim MK, Jung HS, Yoon CS, Ko JH, Jun HJ, Kim TK, et al. The Effect of Glucose Fluctuation on Apoptosis and Function of INS-1 Pancreatic Beta Cells. *Korean Diabetes Journal*. 2010;34(1):47-54.
84. Hou ZQ, Li HL, Gao L, Pan L, Zhao JJ, Li GW. Involvement of chronic stresses in rat islet and INS-1 cell glucotoxicity induced by intermittent high glucose. *Molecular and cellular endocrinology*. 2008;291(1-2):71-8. Epub 2008/05/20.
85. Tang X, Muniappan L, Tang G, Ozcan S. Identification of glucose-regulated miRNAs from pancreatic {beta} cells reveals a role for miR-30d in insulin transcription. *RNA (New York, NY)*. 2009;15(2):287-93. Epub 2008/12/20.
86. Du C, Liu C, Kang J, Zhao G, Ye Z, Huang S, et al. MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nature immunology*. 2009;10(12):1252-9. Epub 2009/10/20.
87. Sebastiani G, Grieco FA, Spagnuolo I, Galleri L, Cataldo D, Dotta F. Increased expression of microRNA miR-326 in type 1 diabetic patients with ongoing islet autoimmunity. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2011;27(8):862-6. Epub 2011/11/10.
88. Villeneuve LM, Natarajan R. The role of epigenetics in the pathology of diabetic complications. *American journal of physiology Renal physiology*. 2010;299(1):F14-25. Epub 2010/05/14.
89. Rawal S, Manning P, Katare R. Cardiovascular microRNAs: as modulators and diagnostic biomarkers of diabetic heart disease. *Cardiovascular diabetology*. 2014;13:44. Epub 2014/02/18.
90. Huang ZP, Chen J, Seok HY, Zhang Z, Kataoka M, Hu X, et al. MicroRNA-22 regulates cardiac hypertrophy and remodeling in response to stress. *Circulation research*. 2013;112(9):1234-43. Epub 2013/03/26.
91. Moura J, Borsheim E, Carvalho E. The Role of MicroRNAs in Diabetic Complications-Special Emphasis on Wound Healing. *Genes*. 2014;5(4):926-56. Epub 2014/10/01.
92. Zeng J, Xiong Y, Li G, Liu M, He T, Tang Y, et al. MiR-21 is overexpressed in response to high glucose and protects endothelial cells from apoptosis. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official*

journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association. 2013;121(7):425-30. Epub 2013/06/19.

93. Pandey DP, Picard D. miR-22 inhibits estrogen signaling by directly targeting the estrogen receptor alpha mRNA. *Molecular and cellular biology*. 2009;29(13):3783-90. Epub 2009/05/06.

94. Lelu K, Laffont S, Delpy L, Paulet PE, Perinat T, Tschanz SA, et al. Estrogen receptor alpha signaling in T lymphocytes is required for estradiol-mediated inhibition of Th1 and Th17 cell differentiation and protection against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2011;187(5):2386-93. Epub 2011/08/04.

95. Rabinovitch A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes/metabolism reviews*. 1998;14(2):129-51. Epub 1998/07/29.

96. Grewal IS, Rutledge BJ, Fiorillo JA, Gu L, Gladue RP, Flavell RA, et al. Transgenic monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in pancreatic islets produces monocyte-rich insulinitis without diabetes: abrogation by a second transgene expressing systemic MCP-1. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1997;159(1):401-8. Epub 1997/07/01.

97. Selmi C. Autoimmunity in 2011. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2012;43(1-2):194-206. Epub 2012/06/27.

98. Figueroa-Vega N, Alfonso-Perez M, Benedicto I, Sanchez-Madrid F, Gonzalez-Amaro R, Marazuela M. Increased circulating pro-inflammatory cytokines and Th17 lymphocytes in Hashimoto's thyroiditis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95(2):953-62. Epub 2009/12/18.

99. Whitacre CC, Reingold SC, O'Looney PA. A gender gap in autoimmunity. *Science (New York, NY)*. 1999;283(5406):1277-8. Epub 1999/03/20.

100. Liu HB, Loo KK, Palaszynski K, Ashouri J, Lubahn DB, Voskuhl RR. Estrogen receptor alpha mediates estrogen's immune protection in autoimmune disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2003;171(12):6936-40. Epub 2003/12/10.

101. Polanczyk M, Zamora A, Subramanian S, Matejuk A, Hess DL, Blankenhorn EP, et al. The protective effect of 17beta-estradiol on experimental autoimmune encephalomyelitis is mediated through estrogen receptor-alpha. *The American journal of pathology*. 2003;163(4):1599-605. Epub 2003/09/26.

102. Bebo BF, Jr., Fyfe-Johnson A, Adlard K, Beam AG, Vandembark AA, Offner H. Low-dose estrogen therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in two different inbred mouse strains. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2001;166(3):2080-9. Epub 2001/02/13.

