

UCH-FC
MAG-B
P 695
C.1



**“EXPRESIÓN DE MIRNAS EN PACIENTES CON
DIABETES MELLITUS TIPO 1: POSIBLE ASOCIACIÓN
CON AUTOINMUNIDAD E INFLAMACIÓN”**

Tesis

Entregada A La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por

CAROLINA ANDREA PIZARRO ACEVEDO

Agosto, 2015

Director de Tesis: Dr. Francisco Pérez-Bravo

Co-Director de Tesis: Dr. Diego García Díaz

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por la candidata

CAROLINA ANDREA PIZARRO ACEVEDO

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 22 de Abril del 2015

Director de Tesis:

Dr. Francisco Pérez Bravo

Co-Director de Tesis:

Dr. Diego García Díaz

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. María Rosa Bono

Dr. Álvaro Glavic



RESUMEN BIOGRÁFICO



Nací en la histórica ciudad de Rancagua, en una pequeña familia compuesta por Marina y Fernando, dos padres que siempre dieron lo mejor para su hija. Estudié en el Liceo Oscar Castro, en donde se formó mi personalidad, un poco desordenada pero siempre responsable. En el año 2006 ingresé a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular, en donde pude satisfacer mis ansias de conocimiento y se abrió mi mente a la ciencia. Casi al terminar mi carrera tomé la decisión de ingresar al programa de Magíster en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias. Finalmente, realicé esta tesis en el Laboratorio de Genómica Nutricional en la Facultad de Medicina de esta universidad.

Labor Omnia Vincit Improbus

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis tutores, Dr. Francisco Pérez y Dr. Diego García, por la confianza y la paciencia depositada en mí para la realización de esta tesis que por fin puede ver la luz. Sin duda, agradezco enormemente su contribución en este trabajo y en mi formación.

También quisiera agradecer a todo el Departamento de Nutrición, a las personas que conocí y que compartí gratamente, en especial a Francisco, Karla y la Sra. Eli.

Agradecer a mis compañeros con los que compartí horas de experimentos y congresos, como también momentos llenos de estrés y alegría: Cristian, Georthan, Mayito y Ange. Muchas gracias por todo, por la buena onda, por el apoyo en los momentos personales difíciles que pase y por sobre todo, su amistad. Junto a Frank, se convirtieron en parte importante de mi vida, los quiero!

Quiero agradecer a mi segunda familia, a mis amigos Andrea y Jorge, de verdad no saben cuánto valoro el tiempo en que me recibieron en su casa y su cariño. Gracias por los buenos consejos y su contención cuando lo necesitaba.

Finalmente, a mis padres y amigos por el apoyo incondicional. Ustedes son el motor de mi vida.

Esta tesis fue financiada gracias a Becas CONICYT de Magíster Nacional N° 221320370 y Proyecto FONDECYT N° 1130240.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN BIOGRÁFICO.....	ii
AGRADECIENTOS.....	iii
INDICE DE CONTENIDOS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1. 1. Diabetes Mellitus Tipo 1.....	1
1. 1. 1. Factores Genéticos.....	2
1. 1. 2. Factores Ambientales.....	4
1. 1. 3. Autoinmunidad.....	5
1. 2. MicroRNAs.....	8
1. 2. 1. Biogénesis de los miRNAs.....	10
1. 2. 2. Regulación post-transcripcional mediado por miRNAs.....	13
1. 2. 3. MiRNAs y Enfermedades.....	15
1. 3. DM1 y miRNAs.....	15
1. 4. Hipótesis.....	17

1. 5. Objetivos.....	18
1. 5. 1. Objetivo General.....	18
1. 5. 2. Objetivos Específicos.....	18
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
2. 1. Participantes del estudio.....	19
2. 2. Toma de muestras.....	20
2. 3. Extracción de Células Mononucleares Periféricas.....	21
2. 4. Cultivo de Células Mononucleares Periféricas.....	21
2. 5. Extracción de RNA total y síntesis de cDNA de miRNAs.....	22
2. 6. PCR en tiempo real para miRNAs.....	23
2. 7. Ensayos Serológicos.....	24
2. 8. Análisis estadísticos.....	25
3. RESULTADOS.....	27
3. 1. Evaluación de la expresión de miRNAs.....	27
3. 1. 1. Expresión de miR-326.....	27
3. 1. 2. Expresión de miR-155.....	30
3. 2. Determinación de Autoanticuerpos: Anti-GAD65, Anti-IA2 y Anti-ZnT8.....	32
3. 3. Determinación de biomarcadores de inflamación en pacientes con DM1 y controles.....	33
3. 4. Relación entre perfil serológico y expresión de miRNAs.....	34
3. 5. Relación entre expresión de miRNAs y características de debut en pacientes con DM1.....	40

4. DISCUSIÓN.....	42
4. 1. miR-326.....	43
4. 2. miR-155.....	47
4. 3. Anti-GAD65, Anti-IA2 y Anti-ZnT8.....	51
4. 4. Bio-marcadores de inflamación IL-6 y PCRus.....	52
4. 5. miRNAs y perfil serológico.....	53
5. CONCLUSIONES.....	55
6. BIBLIOGRAFÍA.....	56

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Características de pacientes con DM1 y sujetos Controles.....	19
Tabla 2.	Perfil de auto-anticuerpos en pacientes con DM1 y controles sanos.....	33
Tabla 3.	Determinación de biomarcadores de inflamación mediante ELISA.....	34

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Línea de tiempo del proceso autoinmune que se desarrolla en la DM1.....	7
Figura 2.	Vía canónica de la generación de miRNAs en células animales.....	11
Figura 3.	Mecanismos de regulación postranscripcional mediado por miRNAs.....	14
Figura 4.	Cuantificación de miRNAs mediante el sistema de transcripción reversa, stem-loop RT-PCR.....	24
Figura 5.	Expresión relativa de miR-326 versus estímulo de glucosa.....	28
Figura 6.	Expresión relativa de miR-326 versus estímulo de glucosa en grupo con DM1.....	29
Figura 7.	Expresión relativa de miR-155 versus estímulo de glucosa.....	31
Figura 8.	Expresión relativa de miR-155 versus estímulo de glucosa en grupo con DM1.....	32
Figura 9.	Expresión relativa del miR-326 versus positividad de autoanticuerpos.....	34
Figura 10.	Expresión relativa del miR-155 versus positividad de autoanticuerpos.....	35
Figura 11.	Expresión relativa de miR-326 versus perfil serológico.....	36
Figura 12.	Expresión relativa de miR-326 versus autoanticuerpos.....	37
Figura 13.	Expresión relativa de miR-155 versus perfil serológico.....	38
Figura 14.	Expresión relativa de miRNA-155 versus autoanticuerpos.....	39
Figura 15.	Expresión relativa de miRNAs versus glicemia de debut.....	40

Figura 16.	Expresión relativa de miRNAs versus edad de debut.....	41
Figura 17.	Expresión relativa de miRNAs versus Sexo.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

Ab	Anticuerpo
AR	Artritis Reumatoide
cDNA	DNA complementario
CMPs	Células mononucleares periféricas
CMV	Citomegalovirus
CPA	Célula presentadora de antígenos
Ct	“Cycle threshold”
CV	Coefficiente de variación
DGCR8	“Di George síndrome critical region gene 8”
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfato
dsRBDs	Dominio de unión a RNA de doble hebra
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EM	Esclerosis múltiple
GAD	Descarboxilasa del ácido glutámico
HbA1C	Hemoglobina glicosilada
HLA	Antígeno del leucocito humano
HSP	“Heat shock protein”
IA2	Tirosina fosfatasa pancreática
ICA	Anticuerpos anti-islotos pancreáticos
IDDM1	Locus 1 de la diabetes mellitus insulino dependiente

IL	Interleuquina
IFN- α	Interferón alfa
kDa	Kilodalton
LT α	Linfotoxina α
LT β	Linfotoxina β
LB	Linfocito B
LT	Linfocito T
LTc	Linfocito T citotóxico
LTh	Linfocito T cooperador
MHC-I	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I
miRISC	“miRNA-containing RNA induced silencing complex”
miRNA	microRNA
mRNA	RNA mensajero
NMO	Neuromielitis óptica
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCRus	Proteína C reactiva ultra sensible
PTGO	Prueba de tolerancia a la glucosa oral
qPCR	PCR cuantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
siRNA	RNA de interferencia
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
TNF	Factor de necrosis tumoral

TRAMP	“TNF receptor-related apoptosis-mediating protein”
TRBP	“TAR RNA-binding protein”
TU	Unidad transcripcional
UNG	Uracilo-N glicosilasa
UTR	Región no traducida
VCAM	Molécula de adhesión celular vascular
VNTR	“Variable Number Tandem Repeat”
ZnT8	Transportador de zinc 8

RESUMEN

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) es una enfermedad de predisposición hereditaria que afecta principalmente a niños y adolescentes. Esta enfermedad se caracteriza por la destrucción progresiva de las células β del páncreas, lo que genera una disminución paulatina de la producción de insulina. La DM1 posee una etiología muy compleja, donde los mecanismos que subyacen en esta patología no han sido descritos completamente. Esto se debe, principalmente a que las interacciones de susceptibilidad genética más el ambiente son determinantes para desencadenar la enfermedad en ventanas altamente variables de tiempo.

Un mecanismo relativamente nuevo de regulación génica corresponde a los microRNAs, pequeños RNAs no codificantes que pueden unirse en el extremo 3' UTR y regular negativamente la expresión de un determinado gen. En este trabajo se determinó el perfil de expresión de los miR-326 y miR-155 en células mononucleares periféricas (CMPs) de pacientes con DM1 y sujetos controles sometidas a distintas concentraciones de glucosa, mediante la utilización de sondas altamente específicas para estas moléculas, y se correlacionó el tipo de respuesta con el perfil serológico de autoinmunidad y biomarcadores de inflamación. El perfil de expresión de los miRNAs en células mononucleares periféricas de pacientes con DM1, tratadas con distintas concentraciones de glucosa (11 mM, 25 mM y 47 mM), mostró bajos niveles de expresión para el miR-326 al compararlos con sujetos controles en las mismas condiciones de glucosa. Un

segundo análisis mostró que esta disminución es modulada por glucosa, debido a que los niveles de expresión de este miRNA fueron significativamente menor en los tres estímulos al compararlos con el cultivo sin glucosa. Esto sugiere que este miRNA es afectado por la presencia de glucosa en el medio, sin embargo este efecto es independiente de la concentración. Por otro lado, el miR-155 presentó un aumento de los niveles de expresión génica en células mononucleares de pacientes con DM1, siendo este incremento independiente de los estímulos de glucosa aplicados. Esto coincide con lo reportado previamente en la literatura, en donde este aumento se encuentra presente en otras patologías autoinmunes, como lupus y artritis reumatoidea.

Se midieron los niveles de los autoanticuerpos GAD65, IA2 y ZnT8 en las muestras colectadas para este estudio, corroborándose un alto porcentaje de muestras positivas entre los pacientes con DM1. El análisis del perfil inflamatorio demostró que los pacientes con DM1 presentan un patrón inflamatorio alterado y que es reflejado en altos niveles de IL-6 y Proteína C reactiva. Sin embargo, el análisis de correlación no mostró evidencia de asociación entre los miRNAs analizados y las variables autoinmunidad e inflamación.

Este patrón diferencial de expresión observado en miR-326 y miR-155 abre una ventana muy importante respecto de los mecanismos de regulación génica en las CMPs de pacientes con DM1, fenómeno que debiera ser abordado con el análisis de los posibles genes blanco. Además nos permite contemplar la posible utilidad de estos miRNAs como marcadores para detectar esta patología en estadios previos al debut.

ABSTRACT

Type 1 diabetes (T1D) is a disease with hereditary predisposition that mainly affects children and adolescents. This disease is characterized by the progressive destruction of pancreatic β cells, leading to a gradual decrease in insulin production. The T1D is a disease with a highly complex etiology, even the mechanisms involved in its development remains not fully understood. This is based on the fact that there is an interaction between a genetic susceptibility and environment components.

A relatively newly described gene regulation mechanism corresponds to microRNAs, small non-coding RNAs that bind at the 3' UTR of transcripts. MiRNAs negatively regulate gene expression at post-transcriptional level by mediating translational repression or degradation of the mRNA targets. In the present work, we analyzed the expression profile of miR-326 and miR-155 of peripheral mononuclear cells (PBMCs) from T1D patients and control subjects, using highly-specific probes for miRNA amplification. The PBMCs were grown to different concentrations of glucose. The expression profile of miRNAs and the serological profile of autoimmunity and inflammatory biomarkers were correlated. PBMCs showed that miR-326 was significantly decreased in T1D samples compared than controls. A second analysis showed that this decrease is modulated by this molecule, because the expression levels of the miR-326 were significantly lower in glucose presence in comparison to PBMCs without glucose. In other hand, miR-155 was overexpressed in PBMCs from T1D

patients, however, when these cells were incubated with glucose no changes were observed. This is consistent with previously results, where this increase was observed in other autoimmune diseases.

Levels of anti-GAD65, anti-IA2 and anti-ZnT8 autoantibodies in the samples collected for this study were measured, corroborating a high percentage of positive samples from T1D patients. The inflammatory profile demonstrated that T1D patients present an altered inflammatory pattern which is reflected in high levels of IL-6 and C-reactive protein. However, the correlation analysis showed no evidence of any association between miRNAs expression and autoimmunity or inflammatory profile.

This differential expression observed in miR-326 and miR-155 could leads to a new approach regarding the mechanisms of gene regulation in PBMCs of T1D patients, a phenomenon that should be addressed with the analysis of potential target genes. It also allows us to postulate these variables as potential markers of early T1D onset detection.

INTRODUCCIÓN

1. 1. Diabetes Mellitus Tipo 1

La Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por la destrucción de las células β -pancreáticas productoras de insulina de los islotes de Langerhans (Tisch y McDevitt, 1996), la cual genera hiperglicemia debido a la baja producción de esta hormona (Ounissi-Benkhalha y Polychronakos, 2008). Es el trastorno endocrino-metabólico más frecuente durante la infancia y la adolescencia, con un perfil clínico que varía notablemente entre pacientes, y que al no ser tratada pronta y adecuadamente provoca serios daños al organismo, tales como: cetoacidosis, fallas renales, enfermedades cardíacas, ceguera y accidentes cerebrovasculares (van Belle y cols., 2011).

Esta enfermedad posee una etiología multifactorial donde la predisposición genética y los factores ambientales juegan un papel importante en su desarrollo (Hawa y cols., 2002). También se ha sugerido que podría existir una susceptibilidad étnico-específica en los genes relacionados con el desarrollo de DM1 (Matsuura N y cols., 1998). De esta forma, se ha observado una mayor incidencia de la enfermedad en población caucásica y una incidencia menor en el resto de las otras etnias como la asiática, americana y en países con población de origen negroide (Karvonen y cols., 1993).

1. 1. 1. Factores Genéticos

Entre los factores genéticos que intervienen en esta enfermedad, se ha descrito una región génica que centra todo el interés científico desde los últimos 30 años, ya que se ha relacionado fuertemente con la susceptibilidad para desarrollar DM1 y con la tolerancia autogénica. Esta región corresponde a la región génica del Antígeno del Leucocito Humano (HLA) (Atkinson y Maclaren, 1994), conocida como IDDM1 (locus 1 de la Diabetes Mellitus Insulino Dependiente, por sus siglas en inglés). El IDDM1 también se ha relacionado con el desarrollo de otras enfermedades autoinmunes. Se ha descrito que se ubica en el cromosoma 6p21, y que codifica proteínas de moléculas de superficie de tres clases distintas (I, II y III), las que pueden encontrarse en la mayoría de las células nucleadas y participar en la presentación antigénica (Nerup J y cols., 1974; Singal y Blajchman, 1973). Las moléculas de clase I participan en la presentación de antígenos a linfocitos T citotóxicos (LTc). Las de clase II están presentes en linfocitos B (LB), macrófagos, LT activadas y células dendríticas; y presentan antígenos a linfocitos T cooperadores (LTh, por sus siglas en inglés). Por último, las moléculas de clase III que integran a las moléculas del sistema del complemento, citoquinas relacionadas con inflamación como el factor de necrosis tumoral (TNF- α), linfotóxina α (LT α) y linfotóxina β (LT β), y proteínas de choque térmico (HSP, *heat shock protein*) (Trucco y Dorman, 1989).

