

UCH-FC  
Biotecnología  
V152  
c.1



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

**“EXPRESIÓN LINFOCITARIA DE GENES ANTI Y PRO  
APOPTÓTICOS EN DIABETES TIPO 1: POSIBLE ASOCIACIÓN CON  
LA SEVERIDAD CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

**MARÍA ELIZABETH VALENCIA ESCOBAR**

Dr. Francisco Pérez Bravo  
Director del Seminario de Título

Septiembre de 2011  
Santiago – Chile



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la **SRTA. MARÍA ELIZABETH VALENCIA ESCOBAR**

### **“EXPRESIÓN LINFOCITARIA DE GENES ANTI Y PRO APOPTÓTICOS EN DIABETES TIPO 1: POSIBLE ASOCIACIÓN CON LA SEVERIDAD CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

*Dr. Francisco Pérez Bravo*  
**Director Seminario de Título**

#### **Comisión de Evaluación**

*Dra. María Rosa Bono Merino*  
**Presidenta Comisión**

*Dr. Julio Alcayaga Urbina*  
**Corrector**

  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_



Santiago de Chile, Septiembre de 2011

## Biografía



Desde que era pequeña siempre quise ser bombero. Cuando “crecí” pensé estudiar Medicina, mis papás (sobre todo mi mamá) estaban orgullosos con esa decisión y siempre pensaron que sería la Médico de la familia. Motivados por entregarme la mejor educación para este fin, decidieron cambiarme de colegio en primero medio, al Instituto San Martín de Curicó, mi ciudad natal. El cambio de colegio no fue nada fácil, extrañaba a mis amigas (la marianita y la viole), el nivel de exigencia era mayor y no faltaron las personas que intentaron hacerme las cosas más difíciles; sin embargo, fue en este colegio donde se forjó mi personalidad y gran parte de la persona que soy hoy en día. Tuve muy buenos y muy malos profesores, a los buenos les agradezco haberme dado las herramientas para potenciar mis habilidades y hacer de mi la estudiante responsable y esforzada que fui durante toda la enseñanza media. Les agradezco haberme motivado a la lectura, hacer que me cuestionara las cosas y gracias al taller “Ideas fundamentales de la Ciencia” despertar mi espíritu científico. Cuando estaba en primero medio descubrí una carrera que ya sólo el nombre me parecía sorprendente: “Ingeniería en Biotecnología Molecular”, averigüé y leí mucho sobre la carrera y desde ese momento supe que quería dedicarme a la Ciencia. Siempre con mis ideas soñadoras, más cercanas a lo ficticio que a lo real, me vine a Santiago hace cinco años con el sueño de descubrir la cura del Alzheimer. Durante mis años de estudio en la Universidad, me pude ir dando cuenta de a poco que esa idea era un tanto ambiciosa y que además las Neurociencias no era el tema que me llamaba más la atención, por lo que la deseché de mis planes.

Mis años de Universidad han sido definitivamente los mejores de mi vida. Recuerdo esas largas noches de estudio en primero con la Chini y el Pancho Trigo, que manera de no estudiar! Recuerdo las risas, los carretes, el primer viaje a Cartagua con el Manu, la Gaby, la Karina.. gracias por haber sido mis partners el primer año de Universidad. Gracias al Benja por enseñarme Mate 2 jaja sin él, nunca hubiera aprendido a derivar! Y que hubiera sido mi vida sin “los bachi”, esos que los que entramos por PSU a veces no queremos mucho, pero que yo llegué a querer y valorar como mis mejores amigos que son hoy en día. Feñito, realmente hiciste que mis años de U fueran hermosos, compartimos tantas cosas que siento que haberte conocido a ti es una de las mejores cosas que me regaló la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, realmente espero que sea un regalo para toda la vida. Gracias a ti conocí también a mis grandes amigas la Lilla y la Mariela, “mis favoritas”. A la Barbarilla, a la Carmen, la Lore, la Faby, con quienes me sentí siempre mucho más “en grupo” que con mi propio curso por lo que se convirtieron en esas personas por las cuales uno va feliz a la U porque pasar tiempo con ellas siempre era y es divertido.

Cuando estaba en 5° año de carrera, mis papas nuevamente hicieron un gran esfuerzo y pude irme de intercambio a España. Viví cinco meses en Sevilla estudiando en la facultad de Biología de la Universidad de Sevilla. Esos cinco meses realmente cambiaron mi vida, para bien o para mal conocí mucha gente, viví tantas cosas, tantas experiencias, contemplé tantos lugares, aprendí tanto, no sólo en lo académico si no de la vida, de la gente y de mi misma. Agradezco al laboratorio de “hongos de interés aplicado” de la Dra. Tahía Benítez (que jubiló este año) por recibirme y confiar en mí, aunque nunca logré clonar el bendito MUC1 por lo menos lo aprendí a hacer en teoría jaja. Al llegar a Chile mi deseo por la Biomedicina me llevó a ampliar mis horizontes y buscar tesis fuera de Ciencias, con lo cual llegué al laboratorio del Dr. Francisco Pérez en la Facultad de Medicina, donde realicé esta tesis que me llevará a obtener el tan ansiado y esperado título de Ingeniería en Biotecnología Molecular.

## **Agradecimientos**

En primer lugar gracias a mi tutor, Francisco Pérez, por recibirme, confiar en mí y sobre todo por no echarme del lab luego de mis numerosos condoros del comienzo, como el tubo atrapado en la centrífuga, sólo por mencionar el más “grave” jaja.

Gracias a la Pabla, mi primera mentora, a quien debo mucho más que enseñarme a tomar las pipetas y a hacer cultivos jeje, contigo pude aprender sobre el rigor de las ciencias, el orden y la metódica que se debe tener para trabajar en esto.. espero haberme impregnado un poco de tu excelente forma de hacer las cosas!

Gracias a la Amaya por enseñarme todo lo referente al lab cuando llegué.

Gracias Karlita por todos los tips científicos que me diste y las conversas en la ventana junto al vicio, que he logrado dejar y que espero tú lo logres también!

Gracias a la Chini y la Fran que en los pocos meses que alcanzamos a compartir como compañeras de lab me hicieron reír demasiado, éxito!

Gracias a la Lore de la PUC por dejarme ir a usar el Nanodrop por horas, para cuantificar mis muestras de RNA.

Gracias a Nicolás Nazal de Genexpress, por siempre responder a tiempo y con buena disposición mis numerosos mails con dudas sobre el Real Time.

Gracias a Diego (García) por todos los tips en primer lugar sobre los experimentos y luego sobre el análisis. Gracias por enseñarme lo básico de bioestadística y a usar GraphPad Prism y SPSS. También gracias por las correcciones en la ppt de la presentación.

Gracias a mis amigos y al Jere, por todo el apoyo y la paciencia durante el desarrollo de la tesis, por escucharme cuando me quejaba de que no me resultaban las cosas y por ayudar a que me distrajera cuando estaba estresada.