103. Polanczyk MJ, Carson BD, Subramanian S, Afentoulis M, Vandembark AA, Ziegler SF, et al. Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2004;173(4):2227-30. Epub 2004/08/06.

104. Liu HY, Buenafe AC, Matejuk A, Ito A, Zamora A, Dwyer J, et al. Estrogen inhibition of EAE involves effects on dendritic cell function. *Journal of neuroscience research*. 2002;70(2):238-48. Epub 2002/09/25.

105. Marson A, Kretschmer K, Frampton GM, Jacobsen ES, Polansky JK, MacIsaac KD, et al. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature*. 2007;445(7130):931-5. Epub 2007/01/24.

106. Zheng Y, Josefowicz SZ, Kas A, Chu TT, Gavin MA, Rudensky AY. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature*. 2007;445(7130):936-40. Epub 2007/01/24.

107. Xiao C, Calado DP, Galler G, Thai TH, Patterson HC, Wang J, et al. MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell*. 2007;131(1):146-59. Epub 2007/10/10.

108. Ghisi M, Corradin A, Basso K, Frasson C, Serafin V, Mukherjee S, et al. Modulation of microRNA expression in human T-cell development: targeting of NOTCH3 by miR-150. *Blood*. 2011;117(26):7053-62. Epub 2011/05/10.

109. Saki N, Abroun S, Soleimani M, Hajizamani S, Shahjahani M, Kast RE, et al. Involvement of MicroRNA in T-Cell Differentiation and Malignancy. *International journal of hematology-oncology and stem cell research*. 2015;9(1):33-49. Epub 2015/03/25.

110. Ohneda K, Ee H, German M. Regulation of insulin gene transcription. *Seminars in cell & developmental biology*. 2000;11(4):227-33. Epub 2000/09/01.

111. Poitout V, Hagman D, Stein R, Artner I, Robertson RP, Harmon JS. Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids. *The Journal of nutrition*. 2006;136(4):873-6. Epub 2006/03/22.

112. Duan Y, Zhou B, Su H, Liu Y, Du C. miR-150 regulates high glucose-induced cardiomyocyte hypertrophy by targeting the transcriptional co-activator p300. *Experimental cell research*. 2013;319(3):173-84. Epub 2012/12/06.

113. Nagareddy PR, Soliman H, Lin G, Rajput PS, Kumar U, McNeill JH, et al. Selective inhibition of protein kinase C beta(2) attenuates inducible nitric oxide synthase-mediated cardiovascular abnormalities in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*. 2009;58(10):2355-64. Epub 2009/07/10.
114. Xia Z, Kuo KH, Nagareddy PR, Wang F, Guo Z, Guo T, et al. N-acetylcysteine attenuates PKCbeta2 overexpression and myocardial hypertrophy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovascular research*. 2007;73(4):770-82. Epub 2007/01/26.
115. Chiang CW, Huang Y, Leong KW, Chen LC, Chen HC, Chen SJ, et al. PKCalpha mediated induction of miR-101 in human hepatoma HepG2 cells. *Journal of biomedical science*. 2010;17:35. Epub 2010/05/07.
116. Sonkoly E, Wei T, Pavez Lorie E, Suzuki H, Kato M, Torma H, et al. Protein Kinase C-Dependent Upregulation of miR-203 Induces the Differentiation of Human Keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2009;130(1):124-34.
117. Wang X, Chuang HC, Li JP, Tan TH. Regulation of PKC-θ function by phosphorylation in T cell receptor signaling. *Frontiers in Immunology*. 2012;3.
118. Shanmugam N, Gaw Gonzalo IT, Natarajan R. Molecular mechanisms of high glucose-induced cyclooxygenase-2 expression in monocytes. *Diabetes*. 2004;53(3):795-802. Epub 2004/02/28.
119. Devaraj S, Glaser N, Griffen S, Wang-Polagruto J, Miguelino E, Jialal I. Increased monocytic activity and biomarkers of inflammation in patients with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2006;55(3):774-9. Epub 2006/03/01.
120. Pihoker C, Gilliam LK, Hampe CS, Lernmark A. Autoantibodies in diabetes. *Diabetes*. 2005;54 Suppl 2:S52-61. Epub 2005/11/25.
121. Abuhatzira L, Xu H, Tahhan G, Boulougoura A, Schaffer AA, Notkins AL. Multiple microRNAs within the 14q32 cluster target the mRNAs of major type 1 diabetes autoantigens IA-2, IA-2beta, and GAD65. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2015. Epub 2015/07/08.
122. Nett ST, Noble JA, Levin DL, Cvijanovich NZ, Vavilala MS, Jarvis JD, et al. Biomarkers and genetics of brain injury risk in diabetic ketoacidosis: A pilot study. *Journal of pediatric intensive care*. 2014;3(2).