Se ha descrito, que los genes HLA de clase II son los que se encuentran más relacionados con la presencia de DM1 (Farid y cols., 1979; Owerbach D y cols., 1983; Thorsby y Ronningen, 1993; Todd JA y cols., 1987; Undlien DE y cols., 1997), siendo

DR4-DQ8 y DR3-DQ2 los haplotipos de riesgo más importantes. Se ha observado que están presentes en un 90% de los niños caucásicos con esta patología. Por otro lado, se ha encontrado un haplotipo asociado a protección contra el desarrollo en DM1, el DR15-DQ6, el que se encuentra en menos de un 1% de la población diabética y en un 20% en población sana (Gillespie KM y cols., 2004).

Otro locus de susceptibilidad es el IDDM2, que se ubica en el cromosoma 11p15, en donde se encuentra un polimorfismo de secuencias repetidas en tándem de número variable (*Variable Number Tandem Repeat*, VNTR), localizado río arriba del gen de la insulina (*INS*) (Bell GI y cols., 1984). De acuerdo al número de repeticiones de una unidad consenso, correspondiente a 15 pares de bases ricos en guanina, se pueden distinguir tres clases de este polimorfismo: Clase I, con 30 a 60 repeticiones que da cuenta aproximadamente del 10% de susceptibilidad génica; Clase II, con 61 a 120 unidades, muy raro en la población; y Clase III, con 120 a 170 unidades, el cual es poco frecuente y estaría asociado a un efecto protector contra DM1, de 3 a 5 veces mayor respecto a un sujeto portador del haplotipo de Clase I (Bennett S y cols., 1995; Bennett y cols., 1996).

Por último, existe un tercer locus conocido como IDDM12, ubicado en el cromosoma 2q33, en donde se encuentra el gen del Antígeno 4 asociado al Linfocito T Citotóxico (*CTLA-4*), el cual se conoce desde hace años debido a su papel modulador en la activación de los linfocitos T (LT) (Nistico L y cols., 1996).

Actualmente, la investigación de genes candidatos está dirigida hacia el estudio de nuevas regiones de susceptibilidad a desarrollar DM1. Como resultado de esto, los genes *il2ra* (receptor alfa de interleuquina 2), *ptpn22* (proteína linfoide tirosina fosfatasa) y *pdccl1* (proteína de muerte celular programada) se han asociado a un mayor riesgo para el desarrollo de DM1 (Flores y cols., 2010; Lowe CE y cols., 2007). Se ha descrito que variaciones alélicas y polimorfismos en estos genes afectan el normal funcionamiento de las proteínas codificadas, lo que se traduce en alteraciones de los mecanismos de los LT, ya sea LT reguladores (LTreg) (variaciones del gen *il2ra*) o LT efectores (variaciones del gen *ptpn22*). Por su parte, se ha descrito que el gen *pdccl1* es muy relevante en el reconocimiento de estructuras que regulan negativamente la unión entre células presentadoras de antígenos (CPA) y el LT (Keir y cols., 2008).

1. 1. 2. Factores Ambientales

Los factores genéticos pueden interactuar y ser modulados por el ambiente, por lo que la presencia de alteraciones en las distintas regiones génicas descritas anteriormente no son gatillantes por sí solas para el desarrollo de DM1. Dentro de los factores ambientales que facilitarían la presencia de la enfermedad se pueden encontrar: infecciones virales (Bach, 2005), toxinas y dieta (Myers y cols., 2003), y la excesiva higiene (Cooke, 2009). Estos factores conducirían a la ruptura de la tolerancia autógena normal. Algunos resultados indican que infecciones producidas por virus tales como citomegalovirus (CMV) y coxsackie B4 (King y cols., 1983; Wagenknecht y

cols., 1991; Yoon y cols., 1979) pueden producir un anticuerpo que reaccionaría con componentes específicos de la superficie de las células β en el páncreas, lo cual estaría avalando la hipótesis de la supuesta intervención de un mecanismo de mimetismo molecular, que sería responsable de la reacción autoinmune típica de la enfermedad (Santos y cols., 2000). Además, estudios realizados en Estados Unidos, Europa y Australia han demostrado que la proporción de jóvenes con DM1 que portan el alelo de riesgo DR3/4 no ha cambiado en el tiempo y si lo ha hecho la incidencia de la enfermedad, la cual está en aumento (García M y P., 2003). Por lo tanto, el factor genético se mantiene estable mientras los estilos de vida y los factores ambientales si han cambiado, como el clima y el crecimiento de la obesidad infantil, lo que nos indica que este factor externo si tiene importancia sobre el inicio y desarrollo de la DM1 y posiblemente, está interactuando positivamente en su aumento a nivel mundial (Fourlanos y cols., 2008; Gillespie KM y cols., 2004; Vehik y cols., 2008).

1. 1. 3. Autoinmunidad

Como se ha mencionado anteriormente, la base genética sumado a uno o más factores ambientales pueden gatillar el inicio de esta enfermedad. La Figura 1 muestra cómo se desarrolla el proceso de reacción autoinmune según lo propuesto por van Belle y cols. (2011). Durante las primeras etapas en el páncreas se produce un ambiente proinflamatorio, donde las células β inician la expresión de interferón α (IFN- α) y, subsecuentemente, se induce la producción de moléculas del Complejo Principal de

Histocompatibilidad de clase I (MHC-1, por sus siglas en inglés). A partir de este proceso, los LT CD8⁺ auto-reactivos destruirían a las células β a través del proceso de citotoxicidad mediada por MHC-1 y en donde la producción de citoquinas por parte de LT CD4⁺ y LT CD8⁺ induce la expresión de la molécula de muerte FAS en la célula β , que la lleva finalmente a apoptosis (Lehuen y cols., 2010). Producto de lo anterior, los antígenos liberados desde las células β son transportados por las CPA hacia el linfonodo pancreático donde son presentados a LTh y LT CD8⁺, generando la activación de estas células. Mientras tanto, en el ambiente pancreático se reclutan otras células del sistema inmune, tales como macrófagos, que producen un aumento en la producción de las citoquinas IL-1 β y TNF e incrementando el ambiente inflamatorio. En este contexto, la presentación antigénica activa a linfocitos T CD4⁺ cooperadores que luego estimulan a linfocitos B y promueve su conversión a células plasmáticas. A partir de este proceso comienzan a aparecer los primeros autoanticuerpos, tales como: anticuerpos anti-islotos (ICA, 70-80% de los pacientes), anti-descarboxilasa del ácido glutámico (GAD, 70-80% de los pacientes) y anti-tirosina fosfatasa pancreática (IA2, 60-80% de los pacientes) (Kukreja A y NK., 1999; Ounissi-Benkalha y Polychronakos, 2008). Por su parte, los LT CD8⁺ auto-reactivos son estimulados, lo que genera que proliferen y vuelvan a migrar hacia el páncreas produciendo un nuevo ataque autoinmune con la destrucción de células β . En este punto, se produce en paralelo la disminución en la producción de insulina por parte de las células β (pseudoatrofia) (van Belle y cols., 2011).

Estos ataques sucesivos contra las células β van disminuyendo la masa pancreática, no obstante, es un proceso que puede tomar mucho tiempo antes de que

aparezcan los primeros síntomas de la diabetes. Se estima que estos 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 (Chatenoud L y JA., 2007).

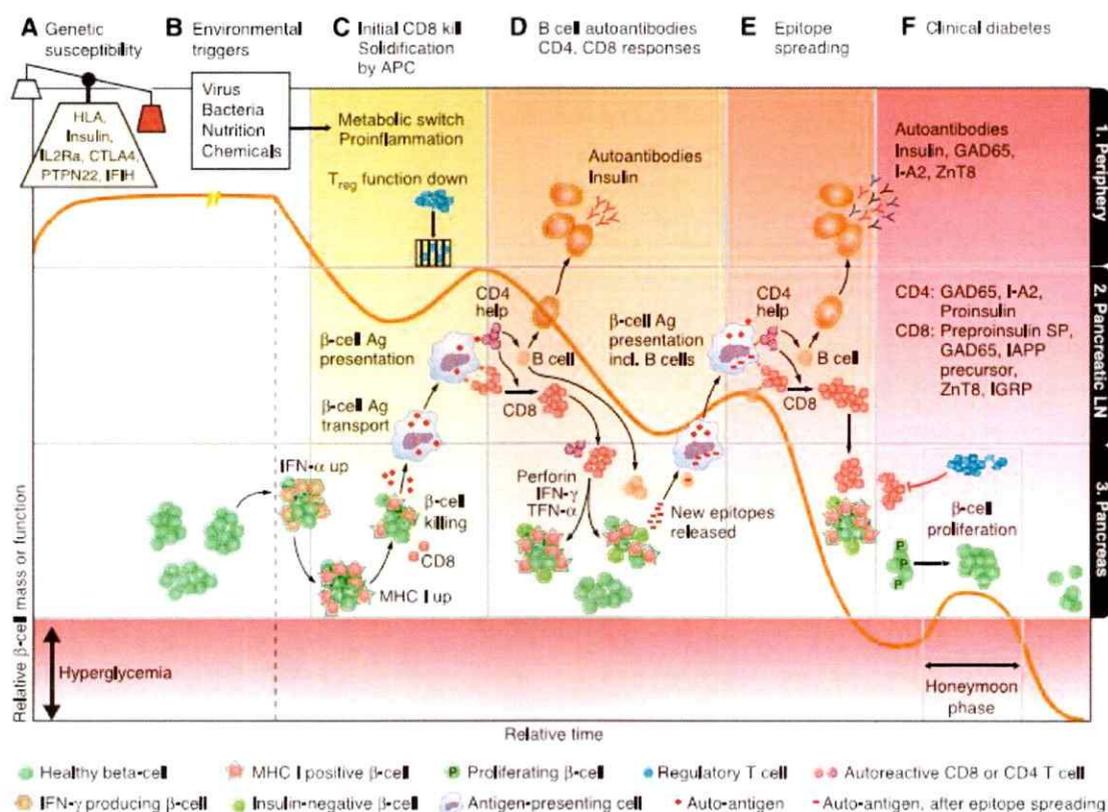


Figura 1. Línea de tiempo del proceso autoinmune que se desarrolla en la DM1. En este diagrama se describen los principales linajes celulares involucrados, que incluye linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺, linfocitos T reguladores, linfocitos B y células presentadoras de antígenos. La línea naranja 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 cierto lapso 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 y col, 2011).

1.2. MicroRNAs

Los microRNAs (miRNAs) son un abundante grupo de pequeños RNA endógenos no codificantes de 20 a 25 nucleótidos (Zhang y cols., 2007). Se encuentran en animales, plantas y virus, y tienen una importante función en el silenciamiento de genes. Dentro de los mecanismos de regulación génica post transcripcional se encuentra la represión traduccional y degradación del mRNA (Bartel, 2004; Kim y Nam, 2006). Muchos miRNAs están muy conservados en animales y plantas, lo que sugiere que desempeñan una función esencial en estos organismos. Esto se respalda con las numerosas investigaciones que indican que estas moléculas participan en múltiples procesos biológicos, tales como proliferación, apoptosis, desarrollo de órganos, tumorigénesis, diferenciación de células madre y la respuesta al estrés ambiental (Cai y cols., 2009; Graves y Zeng, 2012; Zhang y cols., 2007).

Los genes que se transcriben a miRNAs se encuentran en todos los cromosomas humanos, excepto en el cromosoma Y. Se pueden encontrar distantes y en la misma orientación de los genes blanco (Bartel, 2004), incluso dentro de la misma secuencia del gen (Graves y Zeng, 2012). Muchos miRNAs se encuentran en grupos ("clusters") y se transcriben como transcritos primarios policistrónicos, los cuales se encuentran relacionados funcionalmente. Sin embargo, dentro de estos clusters también podemos encontrar miRNAs que no están relacionados. Se postula que todos los miRNAs que

están en un mismo cluster regulan un mismo gen o a diversos genes de una misma vía (Kim y Nam, 2006).

Los miRNAs pueden estar ubicados en intrones o exones, los cuales poseen diferentes mecanismos de biogénesis. Los últimos análisis acerca de la ubicación de estos miRNAs, revelaron que en mamíferos la mayoría (alrededor del 70%) se encuentran distribuidos en Unidades Transcripcionales (TU, por sus siglas en inglés) definidas (Rodríguez y cols., 2004). Es por esto que pueden ser categorizados de acuerdo a su ubicación: miRNA intrónico en TU codificantes, miRNA intrónico en TU no codificantes y miRNA de exones (Kim y Nam, 2006). Algunos miRNAs presentes en intrones comparten elementos regulatorios con el pre-mRNA del gen en el que se encuentran, además de formar parte del transcrito primario del mRNA huésped (Bartel, 2004; Cai y cols., 2009).

Muchos miRNAs son tejidos específicos y son expresados en períodos específicos del desarrollo (Bartel, 2004), de manera que su transcripción está regulada espacial y temporalmente. Esto sugiere que alteraciones en este proceso pueden generar cambios a nivel de desarrollo, organogénesis y otras funciones que son reguladas por sus genes blancos (Zhang y cols., 2007). También se postula que los miRNAs oscilan entre la represión y la activación, mientras otros activan a ciertos mRNAs blancos bajo condiciones de estrés como hipoxia y privación de nutrientes (Vasudevan y cols., 2007).

1.2.1. Biogénesis de los miRNAs

Actualmente los miRNAs se pueden clasificar en dos grandes clases de acuerdo a su procesamiento: canónicos y no canónicos (Graves y Zeng, 2012). En la vía canónica (Figura 2) los genes de miRNAs son transcritos por una RNA polimerasa de tipo II generando los transcritos primarios (pri-miRNAs). El inicio del procesamiento, denominado “corte” (“cropping”) es mediado por el complejo Drosha-DGCR8, conocido como “complejo microprocesador”. Drosha es una proteína de ~160 kDa que está conservada en animales pero no en plantas y DGCR8 (“Di George síndrome critical region gene 8”, también conocida como Pasha en *Drosophila* y *C. elegans*) es cofactor de Drosha y posee un dominio de unión a RNA de doble hebra (dsRBDs) que participa en el reconocimiento del sustrato (Kim y Nam, 2006). Ambas proteínas se encuentran principalmente localizadas en el núcleo y forman el complejo de aproximadamente 650 kDa. El producto de este procesamiento nuclear es un pre-miRNA de aproximadamente 70 nucleótidos, que posee un pequeño “tallo-bucle” (“stem-loop”). Esta estructura se sugiere que es un motivo clave para que sea reconocido por el factor de exportación nuclear Exportina-5 (Exp5) (Bartel, 2004; Kim y Nam, 2006). El pre-miRNA forma un complejo transportador junto a Exp5 y al cofactor Ran-GTP, el que luego de la exportación desde el núcleo es procesado por segunda vez por Dicer, una RNAsa de tipo III citoplasmática de ~200 kDa, produciendo un dúplex de miRNA 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 (Kim y Nam, 2006). Los miRNAs maduros son integrados al complejo

efector conocido como “miRNP”, “mirgonauta” o “miRISC” (miRNA-containing RNA induced silencing complex). Durante el ensamblaje del complejo miRISC el dúplex de ~22 nt es separado y una hebra es seleccionada como miRNA maduro, mientras que la otra hebra es degradada (Bartel, 2004; Kim y Nam, 2006; Zhang y cols., 2007).

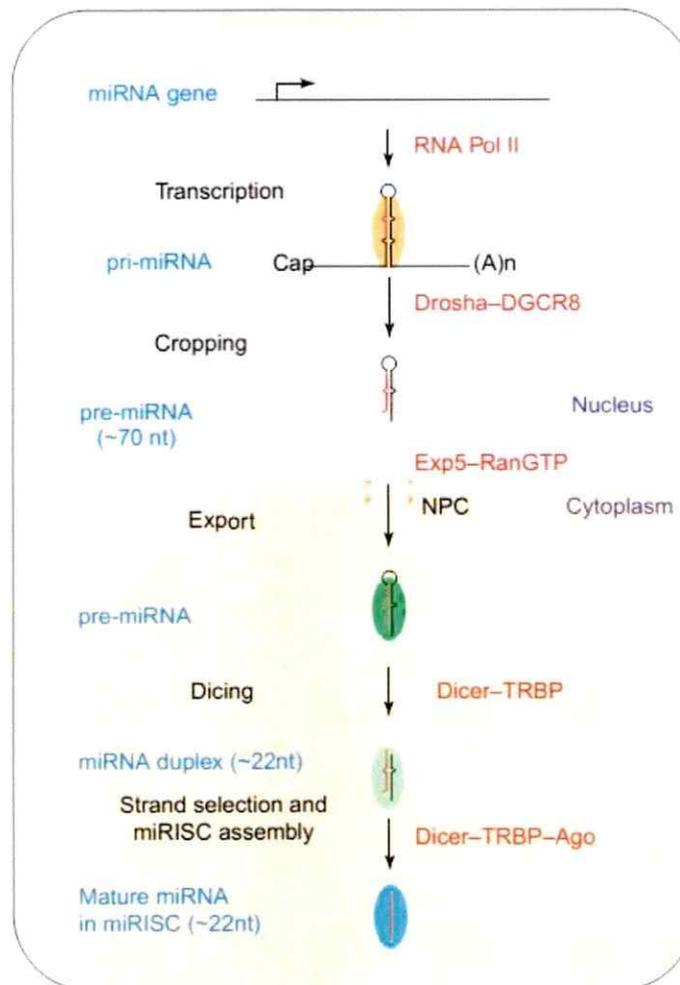


Figura 2. Vía canónica de la generación de miRNAs en células animales. El miRNA es transcrito por la RNA polimerasa II generando un pri-miRNA, luego éste es procesado en el núcleo a un pre-miRNA por el complejo formado por las proteínas Drosha y DGCR8. El pre-miRNA se exporta al citoplasma y se procesa a un miRNA dúplex por otro complejo de proteínas compuesto por Dicer y TRBP. Después de la escisión por el complejo Dicer, el miRNA dúplex resultante se une al complejo miRISC en donde una hebra es seleccionada y la otra es degradada. (Kim & Nam, 2006).