Para terminar, debo agradecer a esas personas a las que les debo prácticamente todo lo que tengo y todo lo que soy en la vida, quienes gracias a su esfuerzo y entrega puedo estar aquí hoy, en 2011, ad portas de mi titulación como Ingeniera en Biotecnología Molecular. Gracias a mi familia: mis papas y mi hermana, por su apoyo, por su paciencia y lo más importante por su amor. Y aunque no se los demuestre tanto como ustedes quisieran, los quiero mucho y los tengo presentes en cada momento.

*“Para mí, no hay emoción comparable a la que produce la actividad creadora, tanto en ciencia como en arte, literatura u otras ocupaciones del intelecto humano. Mi mensaje, dirigido sobre todo a la juventud, es que si sienten inclinación por la ciencia, la sigan, pues no dejará de proporcionarles satisfacciones inigualables. Ciertamente es que abundan los momentos de desaliento y frustración, pero estos se olvidan pronto, mientras que las satisfacciones no se olvidan jamás”*  
Severo Ochoa.

## **I. ÍNDICE**

Biografía.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Índice de contenidos .....	v
Índice de tablas.....	vii
Índice de figuras.....	vii
Índice de ecuaciones.....	viii
Lista de abreviaturas y genes .....	ix
<b>II. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>III. ABSTRACT.....</b>	<b>3</b>
<b>IV. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
<b>IV.1. La genética de la DM1.....</b>	<b>6</b>
<b>IV.2. Factores ambientales.....</b>	<b>7</b>
<b>IV.3. Autoinmunidad y DM1.....</b>	<b>8</b>
<b>IV.4. Diabetes y apoptosis.....</b>	<b>11</b>
<b>IV.5. Mecanismos de apoptosis.....</b>	<b>12</b>
• Vía intrínseca o mitocondrial.....	13
• Vía independiente de APAF1 y caspasa 9.....	14
• Vía extrínseca o de receptores de muerte.....	15
<b>IV.6. Apoptosis en células T.....</b>	<b>17</b>

<b>V. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
<b>V.1. Objetivos generales.....</b>	<b>20</b>
<b>V.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>20</b>
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
<b>VI.1. Participantes del estudio.....</b>	<b>21</b>
<b>VI.2. Toma de muestras.....</b>	<b>21</b>
<b>VI.3. Extracción de células mononucleares.....</b>	<b>22</b>
<b>VI.4. Cultivo de mononucleares.....</b>	<b>22</b>
<b>VI.5. Extracción de ARN y síntesis de ADNc.....</b>	<b>23</b>
<b>VI.6. Diseño, selección y prueba de partidores.....</b>	<b>24</b>
<b>VI.7. Cuantificación de la expresión génica.....</b>	<b>26</b>
<b>VI.8. Análisis de los resultados de qPCR.....</b>	<b>27</b>
<b>VI.9. Análisis serológico.....</b>	<b>28</b>
<b>VI.10. Análisis estadístico.....</b>	<b>29</b>
<b>VII. RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
<b>VII.1. Integridad de las muestras de ARN y ADNc.....</b>	<b>30</b>
<b>VII.2. Selección de genes endógenos.....</b>	<b>31</b>
<b>VII.3. Eficiencias de amplificación de los partidores utilizados.....</b>	<b>32</b>
<b>VII.4. Cuantificación de la expresión génica. Análisis individual.....</b>	<b>33</b>
<b>VII.5. Cuantificación de la expresión génica. Análisis grupal.....</b>	<b>35</b>
<b>VII.6. Cuantificación de la expresión génica. Efecto de la glucosa.....</b>	<b>37</b>
<b>VII.7. Antecedentes clínicos.....</b>	<b>38</b>
<b>VII.8. Análisis serológico.....</b>	<b>42</b>

<b>VIII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>46</b>
<b>VIII.1. Modelo de estudio.....</b>	<b>47</b>
<b>VIII. 2. Apoptosis en células T.....</b>	<b>48</b>
<b>VIII.3. Efecto del estímulo de glucosa en la expresión.....</b>	<b>54</b>
<b>VIII.4. Relación con perfil de anticuerpos y antecedentes clínicos.....</b>	<b>56</b>
<b>VIII.5. Proyecciones.....</b>	<b>57</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>58</b>

## **I.2. Índice de tablas.**

<b>Tabla 1. Secuencias de partidores utilizados en el estudio.....</b>	<b>25</b>
<b>Tabla 2. Valores de eficiencia de los partidores utilizados en el estudio.....</b>	<b>33</b>
<b>Tabla 3. Antecedentes clínicos de los pacientes del estudio.....</b>	<b>39</b>
<b>Tabla 4. Relación entre la expresión y los antecedentes clínicos de los pacientes.....</b>	<b>40</b>
<b>Tabla 5. Análisis serológico de los pacientes del estudio.....</b>	<b>43</b>

## **I.3. Índice de figuras.**

<b>Figura 1. Línea de tiempo del proceso autoinmune que se desarrolla en la DM1.....</b>	<b>10</b>
<b>Figura 2. Principales mecanismos de apoptosis.....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 3. Modelo experimental usado en el estudio.....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 4. Cálculo de la eficiencia de reacción de cada par de partidores utilizado.....</b>	<b>26</b>



<b>Figura 5.</b> Gel de integridad de cADN.....	30
<b>Figura 6.</b> Curvas de amplificación de <i>β-actina</i> .....	31
<b>Figura 7.</b> Curvas de amplificación de <i>atp5b</i> .....	32
<b>Figura 8.</b> Número de pacientes que presentaron variación en la expresión.....	34
<b>Figura 9.</b> Razones de expresión de los genes de estudio a 198 y a792 mg/dL de glucosa .....	36
<b>Figura 10.</b> Efecto de glucosa en la expresión génica. Genes pro apoptóticos.....	37
<b>Figura 11.</b> Efecto de glucosa en la expresión génica. Genes anti apoptóticos.....	38
<b>Figura 12.</b> Razones de expresión en función a presencia de cetoacidosis al debut.....	41
<b>Figura 13.</b> Razones de expresión en función a presencia de anti GAD-65.....	44
<b>Figura 14.</b> Razones de expresión en función a presencia de anti IA-2.....	45
<b>I.4. Índice de ecuaciones.</b>	
<b>Ecuación 1.</b> Ecuación de Pfaffl.....	28

## I.5. Lista de abreviaturas y genes

ACAD	Activated cell-autonomous death
AICD	Activation-induced cell death
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
APAF- 1	Apoptotic protease activating factor-1
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
<i>atp5b</i>	Gen que codifica a la proteína ATP sintasa
<i>b2m</i>	Gen que codifica a la proteína B2M
B2M	Beta 2 microglobulina
<i>bax</i>	Gen que codifica para la proteína BAX
BAX	BCL2-associated X protein
<i>bcl-2</i>	Gen que codifica para la proteína BCL-2
BCL-2	B cell lymphoma 2
<i>bcl-xL</i>	Gen que codifica para la proteína BCL-XL
BCL-XL	BCL2-like 1, isoforma larga
BID	BH3 interacting domain death agonist
<i>cas3</i>	Gen que codifica para la proteína CAS3
CAS3	Caspasa 3
CMPs	Células mononucleares Periféricas
CPA	Células Presentadoras de Antígeno
Ct	Threshold cycle