Por otro lado, 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 (Graves y Zeng, 2012).

Los pri-miRNAs, pre-miRNAs y miRNAs maduros pueden ser modificados por deaminasas que alterarían el procesamiento del miRNA y el reconocimiento del gen blanco (Graves y Zeng, 2012). Otras evidencias indican que existe una regulación post-transcripcional de los miRNAs durante la maduración, y que los niveles de miRNAs maduros no se correlacionan con los niveles de pre-miRNAs (Kim y Nam, 2006). También se ha indicado que mecanismos adicionales como presencia de SNPs (“Single Nucleotide Polymorphisms”), edición del RNA, metilación y ciclo circadiano, pueden controlar la expresión y función de los miRNAs (Cai y cols., 2009).

1.2.2. Regulación post-transcripcional mediado por miRNAs

Es conocido el hecho que un miRNA es capaz de controlar la expresión de más de un mRNA y que cada mRNA puede ser regulado por muchos miRNAs (Cai y cols., 2009). Los miRNAs pueden participar en la regulación de la expresión génica a través de dos mecanismos post-transcripcionales: la degradación del mRNA y la represión traduccional (Bartel, 2004; Zhang y cols., 2007) (Figura 3). La degradación del mRNA ocurre por un corte realizado en la misma posición que en el caso de un siRNA. Posterior a este procesamiento, el miRNA queda intacto y puede guiar al reconocimiento de ciertos mensajes que llevan a degradación del mRNA. Los miRNAs poseen una pequeña secuencia de alrededor de 7 nucleótidos entre las posiciones 2-7 del extremo 5' del miRNA maduro y que es complementario a la región UTR del extremo 3' del mRNA (Kim y Nam, 2006), siendo el mediador de la represión post-transcripcional (Bartel, 2004). Esta secuencia se encuentra altamente conservada entre especies e incluso un ligero cambio puede generar alteraciones en la especificidad con sus mRNA blancos (Cai y cols., 2009). Además, se han encontrado ciertos elementos presentes en el extremo 3' UTR ricos en AU que interactúan con los mRNAs como señales regulatorias. Análisis realizados en este extremo, indican que genes con 3' UTR más grandes poseen una alta densidad de sitios de unión a miRNA y se relaciona con genes involucrados en procesos celulares de desarrollo, mientras que genes con 3' UTR más pequeños tienen baja densidad de estos elementos y por lo tanto, se relacionan con genes involucrados en procesos celulares básicos (Cai y cols., 2009).



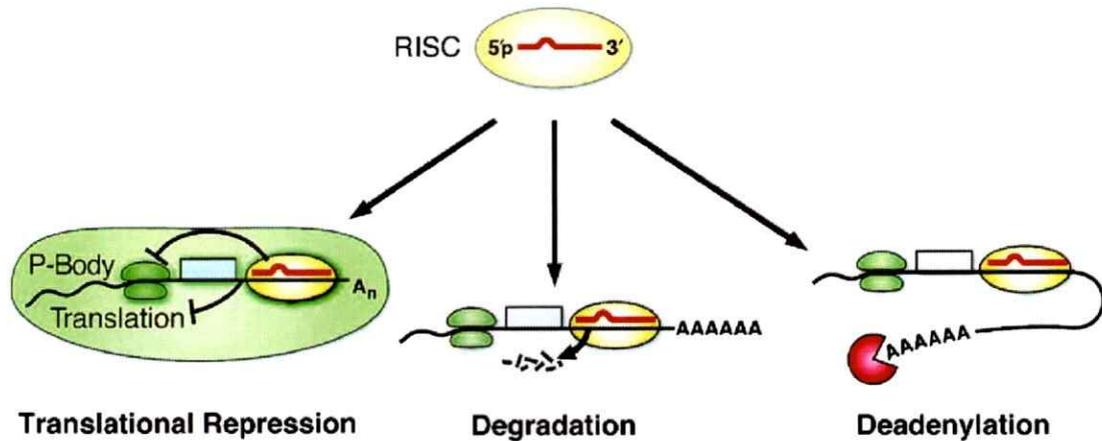


Figura 3. Mecanismos de regulación post-transcripcional mediado por miRNAs. Los miRNAs maduros guían al complejo RISC a las regiones no traducidas 3' (3'-UTR) del RNA mensajero complementario (mRNA) blanco y puede reprimir su expresión por varios mecanismos: represión de la traducción del mRNA, desestabilización de los transcritos de mRNA a través del corte y deadenilación. También puede ocurrir la localización en el cuerpo de procesamiento (P-body), donde el mRNA puede ser secuestrado desde la maquinaria de traducción y degradado o se almacena para su uso posterior. (Esquema modificado de Cordes y Srivastava (2009))

Recientes estudios sugieren que existe un tercer mecanismo mediado por miRNA y que se relaciona con la deadenilación del mRNA (Figura 3). Como se ha descrito, posterior a la transcripción del mRNA, se adiciona una cola de poli-A al extremo 3' confiriéndole estabilidad a la molécula. En este caso, el miRNA estaría acelerando el proceso de remoción de la cola de poli-A, desestabilizando e iniciando la degradación del transcrito (Zhang y cols., 2007).

1.2.3. MiRNAs y Enfermedades

Estudios de perfiles de expresión han demostrado una desregulación de la expresión de los genes de miRNAs en diversos tumores y también se ha visto que algunos miRNAs como el miR-15 o miR-16 podrían tener funciones como oncogenes o como supresores de oncogenes, regulando genes proapoptóticos como *BCL-2* que está altamente expresado en leucemia linfocítica crónica (Calin y cols., 2008). Por otra parte, se han identificado miRNAs que están implicados en la regulación del sistema inmune cuyas alteraciones están directamente relacionadas con desórdenes inmunológicos. Por ejemplo, miR-146a, miR-155 y miR-16 se han encontrado alterados en LT de pacientes con Artritis Reumatoide (AR) (Stanczyk y cols., 2008) y se ha encontrado que miR-326 se encuentra alterado en células mononucleares periféricas (CMPs) de pacientes con Esclerosis Múltiple (EM) (Du y cols., 2009).

1.3. DM1 y miRNAs

El primer indicio de que los miRNAs podrían estar involucrados en la regulación de la función de las células beta fue la identificación de dos miRNAs expresados específicamente en islotes pancreáticos humanos: miR-375 y miR-376 (Poy y cols., 2004). El miR-375 regula negativamente la secreción de insulina estimulada por glucosa, controlando principalmente la expresión de miotrofina (Mtpn) y también se encuentra relacionado con la regulación de la vía de señalización de PI3K. Desde entonces, se han descrito una serie de miRNAs que son capaces de regular la función

beta pancreática (miR-9, miR-410, miR-130a) (Hennessy y cols., 2010; Plaisance y cols., 2006), desarrollo del páncreas (Kloosterman y cols., 2007) y regeneración de la célula beta pancreática (Bonner-Weir y cols., 2010). Si bien hay poca información al respecto, estos estudios presentan buena evidencia de cómo los miRNAs pueden presentar un papel importante en la serie de eventos moleculares que ocurren en el páncreas.

Desde el punto de vista del sistema inmune, es sabido que su regulación es vital para prevenir muchos desórdenes patogénicos, incluyendo enfermedades autoinmunes. Es así, como los mamíferos han desarrollado sistemas complejos de mecanismos moleculares para la regulación inmune, con el fin de mantener los mecanismos de auto-tolerancia que permiten responder a patógenos exógenos (Cobb y cols., 2006). La única evidencia en Latinoamérica que relaciona sistema inmune con miRNAs es un estudio previo de nuestro grupo realizado por Salas-Perez y cols. (2013) que mostró una disminución en la expresión de miR-21 y miR-93 en células mononucleares periféricas de pacientes con DM1 en Chile, indicando que existe una regulación diferencial en las células del sistema inmune. Con estos antecedentes es plausible pensar que ciertos miRNAs sean capaces de modular una respuesta apoptótica diferencial en los LT de pacientes con DM1 a través de la regulación negativa de mRNAs de genes involucrados en estos procesos.

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, para la realización de este trabajo se seleccionaron dos miRNAs. El primero se relaciona con autoinmunidad y corresponde al miR-326, el cual se ha observado que se presenta en altos niveles en linfocitos de

pacientes con DM1 en Italia (Sebastiani y cols., 2011). El segundo microRNA es el miR-155, que se ha relacionado a procesos proinflamatorios (Kurowska-Stolarska y cols., 2011; O'Connell y cols., 2010) y también con la regulación de la expresión de citoquinas como IL-2. Estos miRNAs son candidatos a un análisis más fino, con el que se podría analizar la interacción entre el ambiente metabólicamente alterado de la DM1 y la modulación de genes involucrados en apoptosis e inflamación. A su vez, esta regulación indirecta, a través de factores transcripcionales, podría estar afectada por el estado de hiperglicemia presente en pacientes con DM1, por lo que es interesante evaluar su expresión bajo distintas concentraciones de glucosa.

Por tanto, este trabajo se centra en determinar los niveles de estos miRNAs y como están relacionados con los procesos de inflamación y autoinmunidad en DM1 bajo diferentes estímulos de glucosa, emulando los diferentes niveles de glucosa que pueden alcanzar los pacientes en el transcurso de la enfermedad.

1. 4. Hipótesis

Células mononucleares periféricas (CMPs) provenientes de pacientes con Diabetes Mellitus tipo 1 presentan un elevado patrón de expresión de miR-326 y miR-155 en comparación a las CMPs de individuos no diabéticos. Esta expresión es modulada por incrementos de glucosa y se correlaciona con una mayor frecuencia de autoinmunidad e inflamación.

1.5. Objetivos

1. 5. 1. Objetivo General

Determinar el perfil de expresión de los miR-326 y miR-155 en CMPs de pacientes con DM1 y sujetos controles sometidas a distintas concentraciones de glucosa y correlacionar el tipo de respuesta con el perfil serológico de autoinmunidad y biomarcadores de inflamación al momento del diagnóstico.

1. 5. 2. Objetivos Específicos

- I. Determinar la expresión diferencial de dos miRNAs: miR-326 y miR-155 en CMPs de pacientes con DM1 y controles, bajo distintas concentraciones de glucosa *in vitro*.
- II. Determinar el perfil de autoinmunidad cuantificando los anticuerpos Anti-GAD65, Anti-IA2 y Anti-ZnT8 en suero de pacientes con DM1 y controles.
- III. Determinar la presencia de biomarcadores de inflamación: PCRus e IL-6, en muestras séricas de pacientes con DM1 y sujetos controles.
- IV. Analizar la posible asociación entre la expresión de miRNAs y el perfil autoinmune y/o inflamatorio en pacientes con DM1.

MATERIALES Y MÉTODOS

2. 1. Participantes del estudio

En este estudio participaron 20 niños con DM1 de la Región Metropolitana provenientes del Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI) del Hospital San Borja Arriarán y cuyas características se describen en la Tabla 1. Utilizando el programa QUANTO, se ha estimado que un tamaño de muestra de 20 pacientes y 20 controles, entregará 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.

Tabla 1. Características de pacientes con DM1 y sujetos Controles. Valores expresados como promedio \pm SD.

Variabes	DM1 (n=20)	Controles (n=20)
Edad (años)	8,95 \pm 3,7 (4-17)	29,4 \pm 6,12 (20-45)
Sexo (Masculino/Femenino)	11/9	13/7
Glicemia Debut (mg/dL)	563,8 \pm 141,4 (320-874)	-
Edad Debut (años)	6,67 \pm 3,41 (2-15)	-



El diagnóstico de DM1 fue realizado en base al criterio utilizado por la Asociación Americana de Diabetes (ADA, 2011) (Glicemia en Ayunas ≥ 126 mg/dL, Glicemia plasmática a las 2 horas de PTGO ≥ 200 mg/dL, Glicemia plasmática al azar ≥ 200 mg/dL y HbA1c $\geq 6,5\%$). En todos los casos se aplicó una encuesta que recopiló los antecedentes médicos, familiares y clínicos del paciente. Además en el estudio participaron 20 sujetos controles sanos cuyo rango de edad fue 20-45 años para descartar la presencia de la enfermedad. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina e IDIMI de la Universidad de Chile.

2. 2. Toma de muestras

Las muestras de sangre de los niños con DM1 fueron colectadas en el Hospital San Borja Arriarán, previa firma de consentimiento informado por los padres de los niños menores de 10 años y/o firma de consentimiento informado por parte de los niños mayores de 10 años. Las muestras de sangre del grupo control fueron colectadas en el Departamento de Nutrición, Facultad de Medicina-Universidad de Chile, de igual modo previa firma de consentimiento informado. En todos los casos se colectó una muestra de 12 mL de sangre, mediante punción venosa en ayuno.

2. 3. Extracción de Células Mononucleares Periféricas

Los 12 mL de sangre extraída se diluyeron con buffer fosfato salino (PBS) en una razón 1:1 para facilitar el manejo de la muestra. Luego, la muestra diluida se dispensó muy lentamente sobre una solución de Ficoll-Hypaque (Lymphocyte Separation Medium, densidad 1,077 g/mL, Cellgro, USA.), solución de densidad conocida que permite realizar una separación por gradiente de densidad mediante centrifugación por 30 minutos a 1840 rpm (410 g) y a 4°C. Esta centrifugación genera un anillo que contiene las células mononucleares, los cuales son traspasados a un nuevo tubo y lavados dos veces con PBS 1X, mediante centrifugación a 2400 rpm (730 g) por 10 minutos. Finalmente, el pellet de células obtenido es resuspendido en medio RPMI-1640 (medio sin glucosa) (Gibco, Invitrogen, USA) y fueron contadas utilizando la tinción de azul tripán (Trypan Blue Stain 0,4%, Gibco, Invitrogen, USA) en cámaras de Neubauer.

2. 4. Cultivo de Células Mononucleares Periféricas

Las CMPs fueron incubadas a 37°C en una atmósfera con 5% CO₂, en placas Petri de 6 pocillos con medio de cultivo RPMI-1640 sin glucosa, suero fetal bovino al 5% inactivado y antibióticos (Penicilina y Estreptomina al 1,5%). Las células provenientes de cada paciente o control fueron expuestas en duplicado a distintas concentraciones de glucosa: 11 mM, 25 mM y 47 mM además de una condición control sin estímulo de glucosa por 20 horas. 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 fue resuspendido en TRIzol® (Invitrogen, USA), una solución de fenol e isocianato de guanidina que permite la ruptura de la célula pero conserva la integridad del RNA para aislarlo posteriormente y que permite su preservación a -80°C.

2. 5. Extracción de RNA total y síntesis de cDNA de miRNAs.