<i>ctla-4</i>	Gen que codifica para la proteína CTLA-4
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DD	Death domain
DIABLO	IAP-binding mitochondrial protein
DM1	Diabetes Mellitus Tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
FADD	Fas associated death domain
FASL	Ligando de Fas
FLIP	FLICE like inhibitory protein
GAD65	Acido Glutámico Descarboxilasa
<i>gapdh</i>	Gen que codifica para la proteína GAPDH
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HLA	Antígeno del Leucocito Humano
<i>hprt1</i>	Gen que codifica para la proteína HPRT1
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
IA-2	Proteína Tirosina Fosfatasa
IAA	Antígeno anti-insulina
IAPs	Proteínas inhibidoras de apoptosis
ICA	Anticuerpos contra células de los islotes pancreáticos
ICOS	Moléculas coestimuladoras inducibles
IDDM	Insulin Dependent Diabetes Mellitus
IFN- $\alpha$	Interferón Alfa
IFN- $\gamma$	Interferón Gamma

<i>il2ra</i>	Gen que codifica para la proteína IL2R $\alpha$
IL2R $\alpha$	Interleukin 2 receptor, alpha
IL-1	Interleuquina 1
IL-2	Interleuquina 2
IL-6	Interleuquina 6
INS	Insulina
LB	Linfocito B
LT	Linfocito T
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
MOMP	Permeabilización de la membrana externa mitocondrial
<i>ptpn22</i>	Gen que codifica para la proteína PTPN22
PTPN22	Proteína Tirosina Fosfatasa N22
PBS	Tampón Fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>ppib</i>	Gen que codifica para la proteína PPIB
PPIB	Peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
T1D	Type 1 diabetes
TCR	Receptor de Linfocitos T
TNF- $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
<i>ubc</i>	Gen que codifica para la proteína UBC
UBC	Ubiquitina
<i>xiap</i>	Gen que codifica para la proteína XIAP
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis

## II. RESUMEN

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) es una enfermedad autoinmune que afecta principalmente a niños. Se caracteriza por una destrucción progresiva de las células  $\beta$  pancreáticas debido a la infiltración en el tejido pancreático de células mononucleares periféricas, que ocasionan una disminución paulatina de la producción de insulina, llegando a un punto en el que la masa de células  $\beta$  se hace crítica y el paciente es diagnosticado con la enfermedad. La etiología de la DM1 es compleja e incluye factores genéticos y ambientales que no están del todo claros. Recientemente, se han publicado artículos donde se muestra que pacientes con enfermedades autoinmunes, entre ellas DM1, presentan una expresión alterada de algunos genes relacionados con apoptosis, como aumento en la expresión de inhibidores tales como xiap y flip o disminución en la expresión de ejecutores de apoptosis, como caspasa 3, en un modelo de células mononucleares periféricas. Esta situación estaría dando cuenta de una disminución en los procesos apoptóticos en éstas célula. De acuerdo a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue medir la expresión de seis marcadores de apoptosis, tres pro apoptóticos y tres anti apoptóticos, en células mononucleares periféricas de pacientes con DM1 y comparar estos patrones de expresión con los presentados en sujetos sin la enfermedad. Por otro lado, se estudió la relación entre la expresión de los marcadores de apoptosis y los antecedentes clínicos de los pacientes, tales como su edad de debut, años de enfermedad, presencia o ausencia de auto-anticuerpos y presencia o ausencia de cetoacidosis en el debut.

Los resultados muestran que de los seis genes analizados, *fas*, *bax* (pro apoptóticos) y *bcl-2* y *bcl-xL* (anti apoptóticos), muestran una disminución de la expresión en los pacientes con DM1 en relación a los controles. Por otro lado, *cas3* (pro apoptótico) no muestra cambios significativos en la expresión y sólo *xiap* (anti apoptótico) mostró un aumento en la expresión de los pacientes en relación a los controles. De lo anterior se puede concluir, que los mecanismos apoptóticos en las células mononucleares periféricas de paciente con DM1 efectivamente están alterados, lo que está siendo principalmente indicado por la expresión disminuida del gen pro apoptóticos *fas* y por el aumento en la expresión del gen anti apoptótico *xiap*.

### III. ABSTRACT

Type 1 diabetes mellitus (T1D) is an autoimmune disease that affects mainly children between the age of one and eighteen years old. It is characterized by a progressive destruction of pancreatic  $\beta$  cells due to an infiltration of peripheral mononuclear cells into pancreatic tissues, causing a gradual decrease in insulin production. When the mass of  $\beta$  cells reaches a critical level, clinical symptoms appear, leading to the diagnosis of the disease. The etiology of this disease is complex, including genetic and environmental factors which are not completely clear. Recently, it has been reported in several articles that patients with autoimmune diseases (including T1D) exhibit impaired expression of apoptotic genes, for example increased expression of inhibitory genes like *xiap* and *flip* or decreased expression of pro apoptotic gene *caspase 3*, in a model of peripheral mononuclear cells. This situation implies a diminution in the apoptotic processes in those cells. The objective of this investigation was to measure the expression of six apoptosis markers; three of them pro-apoptotic and three anti-apoptotic, in peripheral mononuclear cells of T1D patients. This expression was compared with patterns obtained from controls subjects. On the other hand, the relation between the apoptotic markers and the clinical history of patients; items such as: age of onset, years of disease, presence or absence of ketoacidosis at disease onset and presence or absence autoantibodies was further analyzed.

The results revealed that DMI patients have a decreased expression of pro-apoptotic genes *fas* and *bax* and anti-apoptotic gene *bcl-2* when compared with control subjects. On the other hand, only anti-apoptotic gene *xiap* showed an increased expression. Meanwhile, *cas3* and *bcl-xL* did not reveal any significant difference in expression between patients and controls. We can conclude that apoptotic mechanisms in peripheral mononuclear cells of T1D patients are altered mainly evidenced by the decreased expression of pro-apoptotic gene *fas* and by the increased expression of anti-apoptotic gene *xiap*.



#### IV. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus es una enfermedad de alta incidencia a nivel mundial donde cada año el número de personas que la padecen aumenta significativamente (Vehik y Dabelea, 2011). Se estima que en el mundo 23,6 millones de personas, que corresponde al 7,8% de la población, posee alguno de los dos tipos de diabetes, siendo la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) de mayor prevalencia frente a la diabetes mellitus tipo 1 (DM1) (Van Belle y col, 2011). Tan sólo en Chile el número de personas con diabetes ha mostrado un aumento impactante en los últimos años, llegando a censarse en el año 2010 que el 9,4% del total de chilenos y chilenas padece la enfermedad (Encuesta Nacional de Salud Chile, 2009-2010). Ambos tipos de diabetes se caracterizan porque el paciente muestra niveles altos de glucosa en la sangre (hiperglicemia), que de no ser tratada correctamente puede generar una serie de problemas en el organismo que van desde cetoacidosis, fallas renales, enfermedades cardíacas, ceguera y accidentes cerebrovasculares (Van Belle y col, 2011).