La extracción de RNA total se realizó con el método de TRIzol® (Invitrogen, USA), según las indicaciones del fabricante. No obstante, en la etapa de precipitación del RNA con alcohol isopropílico se extendió el período por 12 horas a -20°C para enriquecer la precipitación de RNAs totales y también de microRNAs, debido al menor tamaño de estas moléculas. Se determinó la pureza (contaminación con fenol o cloroformo) mediante la relación de absorbancia $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$, que resultó ser 1,8 para los pacientes y 1,9 para los controles. También se evaluó la integridad del RNA en un gel de agarosa denaturante con formaldehído para ver el nivel de degradación del RNA, mediante la relación entre las bandas ribosomales 28S y 18S, además de visualizar una posible contaminación con DNA genómico. Se cuantificó el RNA cargando 1 μ L del RNA total extraído en el espectrofotómetro Infite Nano Quant M200 Absorbance Microplate Reader (TECAN, Suiza) y se sintetizó cDNA de cada microRNA a partir de 10 ng de RNA total utilizando el ensayo TaqMan® Small RNA Assays (Applied

Biosystems by Life Technology, CA, USA) que posee partidores y sondas específicas para cada miRNAs a determinar. Este kit posee los reactivos necesarios para llevar a cabo la síntesis de cDNA, dentro de los cuales están: dNTPs (100 mM), MultiScribe™ Transcriptasa reversa (50 U/μL), buffer de Transcripción reversa 10X e inhibidor de RNAsa, (20 U/μL). La reacción se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

2. 6. PCR en tiempo real para miRNAs

Para evaluar la expresión relativa de miRNAs se realizó PCR en tiempo real RT-stem-loop (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) específicos para cada miRNA (Figura 4). Los niveles de expresión fueron determinados con sondas TaqMan MGB y TaqMan® Universal PCR Master Mix II (2x) no Uracilo-N glicosilasa (UNG), en duplicado en el equipo Agilent Mx3005P (Agilent Technologies, CA, USA). Los niveles de expresión de los miRNAs miR-155 y miR-326 fueron normalizados con RNU48, un RNA pequeño como control interno.

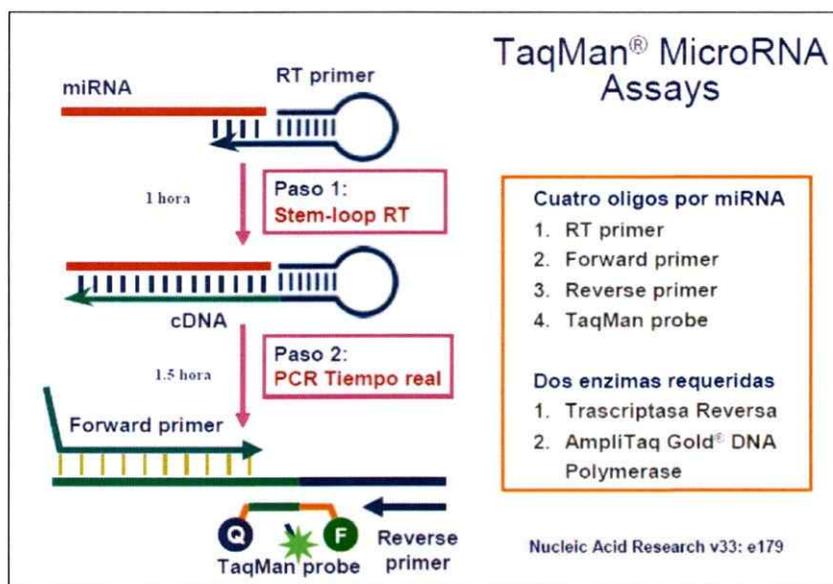


Figura 4. Cuantificación de miRNAs mediante el sistema de transcripción reversa, stem-loop RT-PCR. Esquema modificado de Chen C y cols., 2005.

2. 7. Ensayos Serológicos

La presencia de anticuerpos anti-GAD65, anti-IA2 y anti-ZnT8 fue determinada mediante inmunoensayo enzimático (ELISA) con el uso de kits comerciales Medizym® anti-IA2, Medizym® anti-GAD y Medizym® anti-ZnT8 (Medipan GmbH, Berlín, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La detección de anticuerpos se llevó a cabo de manera semi-cuantitativa tomando como referencia el valor de 5 UI/mL para GAD65 y 10 UI/mL para IA2 y ZnT8. Todas las muestras se analizaron en duplicados y aquellas muestras con un título mayor o igual a dicho valor fueron consideradas “muestras positivas”. Se obtuvo una sensibilidad y especificidad del 92,3%

y 98,6% para anti-GAD, 65,85% y 98% para anti-IA2; y 94% y 98,2% para anti-ZnT8, respectivamente.

Para el análisis de marcadores de inflamación las muestras se recolectaron en un tubo de separación de 1,5 ml de suero y se les permitió coagular durante 1 h a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron durante 10 min a 4° C y el suero fue alicuotado. La Proteína C Reactiva ultra sensible (PCRus) y el nivel de IL-6 se midieron mediante kit de ELISA comercial de diagnóstico (BioVendor R & D, República Checa) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El inmunoensayo Quantikine Human IL-6 corresponde a un ELISA en fase sólida diseñado para medir proteína en suero y plasma. El coeficiente intra-ensayo fue de 2,6% y el coeficiente inter-ensayo 3,8% respectivamente. Para la determinación de PCRus se utilizó un ELISA competitivo de alta sensibilidad. Este es un ELISA de tipo sándwich con un límite de detección de 0,02 ug/ml. El CV intra-ensayo fue del 4,4% y la inter-ensayo fue de 5,7%.

2. 8. Análisis estadísticos

Para el análisis estadístico se utilizó en primera instancia el programa REST© (Relative Expression Software Tool) (Pfaffl y col, 2002), diseñado particularmente para analizar resultados de qPCR utilizando la ecuación de Pfaffl. Este programa permite comparar la totalidad de los resultados, es decir los Ct de pacientes, controles y controles endógenos mediante un análisis estadístico de asignación al azar. Luego de realizado el test se informa sobre la significancia o no significancia de los resultados, de esta manera

se puede saber si las variaciones de expresión observadas entre los pacientes y controles son estadísticamente significativas.

Todos los análisis posteriores se realizaron con el programa GraphPad Prism6.0 (GraphPad Software, Inc. San Diego, USA). Se realizó el test de normalidad Shapiro-Wilk para determinar el tipo de test a utilizar. El efecto de la concentración de glucosa se estudió haciendo uso del test Kruskal-Wallis, donde se graficaron la mediana y el rango intercuartílico de los datos. Para determinar la relación entre el nivel de expresión de miRNAs con el perfil de autoanticuerpos y el perfil de inflamación, se utilizó el test de correlaciones bivariadas que permite medir el grado de dependencia existente entre dos variables (expresión de miRNA vs marcador autoinmunidad/inflamación). Para las muestras que presentaron una distribución normal se utilizó Pearson y para las muestras sin distribución normal se usó Spearman. En todos los casos se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

3. 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: 0 mM, 11 mM, 25 mM y 47 mM de glucosa por 20 h. Los datos obtenidos no presentaron una distribución normal según el test de Shapiro-Wilk. Por lo tanto, los resultados se muestran en los gráficos como mediana y rango intercuartílico. Para los análisis posteriores se aplicaron los estadísticos correspondientes a muestras no paramétricas.

3. 1. 1. Expresión de miR-326

En la Figura 5 se observa la expresión relativa del miR-326 en relación a los distintos estímulos de glucosa tanto para pacientes DM1 como controles. Se pudo observar que hay una menor expresión de este miRNA en los pacientes DM1 comparado con los controles, siendo esta disminución estadísticamente significativa solo en los estímulos de glucosa aplicados. Los valores de expresión fueron 0,71 [2,05] (C) versus 0,54 [1,00] (DM1) en el cultivo sin glucosa (n.s); 0,71 [1,47] (C) versus 0,16 [0,46] (DM1) para 11 mM ($p < 0,001$); 0,57 [1,98] (C) versus 0,16 [0,44] (DM1) para 25 mM de

glucosa ($p < 0,001$) y 0,78 [2,23] (C) versus 0,13 [0,20] (DM1) para 47 mM de glucosa ($p < 0,001$). Por otro lado, cuando se analizó el efecto de glucosa en cada grupo de estudio, no se encontraron diferencias entre los estímulos, tanto para controles sanos (C) y pacientes DM1 (D). Sin embargo la única diferencia estadísticamente significativa fue la encontrada al analizar el estímulo de 47 mM de glucosa con el tratamiento control sin glucosa en el grupo de DM1 (D47 vs DC, $p < 0,05$).

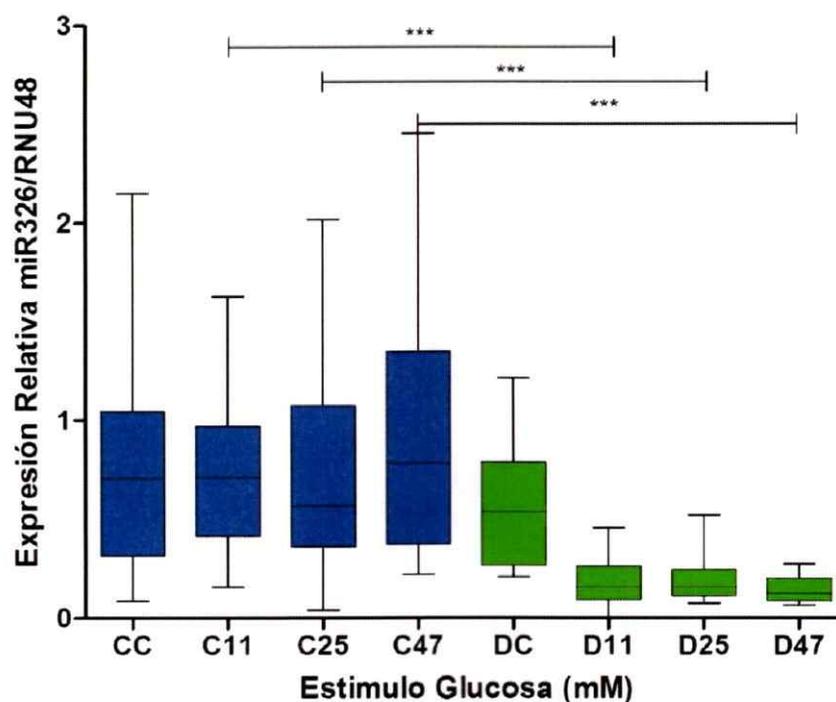


Figura 5. Expresión relativa de miR-326 versus estímulo de glucosa. Se determinó la expresión relativa de miR-326 mediante qPCR en muestras de RNA de pacientes DM1 y en sujetos controles a distintos estímulos de glucosa (Concentración basal sin glucosa, 11 mM, 25 mM y 47 mM). (n=20 para ambos grupos). Control normalización RNU48. Kruskal-Wallis, post hoc Dunns *** $p < 0,001$. (CC: control sin glucosa, C11: control 11 mM, C25: control 25 mM, C47: control 47mM, DC: diabético sin glucosa, D11: diabético 11 mM, D25: diabético 25 mM y D47: diabético 47 mM).

Se realizó un análisis más detallado para evaluar el efecto de la glucosa en la expresión del miR-326. La Figura 6 muestra que al tomar solo el grupo de pacientes con DM1 en el análisis del $\Delta\Delta C_t$ se encuentran disminuciones en la expresión, las cuales son estadísticamente significativas, entre los tratamiento con glucosa en comparación con el grupo control sin glucosa. Los grupos D11 y D25 presentan una disminución con un $p < 0,01$, mientras que el grupo D47 muestra una mayor disminución con un $p < 0,001$.

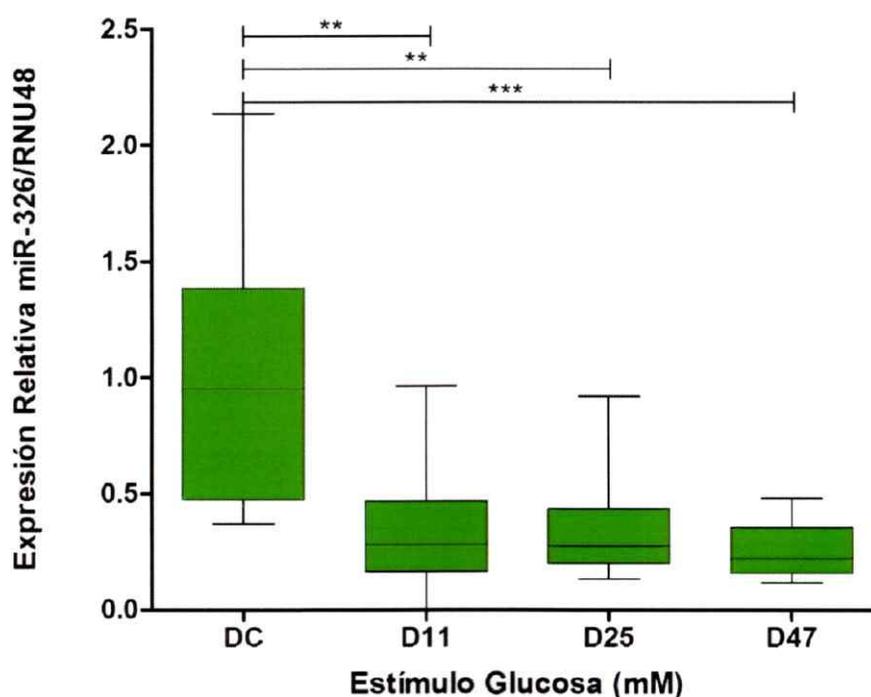


Figura 6. Expresión relativa de miR-326 versus estímulo de glucosa en grupo con DM1. Se determinó la expresión relativa de miR-326 mediante qPCR en muestras de RNA de pacientes DM1 a distintos estímulos de glucosa (Concentración basal sin glucosa, 11 mM, 25 mM y 47 mM). (n=20). Control normalización RNU48. Kruskal-Wallis, post hoc Dunns $**p < 0,01$, y $***p < 0,001$. (DC: diabético sin glucosa, D11: diabético 11 mM, D25: diabético 25 mM y D47: diabético 47 mM)



3. 1. 2. Expresión de miR-155

En la Figura 7 se puede observar un aumento del miR-155 en pacientes con DM1 al compararlos con el grupo control. Sin embargo, este aumento es significativo solo para algunas comparaciones entre pacientes y controles entre cada estímulo de glucosa; con valores de expresión de 0,57 [2,13] (C) versus 1,59 [5,61] (DM1) en el cultivo sin glucosa (n.s); 0,20 [1,26] (C) versus 1,03 [5,64] (DM1) en 11 mM ($p < 0,001$); 0,49 [2,65] (C) versus 1,47 [6,16] (DM1) en 25 mM ($p < 0,05$) y 0,10 [0,35] (C) versus 1,22 [8,48] (DM1) en 47 mM de glucosa ($p < 0,001$). No se encontraron cambios en la expresión de este miRNA al analizar el efecto de la glucosa dentro de cada grupo de estudio.

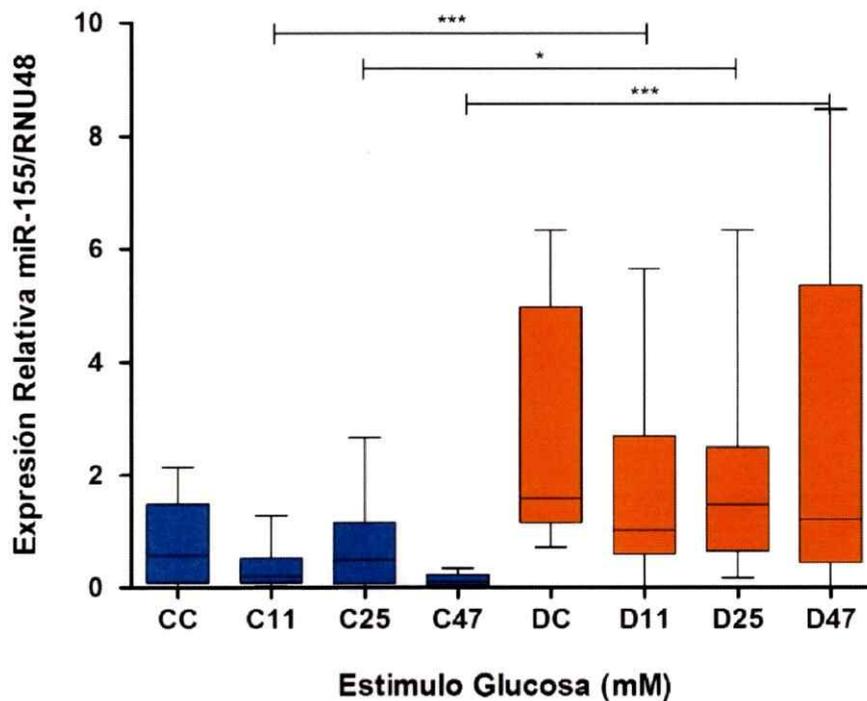


Figura 7. Expresión relativa de miR-155 versus estímulo de glucosa. Se determinó la expresión relativa de miR-155 mediante qPCR en muestras de RNA de pacientes DM1 y en sujetos controles a distintos estímulos de glucosa (Concentración basal sin glucosa, 11 mM, 25 mM y 47 mM). (n=20 para ambos grupos). Control normalización RNU48. Kruskal-Wallis, post hoc Dunns *p<0,05 y ***p<0,001. (CC: control sin glucosa, C11: control 11 mM, C25: control 25 mM, C47: control 47mM, DC: diabético sin glucosa, D11: diabético 11 mM, D25: diabético 25 mM y D47: diabético 47 mM).

Para el miR-155 también se realizó una evaluación del efecto de glucosa solo en los pacientes con DM1, a través del $\Delta\Delta Ct$ obtenido dentro de este grupo. A diferencia del miR-326, este análisis no arrojó diferencias entre los tratamientos realizados con respecto al grupo control sin glucosa (Figura 8).

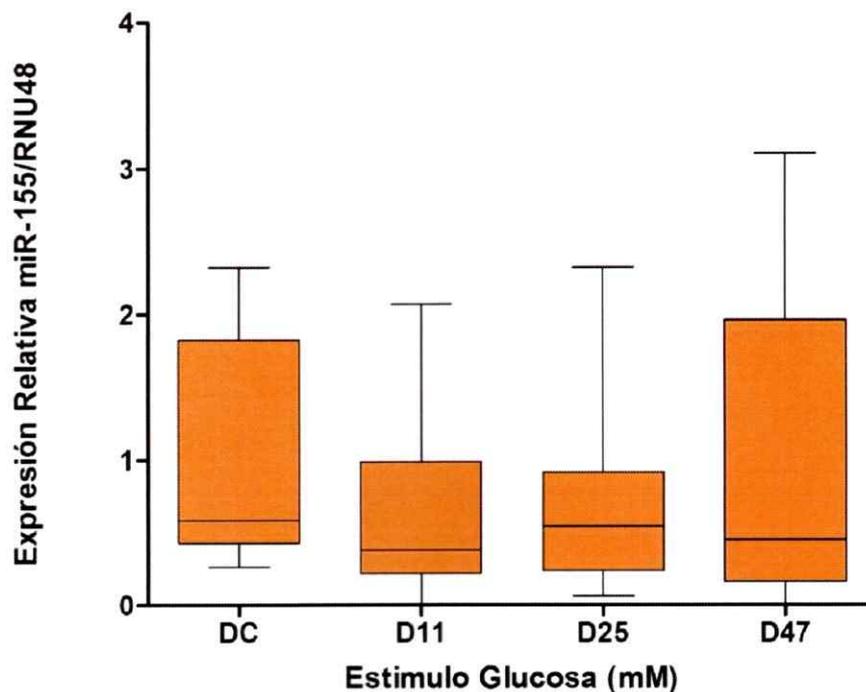


Figura 8. Expresión relativa de miR-155 versus estímulo de glucosa en grupo con DM1. Se determinó la expresión relativa de miR-326 mediante qPCR en muestras de RNA de pacientes DM1 a distintos estímulos de glucosa (Concentración basal sin glucosa, 11 mM, 25 mM y 47 mM). (n=20). Control normalización RNU48. Kruskal-Wallis, post hoc Dunns. (DC: diabético sin glucosa, D11: diabético 11 mM, D25: diabético 25 mM y D47: diabético 47 mM).

3. 2. Determinación de Autoanticuerpos: Anti-GAD65, Anti-IA2 y Anti-ZnT8

Se realizó el análisis serológico para los autoanticuerpos en las muestras obtenidas de los pacientes y controles. La determinación de todos los anticuerpos se realizó en muestras de suero recolectadas con posterioridad al diagnóstico una vez que el paciente ya se encontraba estabilizado desde el punto de vista glicémico y con dosificación de insulina. Se observó una alta frecuencia de anti-GAD65 positivos en las

muestras de pacientes DM1, seguidos por anti-IA2 y luego de anti-ZnT8 (Tabla 2). Para los controles, este análisis dio negativo para todos los autoanticuerpos analizados.

Tabla 2. Perfil de autoanticuerpos en pacientes con DM1 y controles sanos.

Autoanticuerpo Positivo	DM1 (%) (n=20)	Controles (%) (n=20)
GAD65	75	0
IA2	60	0
ZnT8	55	0

3. 3. Determinación de biomarcadores de inflamación en pacientes con DM1 y controles

Se realizó la determinación de biomarcadores de inflamación como IL-6, una citoquina pro-inflamatoria, y proteína C-reactiva (PCR), una proteína plasmática cuyos niveles aumentan en respuesta a inflamación. La Tabla 3 presenta la información relacionada al perfil inflamatorio en pacientes con DM1 y controles. Al respecto, el perfil de marcadores de inflamación fue significativamente mayor en los pacientes con DM1 versus los controles. El nivel de IL-6 alcanzó una mediana de 1,89 en pacientes con DM1 versus 0,8 en controles ($p < 0,05$) y finalmente el nivel de PCRus mostró una mediana de 1,43 en pacientes versus 1,08 en controles ($p < 0,03$). La frecuencia de este marcador alterado (PCRus > 3 ng/mL) fue del 20% en pacientes con DM1 y del 5% en controles sanos.

Tabla 3. Determinación de biomarcadores de inflamación mediante ELISA.

Biomarcador	DM1 (n=20)	Controles (n=20)	p-value ^a
PCRus (ng/mL)	1,43 [0,05-13,57]	1,08 [0,4-3,7]	<0,03
IL-6 (pg/mL)	1,89 [0,72-5,61]	0,8 [0,8-1,4]	<0,05

^aTest U de Mann-Whitney.

3. 4. Relación entre perfil serológico y expresión de miRNAs.

Como primer análisis, se evaluó si la presencia de uno, dos o tres autoanticuerpos (Ab) positivos tienen relación con la expresión de los miRNAs cuantificados. En las figuras 9 y 10, se pueden ver los gráficos obtenidos a partir de este análisis, el cual no arrojó diferencias entre los grupos analizados.

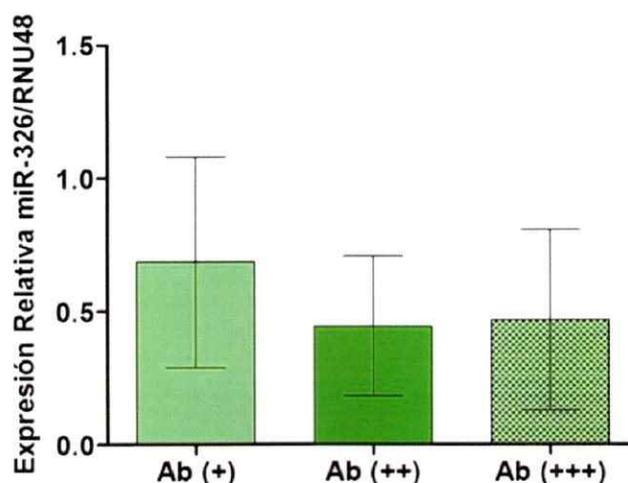


Figura 9. Expresión relativa del miR-326 versus positividad de autoanticuerpos. No se encontraron diferencias entre los grupos analizados. Ab (+): 1 autoanticuerpo positivo, Ab (++): 2 autoanticuerpos positivos, Ab (+++): 3 autoanticuerpos positivos. (n=20). Kruskal-Wallis, post hoc Dunns.

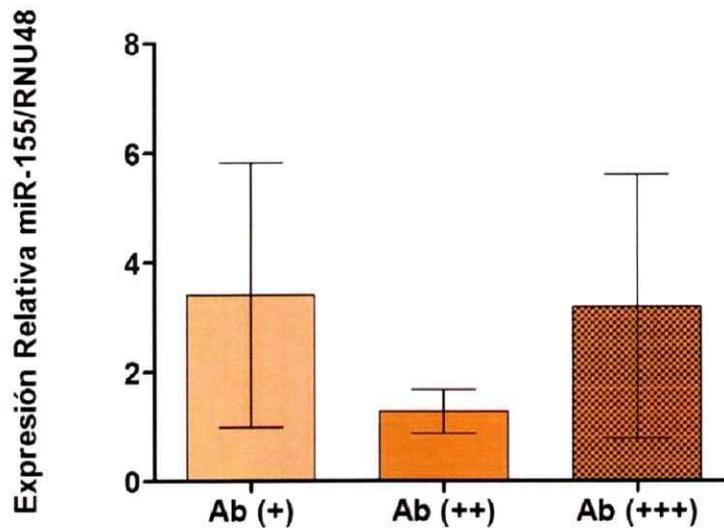


Figura 10. Expresión relativa del miR-155 versus positividad de autoanticuerpos. No se encontraron diferencias entre los grupos analizados. Ab (+): 1 autoanticuerpo positivo, Ab (++) : 2 autoanticuerpos positivos, Ab (+++): 3 autoanticuerpos positivos. (n=20). Kruskal-Wallis, post hoc Dunns.

Se analizó la expresión de miR-326 en los pacientes con DM1 según su perfil (positivo o negativo) para cada autoanticuerpo y marcador de inflamación. Para realizar el análisis se utilizó el test de Mann Whitney para muestras no paramétricas. No se observa ninguna diferencia en la expresión de este miRNA entre DM1 positivos y DM1 negativos para los autoanticuerpos GAD65, IA2 y ZnT8 (Figura 11), lo cual fue corroborado estadísticamente. Tampoco se encontró una diferencia significativa con el biomarcador de inflamación PCRus. Las barras en color lila muestran una pequeña diferencia en la expresión de miR326, en donde es menor en el grupo positivo para ZnT8 al compararlo con el grupo negativo. Sin embargo esta diferencia no es estadísticamente significativa.

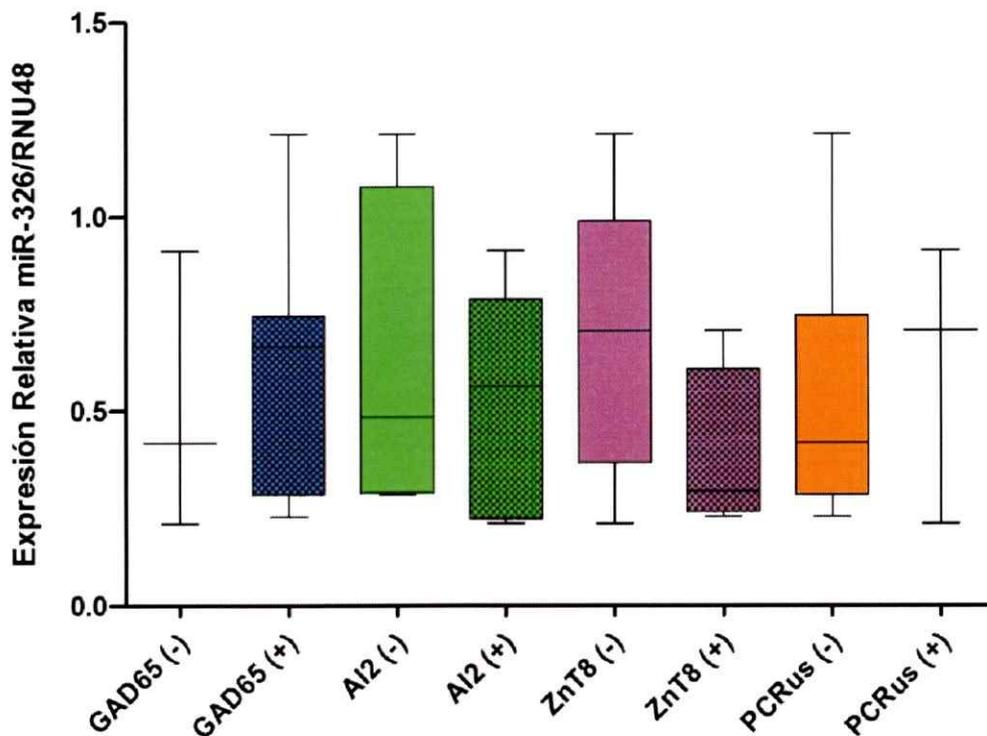


Figura 11. Expresión relativa de miRNA-326 vs perfil serológico. No se encontraron diferencias significativas de la expresión del miR326 entre pacientes DM1 negativos y DM1 positivos para cada autoanticuerpo (GAD65, IA2 y ZnT8) y el marcador de inflamación (PCRus). Test: Mann Whitney.

La Figura 12 muestra los gráficos de correlación entre el nivel de expresión de este miRNA y los datos serológicos, esta vez con los valores cuantitativos de concentración de los autoanticuerpos presentes en el suero de los pacientes con DM1. Se puede observar que en ninguno de los tres gráficos hay una relación aparente entre las variables analizadas. Esto fue corroborado con el coeficiente de correlación de Pearson, el cual no mostró correlación significativa y los valores encontrados fueron: anti-GAD65 con $r=0,573$ (positiva) y $p=0,084$; anti-IA2 con $r=-0,241$ (negativa) y $p=0,502$, y anti-ZnT8 con $r=-0,140$ (negativa) y $p= 0,699$.

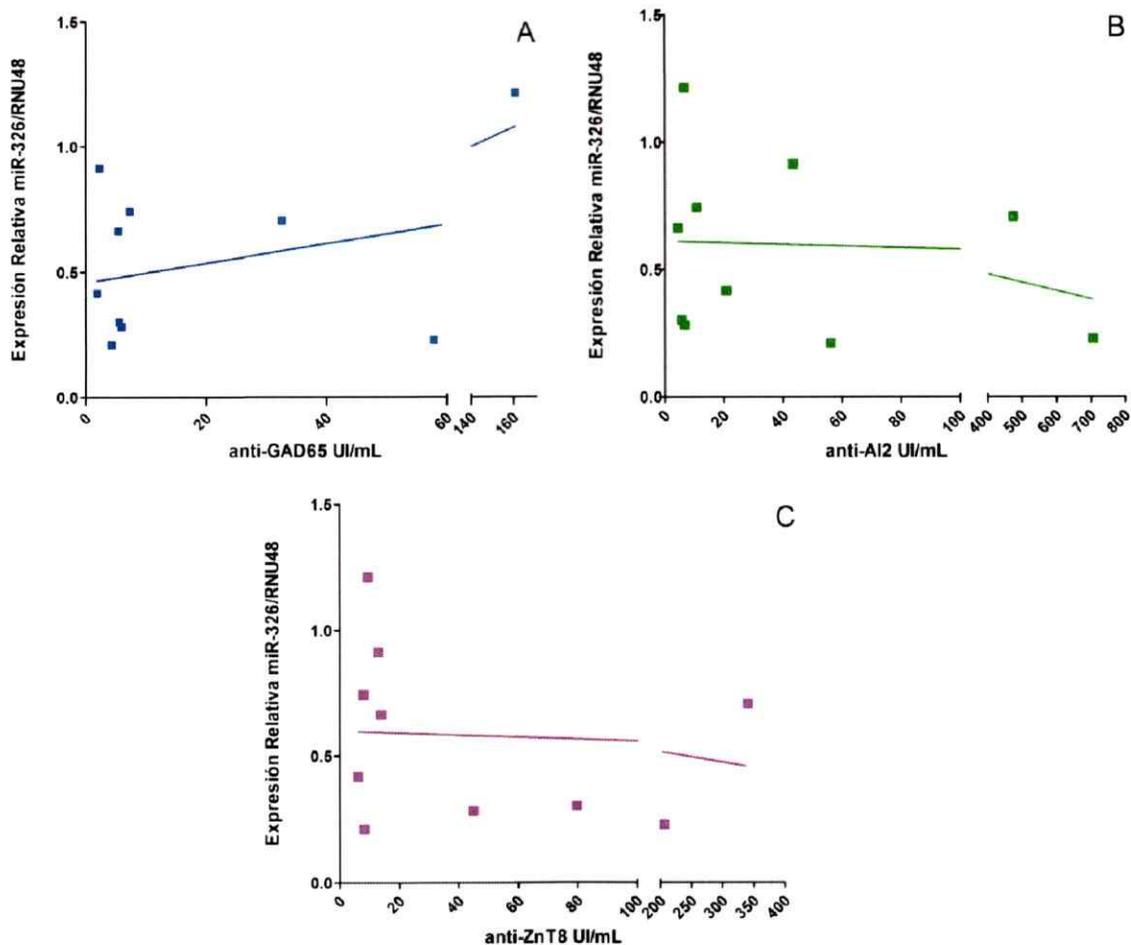


Figura 12. Expresión relativa de miRNA-326 vs. autoanticuerpos. A Correlación con anti-GAD65: $r=0,573$, $p=0,084$. B Correlación con anti-IA2: $r=-0,241$, $p=0,502$. C Correlación con anti-ZnT8: $r=-0,140$, $p=0,699$. En ninguno de los tres análisis se encontró una correlación significativa (r de Pearson).

Se analizó el perfil serológico en relación con los niveles de expresión de miR-155. Como primer análisis se determinó si hay diferencias en la expresión de este miRNA en pacientes con DM1 al comparar el grupo positivo para PCRus con el negativo para este biomarcador. Como fue señalado anteriormente en la sección de Materiales y Métodos, se utilizó el valor de 3 ng/mL como referencia para discriminar

entre muestras positivas y negativas para PCRus. La Figura 13 nos muestra la expresión relativa para el mir-155, en el cual no existe diferencia estadísticamente entre ambos grupos al aplicar el test de Mann Whitney. Tampoco se observan diferencias de este miRNA al realizar este análisis con los autoanticuerpos anteriormente señalados.