La DM1, también llamada diabetes juvenil o insulino dependiente, es una enfermedad que se origina producto del proceso autoinmune mediado por células T que genera la destrucción paulatina de las células  $\beta$  pancreática, secretoras de insulina. Es una de las enfermedades pediátricas crónicas más comunes y se caracteriza por poseer una patogénesis y perfil clínico que varía notablemente entre pacientes (Mayer-Davis y col, 2009).

#### **IV.1. La genética de la DM1**

La DM1 es una enfermedad de predisposición hereditaria cuyos rasgos comunes son multigenicidad, heterogeneidad y tendencia a baja penetrancia y transmisión (Pugliese, 2004). Desde hace décadas se ha descrito que la región HLA ubicada en el cromosoma 6p21 es un locus de susceptibilidad crítico para muchas enfermedades autoinmunes humanas, incluida la DM1 (Singal & Blajchman, 1973; Nerup y col, 1974). Desde entonces, se han descubierto muchos loci de susceptibilidad, pero ninguno con una asociación tan fuerte como la región HLA (Concannon y col, 2009). En este contexto, los genes HLA de clase II son los que están más relacionados con DM1 (Farid y col, 1979; Owerbach y col, 1983; Thorsby & Ronningen, 1993; Todd y col, 1987; Undlien y col, 1997), existiendo tanto haplotipos que confieren protección frente a la enfermedad (DRB1\*1501-DQA1\*0102-DQB1\*0302) como haplotipos que confieren susceptibilidad (DR3/4-DQ8) (Erlich y col, 1993; Erlich y col, 2008). Sin embargo, sólo entre el 30 y 50% de los pacientes con DM1 tienen el haplotipo DR3/4-DQ8 y su presencia representa un 55% de riesgo para desarrollar la enfermedad antes de los 12 años. Por su parte, la presencia de genes HLA de clase I también se encuentra relacionada con la susceptibilidad a desarrollar DM1 (Fennessy y col, 1994; Lie y col, 1999; Nejentsev y col, 2007; Noble y col, 2002). Por ejemplo, la presencia del alelo HLA-B\*39 está relacionada con un diagnóstico más temprano de la enfermedad (Honeyman y col, 1995). Por otro lado, el locus IDDM2 que se encuentra en el cromosoma 11 y en el cual se alberga el gen de la insulina, también confiere susceptibilidad a la DM1 (Julier y col, 1991; Kennedy y col, 1995). Se ha descrito que existen polimorfismos repetidos en tándem en número variable en el promotor del gen de la insulina y que la susceptibilidad

a la enfermedad estaría relacionada directamente al mayor número de repeticiones de estos polimorfismos (Bennett y col, 1995; Lucassen y col, 1993). Finalmente, los genes *ctla-4*, *il2ra* y *ptpn22* también están asociados al riesgo de DM1, donde variaciones alélicas y polimorfismos afectan el normal funcionamiento de las proteínas que codifican estos genes, lo que finalmente se traduce en mecanismos alterados en los Linfocitos T, ya sea T reguladores, en el caso del gen *il2ra* o T efectores, en el caso de *ctla-4* y *ptpn22*. Esta alteración estaría favoreciendo el desarrollo del proceso de autoinmunidad que termina destruyendo la célula  $\beta$  pancreática (Bottini y col, 2006; Lowe y col, 2007; Nistico y col, 1996 ; Smyth y col, 2004; Ueda y col, 2003; Vella y col, 2005).

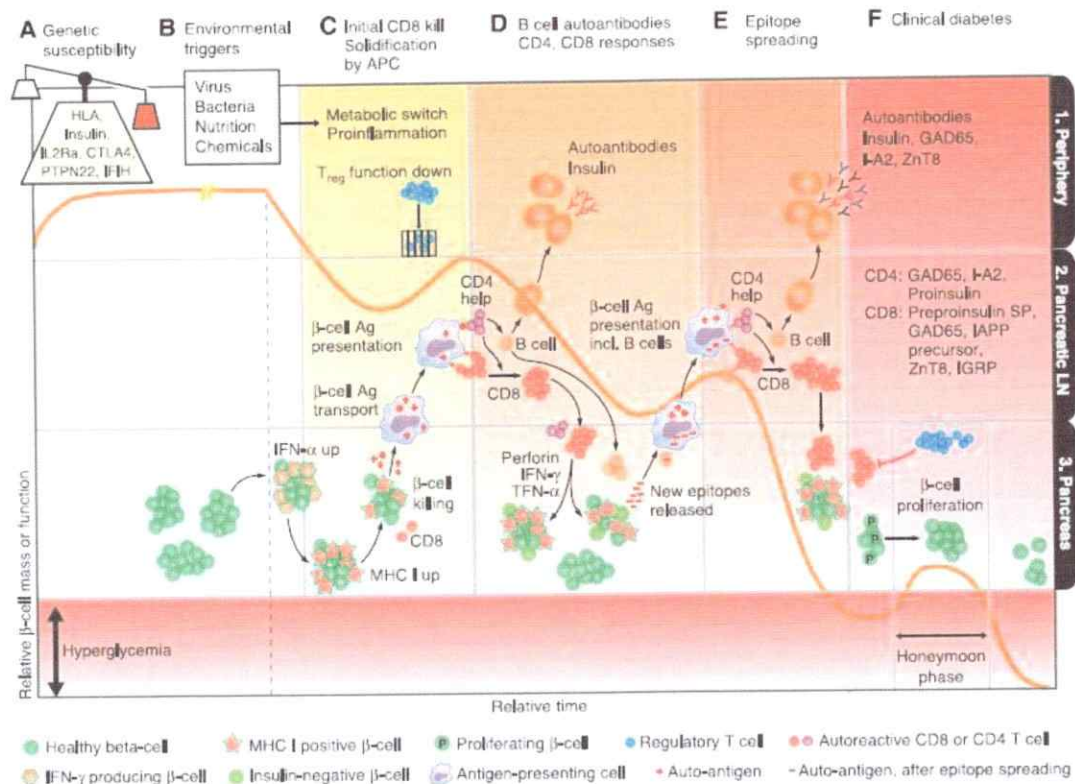
#### **IV.2. Factores ambientales**

Los factores genéticos mencionados, sin embargo, no son suficientes para gatillar el inicio de la enfermedad. Más aún, el aumento en la incidencia de DM1 observado en los últimos años se considera demasiado rápido como para poder atribuirlo completamente a la susceptibilidad genética (Pitkaniemi et al, 2004). En este ámbito, se han desarrollado diversos estudios en Australia, Europa y Estados Unidos donde se ha mostrado que la proporción de jóvenes con DM1 que portan el alelo de riesgo DR3/4 no ha cambiado en el tiempo, mientras que sí ha habido un gran cambio en el estilo de vida y factores ambientales que están posiblemente asociados con el riesgo de DM1, como la dieta, infecciones con patógenos a temprana edad, cambio climático, tasas de vacunación, etc, lo que daría cuenta de la importancia de los factores ambientales en el inicio y desarrollo de la enfermedad (Furlanos y col, 2008; Gillespie y col, 2004; Vehik y col, 2008).