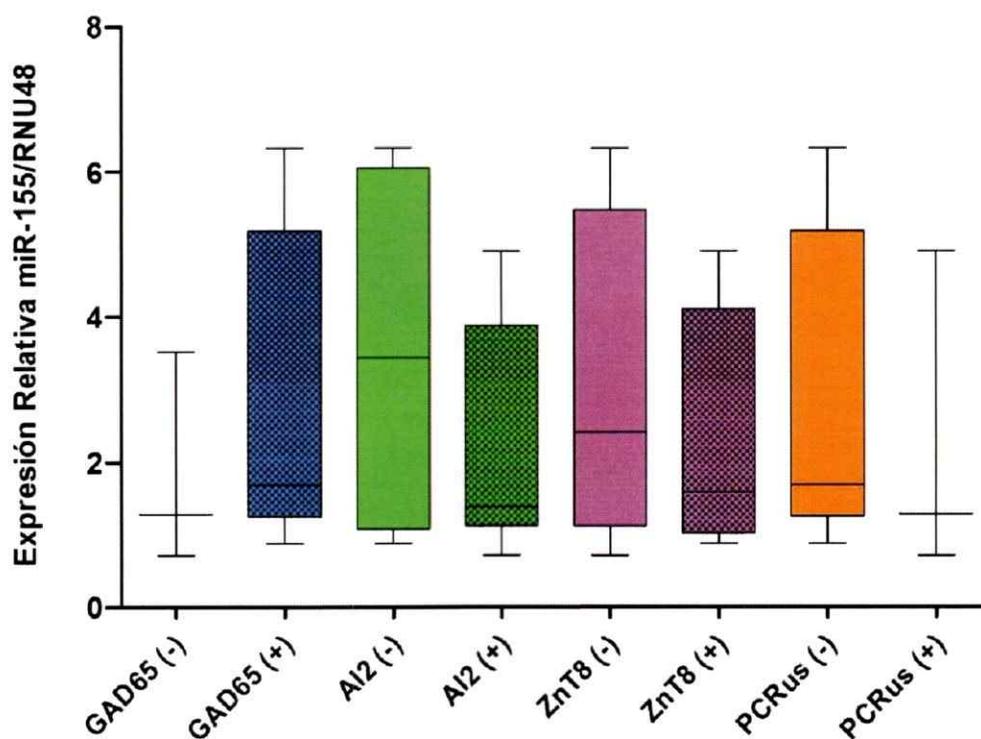


Figura 13. Expresión relativa de miR-155 vs perfil serológico. No se encontraron diferencias significativas de la expresión del miR-155 entre pacientes DM1 negativos y DM1 positivos para cada autoanticuerpo analizado (GAD65, IA2 y ZnT8) y el marcador de inflamación (PCRus). Test: Mann Whitney.

No se realizó este análisis para IL-6 ya que esta molécula no presenta valores de referencia para discriminar entre positivo y negativo dentro de los niveles séricos. Sin embargo, se pudo realizar estudio de correlación entre las variables cuantitativas entre los niveles séricos de IL-6 y PCRus con la expresión relativa de miR-155, como se puede observar en los gráficos de la Figura 14. No se observa una correlación definida en el gráfico A, sin embargo en B se puede observar una leve tendencia. Los valores de r de Spearman y Pearson obtenidos fueron los siguientes: PCRus $r=-0,055$ (negativa) y $p=0,892$; y para IL-6 $r=0,743$ (positiva) y $p=0,055$, respectivamente. Por lo tanto, no existe significancia al relacionar la expresión relativa de miR-155 con estos marcadores de inflamación.

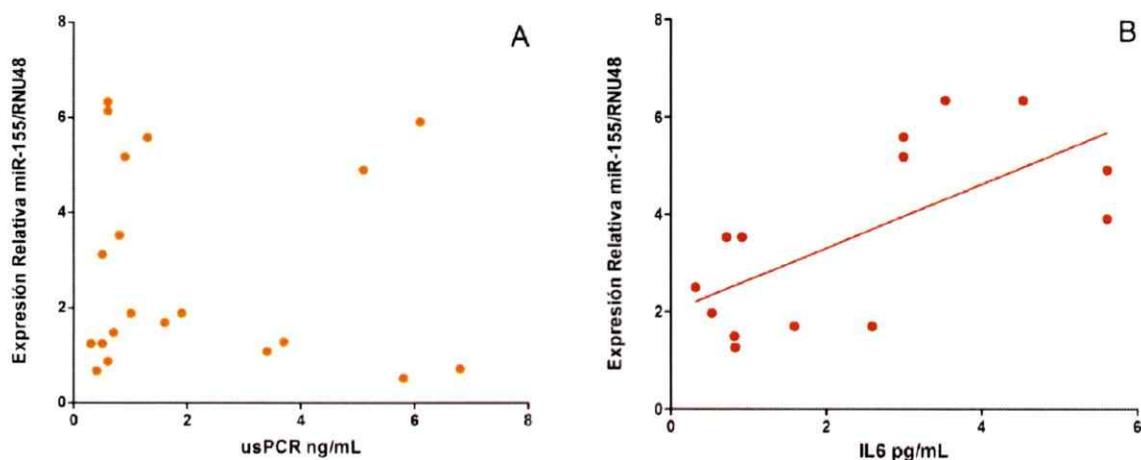


Figura 14. Expresión relativa de miRNA-155 vs. autoanticuerpos. **A** Correlación con PCRus: $r=-0,055$, $p=0,892$ (Spearman). **B** Correlación con IL-6: $r=0,743$, $p=0,055$ (Pearson). No se encontró correlación significativa en ninguno de los análisis con estos biomarcadores.

3. 5. Relación entre expresión de miRNAs y características de debut en pacientes con DM1.

Se realizó la correlación entre los niveles de expresión de los miRNAs y la glicemia de debut de los pacientes. Como se muestra en la Figura 15 no se encontró ninguna correlación significativa entre esta variable y cada uno de los miRNAs analizados. Los valores de r de Spearman para el miR-326 fue de 0,037 con un $p=0,875$ y para el miR-155 el valor fue $r=0,111$ con un $p=0,641$.

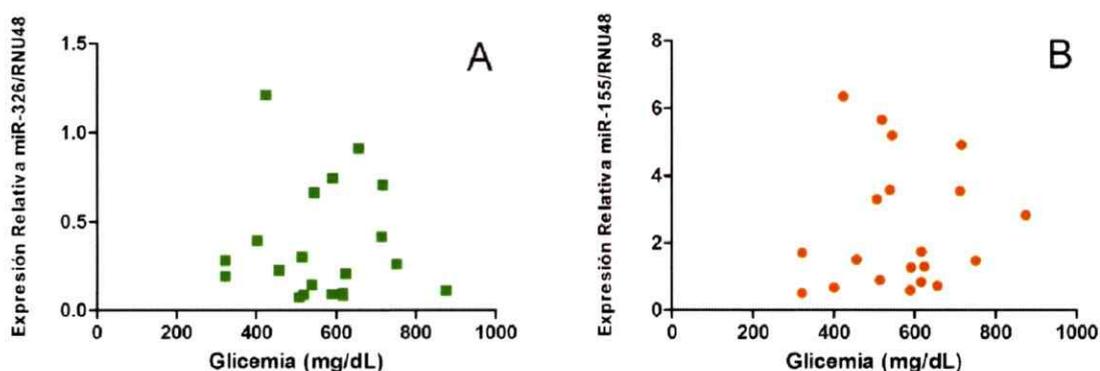


Figura 15. Expresión relativa de miRNAs vs. Glicemia de debut. A. Correlación con miR-326: $r=0,037$, $p=0,875$ (Spearman). B. Correlación con miR-155: $r=0,111$, $p=0,641$ (Spearman). No se encontró correlación significativa en ninguno de los análisis.

También se analizó la relación de la edad de debut de los pacientes con DM1 en comparación con los niveles de expresión de miR-326 y miR-155 (Figura 16). Los resultados de la correlación de Spearman son los siguientes: $r=0,149$ con $p=0,530$ para el miR-326; y $r=-0,303$ con $p=0,193$ para el miR-155. En ambos casos ninguna correlación fue estadísticamente significativa.

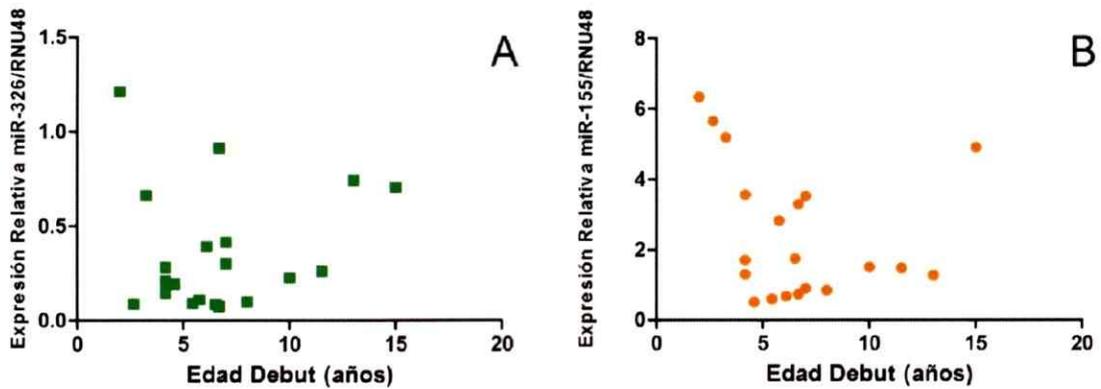


Figura 16. Expresión relativa de miRNAs vs. edad de debut. A. Correlación con miR-326: $r=0,149, p=0,530$ (Spearman). B. Correlación con miR-155: $r=-0,303, p=0,193$ (Spearman). No se encontró correlación significativa en ninguno de los análisis.

Como última comparación se realizó el análisis de la expresión de los miRNAs de acuerdo al sexo de los pacientes. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 17, en donde no se obtuvieron diferencias significativas al comparar la expresión relativa entre hombres y mujeres en ninguno de los miRNAs presentes en este estudio.

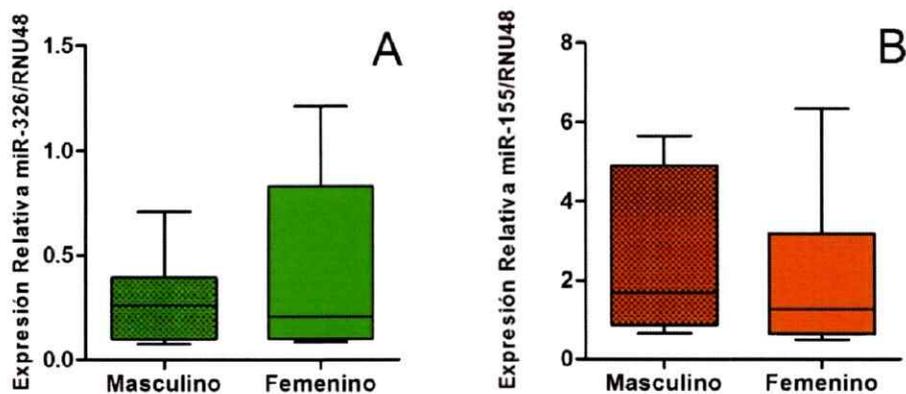


Figura 17. Expresión Relativa de miRNAs vs. Sexo. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar sexo en pacientes con DM1 en miR-326 (A) ni en miR-155 (B).

DISCUSIÓN

La DM1 es una enfermedad cuya etiología es muy compleja y donde los mecanismos que subyacen en esta patología no han sido descritos completamente. Esto se debe principalmente a que las interacciones de susceptibilidad genética más el ambiente son determinantes para desencadenar la enfermedad en ventanas altamente variables de tiempo, ya que puede presentarse desde recién nacidos hasta en individuos de 19 años.

Los miRNAs representan una gran familia de RNAs no codificantes que comprenden una parte fundamental de la regulación post-transcripcional de la expresión génica. Los miRNAs están críticamente involucrados en una amplia gama de enfermedades humanas y potencialmente podrían servir como buenos marcadores de diagnóstico, marcadores de pronóstico o blancos terapéuticos, especialmente en DM1.

En este estudio se analizaron dos miRNAs, miR-326 y miR-155, que ya fueron descritos en otras enfermedades autoinmunes y cuya expresión fue analizada bajo diferentes concentraciones de glucosa con el fin de emular y evaluar el efecto de hiperglicemias en la expresión y modulación de estas moléculas. Estos miRNAs fueron estudiados en el modelo de CMPs debido a que son una buena fuente de linfocitos. Concretamente más del 80% de las CMPs son LT, encontrándose en porcentajes

menores LB, monocitos y macrófagos (Vendrame y cols., 2006). Es por este motivo que los resultados observados en el conjunto de células mononucleares se pueden considerar como una buena aproximación de la expresión de los LT, por ser el grupo predominante en CMPs. Sin embargo es interesante realizar un análisis más fino para evaluar la contribución de cada tipo celular en los resultados obtenidos.

4. 1. miR-326

El gen precursor de miR-326 se encuentra dentro del cromosoma 11 en el intrón 1 del gen de la beta-arrestina 1 (*ARRB1*). Aunque algunos genes de miRNAs intrónicos tienen su propio promotor y, por lo tanto una posible expresión independiente, se ha demostrado que la transcripción podría ser consecuencia de la expresión de su gen hospedero (Lutter y cols., 2010). Es posible plantear la hipótesis de que la expresión de miR-326 se correlaciona positivamente con la expresión del gen *ARRB1*. Se ha demostrado que *ARRB1* regula la supervivencia de los LT a través de una mayor expresión del pro oncogén *BCL2* (Shi y cols., 2007). Los LT CD4⁺ son importantes en la inmunidad adaptativa, pero un desbalance en su regulación puede causar autoinmunidad. En el trabajo de Shi y cols. (2007) demostraron que la proteína ARRB1 regula positivamente la supervivencia de los LT CD4⁺ activados y LT^{naive}. También encontraron una mayor expresión del proto-oncogén *BCL2*, a través de la acetilación de la histona H4 en el promotor de *BCL2* dependiente de beta-arrestina 1. Se ha visto que ratones deficientes en el gen *Arrb1* son mucho más resistentes a la encefalomiелitis

autoinmune experimental, mientras que la sobreexpresión de *Arrb1* aumentó la susceptibilidad a esta enfermedad. Por otro lado, LT CD4⁺ de pacientes con EM presentaron una mayor expresión de *ARRB1*, y que al ser bloqueado por RNA interferente aumentó la apoptosis inducida por privación de citoquinas. A partir de estos antecedentes se puede decir que la proteína ARRB1 es clave para la supervivencia de LT CD4⁺ y es un factor de susceptibilidad a la autoinmunidad. Sin embargo, este no sería el fenómeno que está ocurriendo en las células de los pacientes con DM1 analizados. Un trabajo previo de nuestro grupo mostró que existe un perfil apoptótico alterado en CMPs de pacientes con DM1, en donde hay un aumento en la expresión del gen anti-apoptótico *XIAP* y una disminución de los genes pro-apoptóticos *FAS* y *BAX* (Valencia y cols., 2012). Sin embargo en este trabajo no se observó cambios en la expresión del gen *BCL2*, por lo tanto este gen no estaría siendo regulado por *ARRB1*, posiblemente por una disminución en la expresión del gen y que se refleja en una disminución del miR-326 presente en nuestro análisis.

En el trabajo de Sebastiani y cols. (2011), se muestra una alta correlación positiva del miR-326 con el perfil de autoinmunidad durante la enfermedad en curso, similar al análisis realizado en EM donde hay un aumento en la expresión de miR-326 en el período de reincidencia de la enfermedad (Du y cols., 2009). No obstante, el análisis de Sebastiani y cols. (2011) fue realizado solo en el grupo de pacientes con DM1, sin comparar el nivel del miRNA con personas sanas, como lo realizado en otros análisis del trabajo de Du y cols (2009) en EM. Llama la atención en este trabajo, que existen pacientes con DM1 los cuales no muestran presencia de algunos de los

autoanticuerpos clásicos de DM1, siendo éste el punto de partida en la comparación de autoinmunidad entre los grupos analizados (Ab (-) vs Ab (+)/ Ab (++)). En nuestro estudio no se detectaron pacientes con ausencia de autoanticuerpos dentro del grupo de DM1, por lo que no se podría concluir que no haya un efecto similar del miRNA en la positividad de los autoanticuerpos. Sin embargo, podemos decir que no hay diferencias entre la expresión de miR-326 a través de los grupos basados en el número de autoanticuerpos positivos. También se debe considerar la edad promedio de los grupos analizados, ya que en el grupo europeo el promedio de edad fue de $38,7 \pm 15,6$ años, mostrando que se realizó el análisis en un grupo de adultos, los cuales probablemente tienen perfiles metabólicos más regulados y controlados. Nuestro trabajo se basa en el análisis de niños con poco tiempo transcurrido desde el debut, sin tener completamente controlada la enfermedad y con niveles inestables de glicemia, en algunos casos. Por lo tanto, las variadas diferencias en cuanto a la muestra analizada, así como también la falta de análisis comparativo con un grupo sano en el trabajo ya publicado, nos lleva a concluir que ambos trabajos y sus resultados no son comparables.

Otro trabajo ya mencionado anteriormente, muestra un aumento del miR-326 en leucocitos de sangre periférica de pacientes con EM (Du y cols., 2009). También se muestran diferencias entre pacientes con EM en remisión, período sin síntomas, versus pacientes con la enfermedad en reincidencia, período en que se presentan nuevamente los síntomas. En esta comparación miR-326 muestra una mayor expresión en los pacientes reincidentes en comparación a los que tenían la enfermedad en remisión. También se muestra evidencia de que hay una mayor expresión de miR-326 en la

población de LT CD4⁺, pero no en LT CD8⁺ o poblaciones de células no LT de pacientes con EM. Por otro lado, pacientes con Neuromielitis Óptica (NMO), otro desorden inflamatorio del sistema nervioso central similar a la EM, pero mediada por autoanticuerpos, no mostró sobreexpresión de este miRNA (Du y cols., 2009).

Estos antecedentes revelan la variabilidad en la expresión del miR-326, incluso dentro de la misma enfermedad, ya sea en diferentes estadios de la misma o en diferentes subpoblaciones celulares de linfocitos. Además nos muestra que no todas las enfermedades presentan el mismo perfil de miRNAs a pesar de tener características similares. Por lo tanto, nuestros resultados pueden ser considerados válidos para un grupo etario menor a 20 años y en un estadio inicial de la enfermedad (primeros años desde el debut). No descartamos realizar posteriores análisis dentro de subpoblaciones de linfocitos, tal como lo realizado en EM.

Con respecto a los cultivos de CMPs con distintas concentraciones de glucosa adicionada al medio, podemos decir que ésta produce una disminución significativa en la expresión del miR-326. Esto sugiere que las condiciones epigenéticas de la enfermedad, como el aumento de glicemia durante el debut o previamente, pueden gatillar y generar cambios detectables en el medio intracelular. Se pudo observar que se presenta una disminución significativa de miR-326 en cada grupo con glucosa adicionada comparado con el grupo DM1 sin glucosa. Este resultado nos indicaría que existe un efecto supresor o inhibitorio por parte de la glucosa y que genera una disminución del mir-326.

Sin embargo, es ampliamente conocida la función e importancia de la glucosa en el metabolismo de todos los tipos celulares, incluyendo a las células del sistema inmune. Así es como los efectos de una disminución o aumento de esta molécula en el medio externo gatillan la activación de una serie de eventos que pueden conducir a la apoptosis, en el caso de una limitada captación de glucosa. Durante este proceso moléculas proapoptóticas, como el anteriormente mencionado BcL-2, son activadas promoviendo la muerte celular. Caso contrario es lo que sucede con un aumento extracelular de glucosa, que genera una mayor captación de esta molécula por la célula y que se ha relacionado a respuestas inmunes hiperactivas y posibles patologías inmunes (Maciver y cols., 2008). Por lo tanto, el aumento de glucosa extracelular en pacientes con DM1 generaría que las señales de muerte celular estén inactivas, y es lo que se podría estar observando en BcL2 y su gen regulador *ARRBI*, los que se encuentran en bajos niveles en esta patología. Esto finalmente podría explicar lo observado en miR-326, a través de la disminución en la expresión de su gen hospedero *ARRBI* en las CMPs.

4. 2. miR-155

El miR-155 es uno de los miRNAs que tiene un rol emergente en la regulación de la respuesta inmune. Se encuentra inserto en el gen *BIC* (“B-cell Integration Cluster”) y el transcrito de este gen se conoce como pri-miR-155 (Elton y cols., 2013). Dentro de los mRNAs blancos para este miRNA se encuentran muchas proteínas reguladoras de inflamación y supresores de tumores. Las proteínas que se han descrito que son



reguladas por miR-155 son: BACH1 un represor transcripcional de la hemo oxigenasa 1 (HO-1), FADD un adaptador molecular que media la apoptosis inducida por receptor, IKBKE un modulador de inflamación crónica en macrófagos, INPP5D un regulador negativo de la proliferación de células mieloides, MYD88 una molécula adaptadora en la señalización de TLR e IL-1R, RIPK1 una quinasa que participa en una necrosis regulada cuando las caspasas son inhibidas (necroptosis), SPI1 un factor de transcripción relacionado con la proliferación de células mieloides y de linfocito B; y SOCS que corresponden a proteínas supresoras de la señalización por citoquinas, siendo todas estas moléculas ampliamente estudiadas en inflamación (Elton y cols., 2013).

Para entender un poco más la relación entre este miRNA y la DMI, revisaremos la literatura existente en base a otras enfermedades y la regulación génica. El miR-155 es regulado por el factor de transcripción FOXP3 (forkhead box P3), que es esencial para el desarrollo normal de los LTreg (Marson y cols., 2007). Existen antecedentes previos que apuntan que LT de ratones knockout para Dicer presentan un mal desarrollo y diferenciación anormal de LT cooperadoras (LTh) y producción de citoquinas (Muljo y cols., 2005), demostrando que los miRNAs juegan un papel fundamental en el correcto desarrollo de los LT. Es importante destacar que numerosos estudios en Treg realizados en humanos y ratones respaldan y confirman al gen *MIR155* como un blanco directo de FOXP3 (Marson y cols., 2007; Zheng y cols., 2007; Zheng y Rudensky, 2007). Además, Kohlhass y cols. (2009) señala que *MIR155* es requerido para el desarrollo de Treg, pero prescindible en la proliferación o supervivencia de estas células en la periferia. Sin embargo, miR-155 ha demostrado desempeñar un papel importante en la homeostasis y

supervivencia de Treg al regular directamente a SOCS1, un regulador negativo de la señalización de IL-2 (Lu y cols., 2009).

Dentro de otras funciones, este miRNA es esencial para la normal diferenciación de células B y la producción de anticuerpos, y está involucrado en inflamación mediante la regulación de miembros de la súper familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) y sus ligandos, tales como el mismo TNF y TRAMP (TNFRSF25) (Gracias y cols., 2013). Por otra parte, se pudo observar que células dendríticas con bajas expresiones de miR-155 generan deficiencias en la presentación antigénica, mientras que en LT CD4⁺ el aumento de miR-155 controla la diferenciación a subgrupos de LT cooperadores como Th1, Th2 y Th17. También se reportó una mayor expresión del miR-155 en LT CD8⁺ después de la activación *in vitro*, así como también en LT CD8⁺ efectores antígeno-específicos *in vivo* (Gracias y cols., 2013).

De acuerdo a lo anteriormente descrito, el miR-155 podría controlar las respuestas inmunes e inflamatorias por muchas vías debido a sus múltiples funciones, en las que tiene efectos importantes en el desarrollo de varios tipos celulares del sistema inmune. Por lo tanto, podemos inferir que en DM1 el aumento en la expresión de este miRNA está contribuyendo al desarrollo de células que participan en la modulación de la respuesta inmune, y es responsable de la diferenciación de los LT CD4⁺ a LT cooperadores. Esto generaría un aumento de este fenotipo celular favoreciendo su acción por sobre la acción de los LTreg, por lo que se produciría el desbalance y posterior pérdida de la tolerancia hacia las células β del páncreas.

Es posible que el miR-155 pueda regular positivamente las vías de señalización que promueven el desarrollo de LTh17. Esto podría ser debido a la represión de proteínas que regulan negativamente vías que están activadas por TGF- β , IL-6 e IL-23. Aún no está claro si miR-155 regula directamente estas vías solo en LT CD4⁺, ya que se ha encontrado que miR-155 tiene como blanco a la Proteína 5 ligada a Sma y Mad (Smad5) en LB de linfoma (Rai y cols., 2010) y por otro lado, activa las señales del activador de la transcripción 3 (Stat3) en células de cáncer mamario (Jiang y cols., 2010). Ambos factores están involucrados en la señalización de TGF- β e IL-6, respectivamente.

La expresión elevada de miR-155 se ha observado también en lesiones cerebrales de pacientes con EM (Junker y cols., 2009) y en muestras sinoviales de pacientes con AR (Stanczyk y cols., 2008). Muchas condiciones autoinmunes, como EM, AR, y lupus eritematoso sistémico (SLE), involucran acciones de autoanticuerpos, como también a los LT inflamatorios, que se han demostrado pueden exacerbar una enfermedad. Estudios previos han demostrado que el miR-155 es importante para la producción de IgG antígeno específicos (Rodriguez y cols., 2007; Vigorito y cols., 2007). Por lo tanto, la modulación de miR-155 puede ser capaz de tratar condiciones que dependen tanto de los mecanismos inmunes humorales y de los mediados por células, volviéndolo un blanco terapéutico versátil.

4. 3. Anti-GAD65, Anti-IA2 y Anti-ZnT8

Se realizó un análisis serológico para los autoanticuerpos GAD65 (descarboxilasa del ácido glutámico) e IA2 (tirosina fosfatasa pancreática) y se observó una alta frecuencia para IA2 y GAD65 (60 y 75%, respectivamente) resultado esperable de acuerdo a lo registrado en la literatura, donde la presencia de los dos autoanticuerpos positivos representa aproximadamente un 75% de riesgo de asociación a DM1, mientras que la presencia de alguno de estos anticuerpos por si solo tiene un riesgo asociado al 25% (Verge y cols., 1996). Además, se debe mencionar que los pacientes con DM1 también suelen compartir otro tipo de autoanticuerpos frecuentes en patologías autoinmunes como la enfermedad celiaca, en el caso de anticuerpos anti-TTG o anticuerpos anti-tiroideos, como en tiroiditis de Hashimoto.

Si bien es reconocido ampliamente que los autoanticuerpos GAD65 y anti-IA2, son propios de la DM1, se realizó la determinación de ZnT8, un transportador de zinc que se encuentra en las células β pancreáticas (Wenzlau y cols., 2007). Al realizar su determinación se observa una frecuencia del 55% y su importancia radica en que a diferencia de los otros anticuerpos mencionados, el anti-ZnT8 aparentemente no estaría asociado 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 individuos donde el perfil de otros autoanticuerpos es negativo. De esta manera, la determinación de este autoanticuerpo sería fundamental en la detección de nuevos casos de DM1 y también en el análisis de la progresión y desarrollo futuro de la enfermedad. Así, la determinación de anticuerpos anti- ZnT8 junto con otros marcadores clásicos como

GAD65 e IA2 debiera aumentar la sensibilidad de detección de autoinmunidad en la DM1 (Salas-Perez y cols., 2012).

4. 4. Bio-marcadores de inflamación IL-6 y PCRus.

La proteína C-reactiva (PCR) es una proteína plasmática que aumenta sus niveles en presencia de inflamación. Se encontró elevada en las muestras de pacientes con DM1 respecto de los controles ($p < 0,03$). La determinación de PCR normalmente se utiliza como un marcador de riesgo cardiovascular al igual que VCAM. Así mismo se determinó los niveles de IL-6, una citoquina con características tanto pro-inflamatorias como anti-inflamatorias. En el contexto de DM1 actúa como una citoquina pro-inflamatoria (Allen y cols., 2012), donde los mecanismos inflamatorios juegan un papel clave en la patogénesis de la DM1. De hecho, algunos mediadores de inflamación como el TNF, IL-1, la familia de las citoquinas IL-6, IL-8 y ciertas quimioquinas se ha propuesto que están involucradas en los eventos que causan ambos tipos de diabetes (DM1 y DM2).

Por otra parte, se ha propuesto que IL-6, además de su función inmunoregulatoria, afecta la homeostasis de la glucosa y su metabolismo de manera directa e indirecta actuando en células del músculo esquelético, adipocitos, hepatocitos, células β pancreáticas y células neuroendocrinas. Al observar la tabla 3 se puede observar que los valores de esta citoquina se encuentran significativamente elevados, siendo su valor el doble de lo observado en sujetos controles. Así se confirma un patrón

inflamatorio exacerbado en los pacientes con DM1, lo cual podría estar dado por la presencia de LT circulantes resistentes a apoptosis los que promoverían este estado pro-inflamatorio y la destrucción de las células β pancreáticas.

4. 5. miRNAs y perfil serológico

El perfil de autoanticuerpos fue comparado con el perfil de expresión de miRNAs y nuestros resultados no encontraron correlaciones positivas entre estas variables, es decir, los valores de la expresión de miRNAs son independientes del perfil de autoanticuerpos. Respecto de la comparación del perfil de inflamación y la expresión de miRNAs, tampoco hubo una correlación significativa, de manera que la expresión génica, al menos de estos miRNAs, es independiente de estas variables.

Tampoco se encontró una relación entre los niveles de miRNAs y cada uno de las moléculas analizadas de acuerdo a su categorización como muestras positivas o negativas.

Sin embargo, la única aproximación encontrada fue entre la expresión del miR-155 con la concentración de IL-6, en donde se pudo observar una correlación positiva, pero que no es estadísticamente significativa. Trabajos recientes señalan que los LT CD4⁺ productores de IL-17, o LT cooperadores Th-17, son mediadores críticos de inflamación autoinmune crónica. El desarrollo de estas células es dirigida por citoquinas producidas por células del sistema inmune innato, incluyendo TGF- β , IL-6, IL-23 e IL-1

(O'Connell y cols., 2010). Por lo tanto, el aumento de esta citoquina encontrado en los pacientes con DM1 estaría favoreciendo el desarrollo de LTh-17, involucrando a miR-155 como se describió anteriormente, y generando un estado inflamatorio. Para corroborar este acercamiento en cuanto al efecto de la IL-6 y su relación con miR-155 en estas células, se hace necesario un análisis más extenso del mir-155 en base a subpoblaciones celulares de linfocitos, y conocer como es el comportamiento de este miRNA en diferentes concentraciones de IL-6 en muestras de pacientes con DM1.

CONCLUSIONES

- Se encontraron expresiones diferenciales en ambos miRNAs analizados en CMPs de pacientes con DM1 en comparación con controles. El miR-326 se encontró disminuido en CMPs de pacientes con DM1, siendo esta disminución dependiente de glucosa. El miR-155 presentó una mayor expresión en estas células de pacientes, lo cual fue independiente del estímulo de glucosa aplicado.
- Muestras séricas de pacientes con DM1 presentan un marcado perfil de autoanticuerpos anti-GAD65, anti-IA2 y anti-ZnT8, con niveles altamente positivos. La presencia de estos autoanticuerpos en controles fue negativa.
- Muestras séricas de pacientes con DM1 presentan elevados niveles de biomarcadores de inflamación PCRus y IL-6, en comparación con controles, indicando un perfil inflamatorio alterado.
- No se encontró una correlación entre el perfil de autoinmunidad y perfil inflamatorio con los niveles de miRNAs analizados.

De acuerdo a la hipótesis planteada podemos indicar que sólo el miR-155, está aumentado en CMPs de pacientes con DM1, siendo este incremento independiente de glucosa y no se correlaciona con el perfil autoinmune e inflamatorio encontrado.

Por lo tanto, este patrón de expresión diferencial encontrado en ambos miRNAs está participando en la regulación de componentes del sistema inmune durante desarrollo de la DM1.