### IV.3. Autoinmunidad y DM1

Se han propuesto muchos mecanismos para explicar el progreso de la DM1. Sin embargo el modelo de “disminución de la masa de las células  $\beta$ ”, propuesto por Eisenbarth en 1986, permanece como modelo de referencia para describir la enfermedad (Eisenbarth, 1986). De acuerdo a este modelo, los individuos genéticamente susceptibles en algún punto se encuentran con factores ambientales que gatillan la autoinmunidad sobre los islotes, generando un descenso lineal en la masa de células  $\beta$ , desarrollo de auto-anticuerpos, hiperglicemia y eventualmente una pérdida completa del péptido C. Muchos autores, sin embargo, sostienen que el progreso de la enfermedad no es un proceso lineal, si no que procede a ritmos variables, dependiendo del paciente (Chatenoud y Bluestone, 2007). De esta manera, como muestra la Figura 1, la concurrencia de susceptibilidad genética y uno o más factores ambientales, determinan que el individuo desarrolle diabetes. En el páncreas, las células  $\beta$  comienzan a producir interferón  $\alpha$  (INF-  $\alpha$ ) y subsecuentemente moléculas MHC de Clase I, que las deja expuestas al ataque de linfocitos T (LT) CD8 auto-reactivos. Posteriormente los antígenos de las células  $\beta$  liberados por la destrucción autoinmune son recogidos y transportados por células presentadoras de antígeno (CPA) hacia el linfonodo pancreático. Mientras tanto, en la periferia el factor ambiental gatillante ha generado un cambio metabólico que favorece un ambiente pro inflamatorio, donde la acción de los LT CD8 efectores se desarrolla por sobre la de los LT reguladores. Los antígenos de las células  $\beta$ , presentados en este contexto pro inflamatorio, en conjunto con los LT CD4 de ayuda favorecen la conversión de los Linfocitos B (LB) en células plasmáticas y por ende aparecen los primeros auto-anticuerpos, por ejemplo anticuerpos anti insulina. Por

su parte, los LT CD8 auto-reactivos son estimulados proliferando y migrando al páncreas, donde el estrés inducido por esta segunda ola de destrucción de células  $\beta$  (que incluye perforina, INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) provoca que algunas células  $\beta$  detengan la producción de insulina (proceso conocido como pseudoatrofia). La destrucción también provoca la liberación de nuevos antígenos de las células  $\beta$ , que son nuevamente capturados por CPA, incluyendo LB, y transportados nuevamente al linfonodo pancreático. Esto involucra nuevamente a los LT CD4 y CD8 y a los LB que generan un proceso denominado “difusión de epítomos”, observándose en este punto los auto anticuerpos característicos de la fase pre clínica de la enfermedad. Una nueva ola de destrucción de células  $\beta$  es por ello más severa y generalmente resulta en una notoria reducción de función y masa de las células  $\beta$  pancreáticas, momento en el cual es diagnosticada clínicamente la enfermedad. Sorprendentemente, la inflamación autoinmune puede también estimular algunas células  $\beta$  a proliferar, por lo que la masa celular puede restablecerse temporalmente y nuevamente producir insulina (fase conocida como “luna de miel”). También, los LT reguladores pueden a veces ser capaces de amortiguar la respuesta efectora, por lo que la fluctuación entre la respuesta auto-reactiva destructiva y la mitigación del daño por la respuesta inmune y la proliferación de las células  $\beta$  posiblemente genera un perfil constante de “recaída y remisión” de la masa de células  $\beta$  (Van Belle y col, 2011).



**Figura 1. Línea de tiempo del proceso autoinmune que se desarrolla en la DM1 (Van Belle y col, 2011).** Proceso autoinmune llevado a cabo durante la DM1, modelo propuesto por Van Belle y colaboradores. Se describen los principales linajes celulares involucrados, que incluye LT CD4+ y LT CD8+, también LT reguladores, LB y células presentadoras de antígenos. La línea naranja indica la masa de células  $\beta$  pancreáticas, la disminución observada se ha descrito como un modelo de “recaída y remisión” ya que como puede observarse pareciera haber una recuperación de la masa celular cada ciertos lapsos de tiempo, volviendo posteriormente a disminuir. La última fase de remisión, que ocurre después del diagnóstico clínico de la enfermedad, se conoce como “luna de miel” (honeymoon) y ha sido ampliamente estudiada como blanco terapéutico de la enfermedad. (Extraído de Van Belle y col, 2011).

#### **IV.4. Diabetes y apoptosis**

Los fenómenos de apoptosis están muy relacionados con la diabetes, partiendo por los mecanismos por los cuales ocurre la destrucción de la célula  $\beta$ . La destrucción apoptótica de las células  $\beta$  pancreáticas está involucrada tanto en la etiología de la DM1 como de la DM2. Las señales que desencadenan la apoptosis pueden provenir ya sea de altas concentraciones de citoquinas inflamatorias, como TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$  e IL-6; o de la presencia y acción de LT en el microambiente de los islotes (Riboulet-Chavey y col, 2008). Por otro lado, se ha descrito que la glucosa es capaz de inducir la apoptosis de las células  $\beta$  mediante la estimulación que ejerce sobre éstas mismas para que produzcan autocrinamente IL-1  $\beta$ , lo que lleva a que aumente la expresión de Fas en la superficie y por lo tanto ocurra apoptosis (Maedler y col, 2002).

La muerte celular es un proceso fisiológico necesario tanto para el desarrollo normal, así como para la existencia de los organismos multicelulares. Se caracteriza por un cambio morfológico de la célula, condensación de la cromatina, fraccionamiento del ADN y una posterior fragmentación celular, en los llamados cuerpos apoptóticos (Korsmeyer y col, 1995). Los cuerpos apoptóticos son capturados por fagocitos, como por ejemplo las células epiteliales adyacentes, y debido a que conservan su contenido hasta que ocurre la fagocitosis no provocan una respuesta inflamatoria (Savill y col 1989; Arends y Wyllie, 1991). La apoptosis ocurre en todos los tejidos donde existe proliferación y es un proceso controlado, en parte, por genes que participan en el ciclo celular. La estrecha relación entre el control de la apoptosis y la proliferación celular significa que una alteración en alguno de estos dos mecanismos probablemente da lugar a una modificación del número de células. De hecho, algunos genes involucrados en la

inducción de la apoptosis, como *p53*, se conocen como clásicos genes supresores de tumores (Clarke y col, 1995), mientras que otros que previenen la apoptosis e incrementan la proliferación celular, como *bcl2*, son oncogenes clásicos (Tsujimoto y col, 1985). La apoptosis se diferencia de la necrosis en que esta última ocurre de manera accidental, cuando la célula pierde la capacidad de mantenerse con vida, por tanto el resto de los procesos vitales se desacoplan de la respiración, se pierde la energía y finalmente hay muerte celular de forma incontrolada. Esta destrucción de la célula provoca la pérdida del contenido celular interno, entre otras cosas, moléculas reactivas y enzimas activas; la liberación de éstas al intersticio representa un potente estímulo para que ocurra una inflamación aguda que lleva a un daño tisular adicional (Golstein y Kroemer, 2007).

#### **IV.5. Mecanismos de apoptosis**

Todas las vías de apoptosis convergen en la activación de caspasas, las cuales son proteínas cisteín aspartato proteasas que coordinan la destrucción de las células destinadas a morir. Sin embargo, existen diferentes mecanismos de acción por los cuales ocurre la muerte celular programada y para distinguirlos se puede hacer uso de dos criterios que permiten diferenciar las principales vías. El primero, es si se requiere o no la acción de proteínas de la familia BCL-2 (B-cell lymphoma-2) y el segundo, es determinar las caspasas cruciales para que el mecanismo se lleve a cabo. De esta manera podemos distinguir dos vías (Figura 2): la intrínseca, que sí requiere a la familia de proteínas BCL-2 y utiliza a CAS 9 como mediador; y la extrínseca que no requiere a las proteínas BCL-2 y utiliza a CAS 8 como mediador (Youle y Strasser, 2008).



- **Vía intrínseca o mitocondrial**

Es activada por gran variedad de señales, como infecciones virales, daño en el ADN, ausencia de factores de crecimiento, activación del TCR, estrés del retículo, hormonas como glucocorticoides y ausencia de citoquinas. Esta vía es estrictamente controlada por las proteínas de la familia BCL-2 y conduce a la activación de caspasa 9. Sin embargo, se ha visto que por lo menos en algunos tipos de células la vía intrínseca puede proceder en ausencia de caspasa 9 o de su activador APAF1 (apoptotic protease-activating factor-1) (Hakem y col, 1998; Marsden y col, 2002).

Las proteínas de la familia BCL-2 se dividen en tres grupos: i) proteínas que promueven apoptosis a través de la generación de poros en la membrana externa mitocondrial, donde se encuentran las proteínas BAX, BAK y BOK; ii) proteínas que inhiben apoptosis a través de la inhibición de las proteínas descritas anteriormente, donde se encuentran BCL-2 propiamente tal y BCL-XL, entre otras; y iii) un último grupo que se denominan proteínas sólo BH3, ya que comparten sólo el dominio BH3 de homología con el resto de los miembros de la familia. Dentro de las proteínas sólo BH3 se encuentran BID, BAD y BIK, que se caracterizan por regular a las proteínas anti apoptóticas de la familia BCL-2 y promover apoptosis (Youle y Strasser, 2008). Cuando la célula es expuesta a un estímulo como ausencia de factores de crecimiento, estrés, exposición a virus o a luz UV, se activan las proteínas sólo BH3 que inhiben a las proteínas anti apoptóticas BCL-2 y BCL-XL, esta inhibición de los inhibidores genera la activación de BAX y BAK. Las proteínas BAX y BAK son capaces de generar poros en la membrana externa de la mitocondria (Chipuk y col, 2006), proceso conocido como

“permeabilización de la membrana externa mitocondrial” (MOMP, por sus siglas en inglés). Esto induce la liberación hacia el citosol de proteínas que se encuentran en el espacio entre la membranas interna y externa mitocondrial, como por ejemplo citocromo c y DIABLO (Newmeyer y Ferguson-Miller, 2003). Una vez que éstas proteínas salen hacia el citosol, BAX y BAK inducen a la mitocondria a fragmentarse en numerosas unidades más pequeñas (Martinou y Youle, 2006), al tiempo que citocromo c se une a la proteína APAF1 formando un anillo proteico heptamérico denominado apoptosoma. Este último, se une a pro-caspasa 9 induciendo su activación mediante un cambio conformacional. Una vez que caspasa 9 se activa, es capaz de inducir a las caspasas efectoras 3,6 y 7 que son las que finalmente desencadenan la destrucción de la célula por diversos mecanismos, como por ejemplo directamente clivando una serie de sustratos, como proteínas del citoesqueleto; o activando las ADNasas que fragmentan el ADN (Shi, 2006; Wang, 2001). Las células que están muriendo expresan en su superficie señales de muerte, como fosfatidil serina y diferentes azúcares, éstas señales son reconocidas por fagocitos que son los que finalmente remueven las células apoptóticas (Thornberry y Lazebnik, 1998).

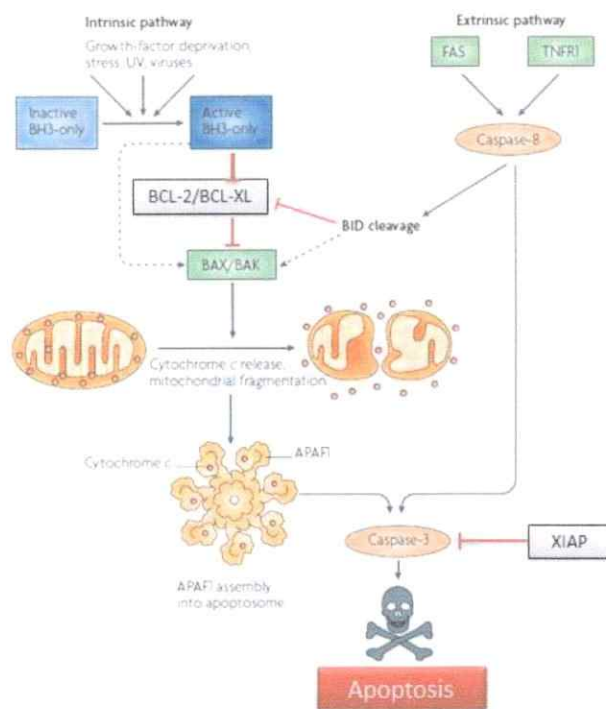
- **Vía independiente de APAF1 y caspasa 9**

Además de este proceso, es posible que algunas células, como los linfocitos utilicen otro sistema de activación de caspasas y muerte celular, independiente de APAF1 y caspasa 9, pero dependiente de las proteínas de la familia BCL-2, ya que sorprendentemente la activación de caspasas en los linfocitos puede ser amplificada por APAF1, incluso cuando esta proteína no ha sido incorporada al apoptosoma (Hao y col, 2005). Una de

las vías de activación de caspasas independientes de APAF1 es la que involucra a las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs por sus siglas en inglés), como XIAP. Estas proteínas se unen e inactivan algunas caspasas como caspasa 9, 3 y 7, lo que genera una detención en el proceso de apoptosis. La inactivación de las caspasas puede ser antagonizada por la unión de DIABLO, mencionada anteriormente como una de las proteínas que se liberan hacia el citosol luego del proceso de MOMP. Si DIABLO se une a caspasa 9 o 3 genera el efecto contrario a XIAP, es decir, promueve la activación directa de estas caspasas (Okada y col, 2002; Harlin y col, 2001).