BIBLIOGRAFÍA

- Allen, T.L., M. Whitham, and M.A. Febbraio. 2012. IL-6 muscles in on the gut and pancreas to enhance insulin secretion. *Cell metabolism*. 15:8-9.
- Atkinson, M.A., and N.K. Maclaren. 1994. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 331:1428-1436.
- Bach, J.F. 2005. Infections and autoimmune diseases. *J Autoimmun*. 25 Suppl:74-80.
- Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 116:281-297.
- Bell GI, Horita S, and K. JH. 1984. A polymorphic marker near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*. 33:176-183.
- Bennett S, Lucassen A, Gough S, Powell E, and U. D. 1995. Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. *Nat Genet*. 9:284-292.
- Bennett, S.T., A.J. Wilson, F. Cucca, J. Nerup, F. Pociot, P.A. Mckinney, A.H. Barnett, B. S.C., and J.A. Todd. 1996. IDDM2-VNTR-encoded susceptibility to type 1 diabetes: dominant protection and parental transmission of alleles of the insuline gene-linked minisatellite locus. *J Autoimmun*. 9:415-421.
- Bonner-Weir, S., W.C. Li, L. Ouziel-Yahalom, L. Guo, G.C. Weir, and A. Sharma. 2010. Beta-cell growth and regeneration: replication is only part of the story. *Diabetes*. 59:2340-2348.
- Cai, Y., X. Yu, S. Hu, and J. Yu. 2009. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics, proteomics & bioinformatics*. 7:147-154.
- Calin, G.A., A. Cimmino, M. Fabbri, M. Ferracin, S.E. Wojcik, M. Shimizu, C. Taccioli, N. Zanesi, R. Garzon, R.I. Aqeilan, H. Alder, S. Volinia, L. Rassenti, X. Liu, C.G. Liu, T.J. Kipps, M. Negrini, and C.M. Croce. 2008. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:5166-5171.
- Cobb, B.S., A. Hertweck, J. Smith, E. O'Connor, D. Graf, T. Cook, S.T. Smale, S. Sakaguchi, F.J. Livesey, A.G. Fisher, and M. Merckenschlager. 2006. A role for Dicer in immune regulation. *The Journal of experimental medicine*. 203:2519-2527.
- Cooke, A. 2009. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: how might infection modulate the onset of type 1 diabetes? *Immunology*. 126:12-17.
- Cordes, K.R., and D. Srivastava. 2009. MicroRNA regulation of cardiovascular development. *Circulation research*. 104:724-732.
- Chatenoud L, and B. JA. 2007. CD3-specific antibodies: a portal to the treatment of autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 7:622-632.
- Du, C., C. Liu, J. Kang, G. Zhao, Z. Ye, S. Huang, Z. Li, Z. Wu, and G. Pei. 2009. MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nature immunology*. 10:1252-1259.
- Elton, T.S., H. Selemon, S.M. Elton, and N.L. Parinandi. 2013. Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes. *Gene*. 532:1-12.
- Farid, N., L. Sampson, P. Noel, J. Barnard, A. Davis, and D. Hillman. 1979. HLA-D-related (DRw) antigens in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes*. 28:552-557.

- Flores, S., M. Beems, A. Oyarzún, E. Carrasco, and F. Pérez-Bravo. 2010. Programmed cell death 1 (PDCD1) gene polymorphisms and type 1 diabetes in Chilean children. *Rev Med Chile* 138:543-550.
- Fourlanos, S., M.D. Varney, B.D. Tait, G. Morahan, M.C. Honeyman, P.G. Colman, and L.C. Harrison. 2008. The rising incidence of type 1 diabetes is accounted for by cases with lower-risk human leukocyte antigen genotypes. *Diabetes Care*. 31:1546-1549.
- García M, and D. P. 2003. Clasificación, Diagnóstico y Pesquisa de la Diabetes Mellitus, Epidemiología de la Diabetes Mellitus, Etiopatogenia de la Diabetes Mellitus. Arancibia Hnos. y Cía. Ltda. 23-55 pp.
- Gillespie KM, Bain SC, Barnett AH, Bingley PJ, Christie MR, and e.a. : 2004. The rising incidence of childhood type 1 diabetes and reduced contribution of highrisk HLA haplotypes. . *Lancet*. 364:1699-1700.
- Gracias, D.T., E. Stelekati, J.L. Hope, A.C. Boesteanu, T.A. Doering, J. Norton, Y.M. Mueller, J.A. Fraietta, E.J. Wherry, M. Turner, and P.D. Katsikis. 2013. The microRNA miR-155 controls CD8(+) T cell responses by regulating interferon signaling. *Nature immunology*. 14:593-602.
- Graves, P., and Y. Zeng. 2012. Biogenesis of mammalian microRNAs: a global view. *Genomics, proteomics & bioinformatics*. 10:239-245.
- Hawa, M.I., H. Beyan, L.R. Buckley, and R.D. Leslie. 2002. Impact of genetic and non-genetic factors in type 1 diabetes. *Am J Med Genet*. 115:8-17.
- Hennessy, E., M. Clynes, P.B. Jeppesen, and L. O'Driscoll. 2010. Identification of microRNAs with a role in glucose stimulated insulin secretion by expression profiling of MIN6 cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 396:457-462.
- Jiang, G.X., X.Y. Zhong, Y.F. Cui, W. Liu, S. Tai, Z.D. Wang, Y.G. Shi, S.Y. Zhao, and C.L. Li. 2010. IL-6/STAT3/TFF3 signaling regulates human biliary epithelial cell migration and wound healing in vitro. *Molecular biology reports*. 37:3813-3818.
- Junker, A., M. Krumbholz, S. Eisele, H. Mohan, F. Augstein, R. Bittner, H. Lassmann, H. Wekerle, R. Hohlfeld, and E. Meinl. 2009. MicroRNA profiling of multiple sclerosis lesions identifies modulators of the regulatory protein CD47. *Brain : a journal of neurology*. 132:3342-3352.
- Karvonen, M., J. Tuomilehto, I. Libman, and R. LaPorte. 1993. A review of the recent epidemiological data on the worldwide incidence of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. World Health Organization DIAMOND Project Group. *Diabetologia*. 36:883-892.
- Keir, M.E., M.J. Butte, G.J. Freeman, and A.H. Sharpe. 2008. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annual review of immunology*. 26:677-704.
- Kim, V.N., and J.W. Nam. 2006. Genomics of microRNA. *Trends in genetics : TIG*. 22:165-173.
- King, M.L., A. Shaikh, D. Bidwell, A. Voller, and J.E. Banatvala. 1983. Coxsackie-B-virus-specific IgM responses in children with insulin-dependent (juvenile-onset; type 1) diabetes mellitus. *Lancet*. 1:1397-1399.
- Kloosterman, W.P., A.K. Lagendijk, R.F. Ketting, J.D. Moulton, and R.H. Plasterk. 2007. Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development. *PLoS biology*. 5:e203.
- Kohlhaas, S., O.A. Garden, C. Scudamore, M. Turner, K. Okkenhaug, and E. Vigorito. 2009. Cutting edge: the Foxp3 target miR-155 contributes to the development of regulatory T cells. *Journal of immunology*. 182:2578-2582.
- Kukreja A, and M. NK. 1999. Autoimmunity and diabetes. . *J Clin Endocrinol Metab* 84:4371-4378.

- Kurowska-Stolarska, M., S. Alivernini, L.E. Ballantine, D.L. Asquith, N.L. Millar, D.S. Gilchrist, J. Reilly, M. Ierna, A.R. Fraser, B. Stolarski, C. McSharry, A.J. Hueber, D. Baxter, J. Hunter, S. Gay, F.Y. Liew, and I.B. McInnes. 2011. MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108:11193-11198.
- Lehuen, A., J. Diana, P. Zacccone, and A. Cooke. 2010. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nature reviews. Immunology*. 10:501-513.
- Lowe CE, Cooper JD, Brusko T, Walker NM, and S. DJ. 2007. Largescale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes. *Nat Genet*. 39.
- Lu, L.F., T.H. Thai, D.P. Calado, A. Chaudhry, M. Kubo, K. Tanaka, G.B. Loeb, H. Lee, A. Yoshimura, K. Rajewsky, and A.Y. Rudensky. 2009. Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein. *Immunity*. 30:80-91.
- Lutter, D., C. Marr, J. Krumsiek, E.W. Lang, and F.J. Theis. 2010. Intronic microRNAs support their host genes by mediating synergistic and antagonistic regulatory effects. *BMC genomics*. 11:224.
- Maciver, N.J., S.R. Jacobs, H.L. Wieman, J.A. Wofford, J.L. Coloff, and J.C. Rathmell. 2008. Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival. *Journal of leukocyte biology*. 84:949-957.
- Marson, A., K. Kretschmer, G.M. Frampton, E.S. Jacobsen, J.K. Polansky, K.D. MacIsaac, S.S. Levine, E. Fraenkel, H. von Boehmer, and R.A. Young. 2007. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature*. 445:931-935.
- Matsuura N, Fukuda K, Okuno A, Harada S, Fukushima N, Koike A, Ito Y, and H. T. 1998. Descriptive epidemiology of IDDM in Hokkaido, Japan: the childhood IDDM Hokkaido registry. *Diabetes Care*. 21:1632-1636.
- Muljo, S.A., K.M. Ansel, C. Kanellopoulou, D.M. Livingston, A. Rao, and K. Rajewsky. 2005. Aberrant T cell differentiation in the absence of Dicer. *The Journal of experimental medicine*. 202:261-269.
- Myers, M.A., K.D. Hettiarachchi, J.P. Ludeman, A.J. Wilson, C.R. Wilson, and P.Z. Zimmet. 2003. Dietary microbial toxins and type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci*. 1005:418-422.
- Nerup J, Platz P, Andersen OO, Christy M, and L. J. 1974. HL-A antigens and diabetes mellitus. *Lancet*. 2:864-866.
- Nistico L, Buzzetti R, Pritchard LE, Van der Auwera B, and G. C. 1996. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry. *Human Molecular Genetic*. 5:1075-1080.
- O'Connell, R.M., D. Kahn, W.S. Gibson, J.L. Round, R.L. Scholz, A.A. Chaudhuri, M.E. Kahn, D.S. Rao, and D. Baltimore. 2010. MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. *Immunity*. 33:607-619.
- Ounissi-Benkhalha, H., and C. Polychronakos. 2008. The molecular genetics of type 1 diabetes: new genes and emerging mechanisms. *Trends in molecular medicine*. 14:268-275.
- Owerbach D, Lernmark A, Platz P, Ryder LP, Rask L, Peterson PA, and L. J. 1983. HLA-D region beta-chain DNA endonuclease fragments differ between HLA-DR identical healthy and insulin-independent diabetic individuals. *Nature*. 303:815-817.
- Plaisance, V., A. Abderrahmani, V. Perret-Menoud, P. Jacquemin, F. Lemaigre, and R. Regazzi. 2006. MicroRNA-9 controls the expression of Granuphilin/Slp4 and the secretory response of insulin-producing cells. *The Journal of biological chemistry*. 281:26932-26942.

- Poy, M.N., L. Eliasson, J. Krutzfeldt, S. Kuwajima, X. Ma, P.E. Macdonald, S. Pfeffer, T. Tuschl, N. Rajewsky, P. Rorsman, and M. Stoffel. 2004. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*. 432:226-230.
- Rai, D., S.W. Kim, M.R. McKeller, P.L. Dahia, and R.C. Aguiar. 2010. Targeting of SMAD5 links microRNA-155 to the TGF-beta pathway and lymphomagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:3111-3116.
- Rodriguez, A., S. Griffiths-Jones, J.L. Ashurst, and A. Bradley. 2004. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome research*. 14:1902-1910.
- Rodriguez, A., E. Vigorito, S. Clare, M.V. Warren, P. Couttet, D.R. Soond, S. van Dongen, R.J. Grocock, P.P. Das, E.A. Miska, D. Vetrie, K. Okkenhaug, A.J. Enright, G. Dougan, M. Turner, and A. Bradley. 2007. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science*. 316:608-611.
- Salas-Perez, F., E. Codner, E. Valencia, C. Pizarro, E. Carrasco, and F. Perez-Bravo. 2013. MicroRNAs miR-21a and miR-93 are down regulated in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with type 1 diabetes. *Immunobiology*. 218:733-737.
- Salas-Perez, F., T. Loeff, C. Pizarro, K. Vásquez, P.E. Carrasco, M. Araya, and F. Perez-Bravo. 2012. Frecuencia del polimorfismo C1858T del gen PTPN22 y marcadores de autoinmunidad en pacientes chilenos con diabetes tipo 1 y enfermedad celíaca. *Revista Chilena de Endocrinología y Diabetes*. 5:68-72.
- Santos, J.L., F. Pérez-Bravo, and E. Carrasco. 2000. Association between HLA-DQB1*0201 and DQB1*0302 alleles with type 1 diabetes do not depend on cytomegalovirus antibody status at set: a case-parent study conducted in Chile. *Immunology and Cell Biology*. 78:259-263.
- Sebastiani, G., F.A. Grieco, I. Spagnuolo, L. Galleri, D. Cataldo, and F. Dotta. 2011. Increased expression of microRNA miR-326 in type 1 diabetic patients with ongoing islet autoimmunity. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 27:862-866.
- Shi, Y., Y. Feng, J. Kang, C. Liu, Z. Li, D. Li, W. Cao, J. Qiu, Z. Guo, E. Bi, L. Zang, C. Lu, J.Z. Zhang, and G. Pei. 2007. Critical regulation of CD4+ T cell survival and autoimmunity by beta-arrestin 1. *Nature immunology*. 8:817-824.
- Singal, D., and M. Blajchman. 1973. Histocompatibility (HL-A) antigens, lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus. *Diabetes*. 22:429-432.
- Stanczyk, J., D.M. Pedrioli, F. Brentano, O. Sanchez-Pernaute, C. Kolling, R.E. Gay, M. Detmar, S. Gay, and D. Kyburz. 2008. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 58:1001-1009.
- Thorsby, E., and K. Ronningen. 1993. Particular HLA-DQ molecules play a dominant role in determining susceptibility or resistance to type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 36:371-377.
- Tisch, R., and H. McDevitt. 1996. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell*. 85:291-297.
- Todd JA, Bell JI, and M. HO. 1987. HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*. 329:599-604.
- Trucco, M., and J.S. Dorman. 1989. Immunogenetics of insulin-dependent diabetes mellitus in humans. *Crit Rev Immunol*. 9:201-245.
- Undlien DE, Friede T, Rammensee HG, Joner G, and D.-J. K. 1997. HLA-encoded genetic predisposition in IDDM: DR4 subtypes may be associated with different degrees of protection. *Diabetes*. 46:143-149.

- Valencia, E., E. Codner, F. Salas-Perez, C. Pizarro, P.E. Carrasco, M. Arredondo, and F. Perez-Bravo. 2012. High glucose concentration in T1D patients modulates apoptotic protein expression: down regulation of BAX and FAS and up regulation of XIAP. *Human immunology*. 73:801-804.
- van Belle, T.L., K.T. Coppieters, and M.G. von Herrath. 2011. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiological reviews*. 91:79-118.
- Vasudevan, S., Y. Tong, and J.A. Steitz. 2007. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*. 318:1931-1934.
- Vehik, K., R.F. Hamman, D. Lezotte, J.M. Norris, G.J. Klingensmith, M. Rewers, and D. Dabelea. 2008. Trends in high-risk HLA susceptibility genes among Colorado youth with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 31:1392-1396.
- Vendrame, F., M. Segni, D. Grassetti, V. Tellone, G. Augello, V. Trischitta, M. Torlontano, and F. Dotta. 2006. Impaired caspase-3 expression by peripheral T cells in chronic autoimmune thyroiditis and in autoimmune polyendocrine syndrome-2. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 91:5064-5068.
- Verge, C.F., R. Gianani, E. Kawasaki, L. Yu, M. Pietropaolo, H.P. Chase, and G.S. Eisenbarth. 1996. Number of autoantibodies (against insulin, GAD or ICA512/IA2) rather than particular autoantibody specificities determines risk of type I diabetes. *Journal of autoimmunity*. 9:379-383.
- Vigorito, E., K.L. Perks, C. Abreu-Goodger, S. Bunting, Z. Xiang, S. Kohlhaas, P.P. Das, E.A. Miska, A. Rodriguez, A. Bradley, K.G. Smith, C. Rada, A.J. Enright, K.M. Toellner, I.C. MacLennan, and M. Turner. 2007. microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. *Immunity*. 27:847-859.
- Wagenknecht, L.E., J.M. Roseman, and W.H. Herman. 1991. Increased incidence of insulin-dependent diabetes mellitus following an epidemic of Coxsackievirus B5. *Am J Epidemiol*. 133:1024-1031.
- Wenzlau, J.M., K. Juhl, L. Yu, O. Moua, S.A. Sarkar, P. Gottlieb, M. Rewers, G.S. Eisenbarth, J. Jensen, H.W. Davidson, and J.C. Hutton. 2007. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:17040-17045.
- Yoon, J.W., M. Austin, T. Onodera, and A.L. Notkins. 1979. Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. *N Engl J Med*. 300:1173-1179.
- Zhang, B., Q. Wang, and X. Pan. 2007. MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants. *Journal of cellular physiology*. 210:279-289.
- Zheng, Y., S.Z. Josefowicz, A. Kas, T.T. Chu, M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2007. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature*. 445:936-940.
- Zheng, Y., and A.Y. Rudensky. 2007. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nature immunology*. 8:457-462.