- **Vía extrínseca o de receptores de muerte**

Esta vía se desencadena tras la unión de un ligando a los llamados receptores de muerte, que son aquellos pertenecientes a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral, como FAS o TNFR1. Estos receptores contienen un dominio intracelular llamado “dominio de muerte”, el cual puede reclutar y activar a caspasa 8 a través de la proteína adaptadora FADD. El reclutamiento de caspasa 8 genera la activación de muchas caspasas efectoras, tales como caspasa 3, 6 o 7, sin participación alguna de proteínas de la familia de BCL-2 (Scaffidi y col, 1998). En algunas células, como los hepatocitos, la vía extrínseca puede intersectar la vía intrínseca a través de la proteína pro apoptótica BID. Esta proteína puede ser clivada por caspasa 8 generando una proteína trunca denominada t-BID que es capaz de translocarse hasta la mitocondria y promover la activación de caspasas a través de la vía intrínseca. En estos casos una disminución en la expresión de BID o una sobreexpresión de la proteína anti apoptótica BCL-XL inhiben la muerte celular (Yin y col, 1999; Kaufmann y col, 2007).



**Figura 2. Principales mecanismos de apoptosis. (Youle y Strasser, 2008).** Se pueden distinguir dos vías principales de apoptosis, la intrínseca y la extrínseca. La vía extrínseca involucra los denominados receptores de muerte, dentro de los cuales se encuentra FAS y TNFR1. Esta vía genera la activación de caspasa 8 y ocurre en ausencia de proteínas de la familia BCL-2. La vía intrínseca, por su parte, se inicia con una serie de factores ambientales que generan la activación de proteínas de la familia BCL-2, las que son capaces de permeabilizar la membrana externa mitocondrial, generando la salida de diversas proteínas hacia el citosol, que junto a otras proteínas citosólicas, forman un complejo proteico denominado apoptosoma. Este último, a través de un cambio conformacional, es capaz de activar a caspasa 9. Finalmente, ambas vías convergen en la activación de caspasa 3, 6 y 7 que actúan como efectores finales, clivando una serie de sustratos vitales para la sobrevivencia celular. (Modificado de Youle y Strasser, 2008).

#### **IV.6. Apoptosis en células T**

En el sistema inmune, tanto la respuesta central como la tolerancia periférica participan activamente en la regulación frente a los auto-antígenos (Miller y Flavell, 1994). En el timo se produce la eliminación de LT potencialmente auto-reactivos y se ha descrito que esta eliminación ocurre por mecanismos de apoptosis (Sprent y Kishimoto, 2002). Sin embargo, este proceso no es perfecto y algunos LT autorreactivos escapan a la tolerancia central y deben ser controlados por mecanismos de tolerancia periférica (Lohmann y col, 1996; Van Noort y col, 1993). En la periferia los LT pueden morir por apoptosis a través de la vía intrínseca o extrínseca, o por mecanismos independientes de caspasas, como la activación de catepsinas que se encuentran en el lisosoma (Arnold y col, 2006; Kroemer y Jaattela; 2005). La muerte celular autónoma ocurre en ausencia de las señales de supervivencia adecuadas y es conocida como muerte por ausencia de citoquinas o muerte autónoma de células activadas (ACAD, por su nombre en inglés) (Hildeman y col, 2002). Por otro lado, la reestimulación del TCR en células que ya se habían expandido y en ausencia de la apropiada co-estimulación también puede generar la inducción de muerte celular, en este caso conocida como muerte celular inducida por activación (AICD, por su nombre en inglés) (Krammer, 2000). Cuando los mecanismos de tolerancia periférica fallan, es cuando se producen la autoinmunidad que puede desencadenar enfermedades autoinmunes graves como la DM1, esclerosis múltiple, lupus, entre otras (Fife y Bluestone, 2008).

Por otra parte, la apoptosis en los LT es un proceso que juega un rol fundamental en la retracción de la respuesta inmune, luego de que el sistema inmune ha actuado. Cuando los LT son estimulados a través del TCR junto con las moléculas y señales de co-

estimulación adecuadas, las células son inducidas a proliferar y de este modo son capaces de ejercer su acción efectora, sin embargo, una vez que se ha erradicado el antígeno invasor, es necesario que los LT no sigan actuando, lo que se logra debido a que se activan mecanismos apoptóticos, principalmente a través de AICD mediada por FAS, que inducen la muerte celular controlando de esta forma la población de linfocitos (Ryan y col, 2008; Ju y col, 1995; Maher y col, 2002). Una vez que las células que fueron expuestas al antígeno son eliminadas, sólo una pequeña porción permanece, convirtiéndose en LT de memoria. Estos linfocitos, son células especializadas que responderán rápidamente a futuras exposiciones al mismo antígeno y son resistentes a la muerte mediante apoptosis (Krueger y col, 2003).

Diferentes estudios han reportado la existencia de alteraciones en la apoptosis de los LT periféricos en sujetos que poseen alguna enfermedad autoinmune (Lorenz y col, 2000; Ravirajan y col, 1999). Mutaciones en el gen *fas* generan una modificación en la apoptosis mediada por FAS, proliferación linfática y desarrollo de enfermedades autoinmunes como anemia hemolítica y trombocitopenia (Holzelova y col, 2004). Se ha observado que en individuos con esclerosis múltiple existe resistencia a AICD en los LT periféricos y que ésta resistencia estaría asociada con una sobreexpresión de la proteína inhibitoria de apoptosis FLIP (Semra y col, 2001), como también con un aumento de la expresión de las IAPs (Semra y col, 2002). También, en personas afectadas con tiroiditis de Hashimoto, puede ocurrir resistencia a apoptosis mediada por Fas en los linfocitos T periféricos, en parte como consecuencia de una actividad defectuosa de caspasa 8 y/o 9 (Bona y col, 2003). Finalmente, también en DM1 se ha descrito que los LT de sangre

periférica presentan una expresión reducida de caspasa 3 y que esto contribuye al desarrollo de resistencia a AICD en estas células (Vendrame y col, 2005).

De acuerdo a lo anterior surge la interrogante acerca de si los mecanismos descritos están ocurriendo de igual modo en pacientes chilenos con DM1. El propósito de este estudio fue, por lo tanto, realizar un perfil de expresión génica de proteínas relacionadas con apoptosis, en un modelo de células mononucleares periféricas de pacientes con DM1 de la región metropolitana de Santiago. Se midió expresión tanto de *caspasa 3*, como de otros genes que codifican proteínas apoptóticas que hasta el momento no han sido descritas en DM1, tales como XIAP, BCL-2, BCL-XL, FAS Y BAX. Con el objetivo de simular el estado de hiperglicemia presente durante el debut de la enfermedad, el modelo de células mononucleares fue sometido a estímulos crecientes de glucosa y se evaluó su efecto en la expresión de los genes mencionados.

## **V. HIPOTESIS DEL TRABAJO**

Las células mononucleares periféricas de los pacientes con DM1 poseen sus mecanismos apoptóticos alterados, existiendo un desbalance a nivel de expresión génica que se traduce en una resistencia a la muerte celular programada a nivel periférico.

### **V.1. OBJETIVOS GENERALES**

1. Cuantificar y analizar la expresión de marcadores de apoptosis en células mononucleares periféricas de pacientes con DM1 y en sujetos controles y evaluar su posible asociación con su patrón de inmunidad y la severidad clínica de la enfermedad.

### **V.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Cuantificar la expresión de tres genes pro- apoptóticos: *cas3*, *fas*, *bax* y de tres genes anti- apoptóticos: *bcl-xL*, *bcl2* y *xiap* en sujetos controles y pacientes con DM1.
2. Analizar el efecto de glucosa en la expresión de los genes de interés.
3. Determinar el perfil de anticuerpos de los pacientes y controles.
4. Correlacionar los perfiles de expresión con las características autoinmunes y el historial clínico de la enfermedad en cada paciente con DM1.



## **VI. MATERIALES Y METODOS**

### **VI.1. Participantes del estudio**

En este estudio participaron 30 niños con DM1 de la Región Metropolitana en un rango de edad de 4 - 19 años provenientes del Instituto de investigaciones materno infantil (Idimi) del Hospital San Borja Arriarán. El diagnóstico de DM1 fue realizado en base al criterio utilizado por la Asociación Americana de Diabetes (ADA). En todos los casos se aplicó una encuesta que recopiló los antecedentes médicos familiares y clínicos del paciente. Además se utilizaron 32 muestras de personas sanas (grupo control) cuyo rango de edad fue 20-45 años.

### **VI.2. Toma de muestras**

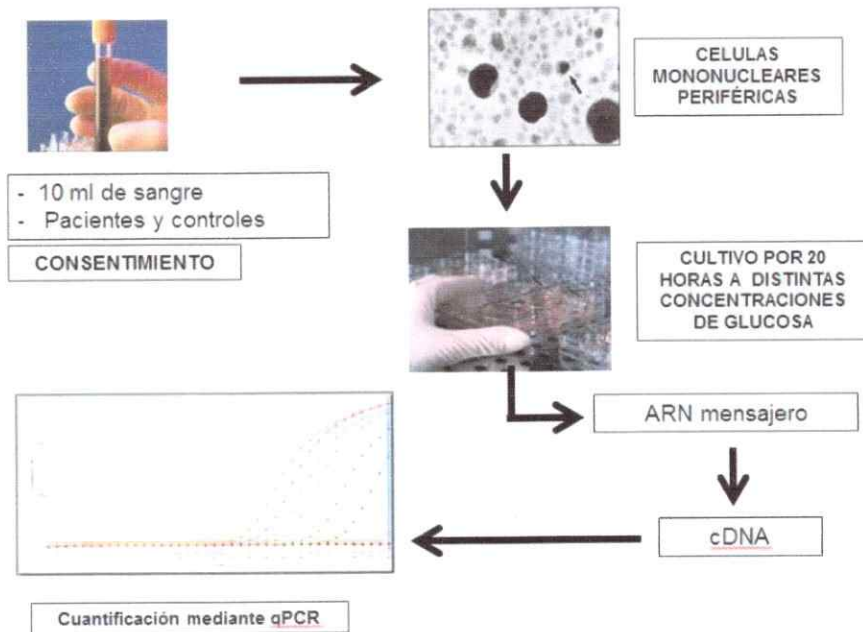
Las muestras de sangre de los niños con DM1 fueron colectadas en el centro hospitalario, previa firma de consentimiento informado por los padres de los niños menores de 10 años y/o firma de consentimiento informado por parte de los niños mayores de 10 años. Las muestras de sangre del grupo control fueron colectadas tanto en el Departamento de Nutrición en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile como en el Laboratorio de Microminerales del Instituto de Nutrición y Tecnología de los alimentos (INTA), de igual modo previa firma de consentimiento informado. En todos los casos se colectó una muestra de 10mL de sangre mediante punción venosa con jeringa heparinizada.

### **VI.3. Extracción de células mononucleares**

Los 10mL de sangre extraída se diluyeron con Buffer fosfato salino (PBS) en una proporción de 1:1 para facilitar el manejo de la muestra. Posteriormente, se obtuvieron las células mononucleares periféricas por sedimentación en gradiente de Ficoll (Lymphocyte Separation Medium, densidad 1,077 g/mL, Cellgro) mediante centrifugación durante 30 minutos a 1840 rpm y 4°C. La fracción de mononucleares se lavó dos veces con PBS, centrifugando 10 minutos a 2400 rpm cada vez. Finalmente las células rescatadas fueron resuspendidas en medio RPMI-1640 y contadas utilizando azul tripán en una cámara de Neubauer.

### **VI.4. Cultivo de mononucleares**

Las células mononucleares periféricas fueron incubadas a 37°C en una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub>, en placas Petri de 6 pocillos con medio de cultivo RPMI-1640 sin glucosa, 5% de suero fetal bovino al 5% inactivado y antibióticos. Las células provenientes de cada paciente o control fueron expuestas en duplicado a 198, 792 y 1566 mg/dL de glucosa por 20 horas. La recuperación de las células se realizó mediante la recolección y centrifugación del medio de cultivo a 3000 rpm por 5 min y un tratamiento suave con tripsina-EDTA a 37°C por 5 minutos para las células adheridas. Finalmente la población de células fue lavada exhaustivamente en PBS y preservada a -80°C en TRIZOL (Invitrogen) para su posterior extracción de ARN (Ver Figura 3 con esquema del diseño experimental).



**Figura 3. Modelo experimental usado en el estudio.** Se colectan 10mL de sangre periférica de pacientes con DM1 y controles y se extraen las células mononucleares periféricas. Las células son cultivadas por 20 horas a diferentes concentraciones de glucosa. Posteriormente se extrae el ARN mensajero y se sintetiza ADNc que se utiliza para las reacciones de PCR.

#### VI.5. Extracción de ARN y síntesis de ADNc

La extracción de ARN total se realizó con el método de TRIZOL® (Invitrogen), según las indicaciones del fabricante. Se verificó su integridad en un gel de agarosa al 1.5% en presencia de bromuro de etidio y además se midió la razón entre la densidad óptica (DO) a 260 nm y 280 nm, obteniéndose un promedio de  $DO_{260/280}$  de 1,8 para los pacientes y de 1,9 para los controles. Se cuantificó el ARN haciendo uso de un Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) y se sintetizó ADNc de hebra simple a partir de

300ng de ARN en cada muestra, utilizando el Kit Promega (ImProm-IITM Reverse Transcriptase, Promega corporation, Madison, USA) con 1  $\mu$ L de oligo-dT como partidor y magnesio a una concentración final de 3 mM en 20  $\mu$ L de reacción total. Como control de integridad de las muestras de ADNc, fue amplificada  $\beta$ -actina con los partidores Fw 5'ATTGCCGACAGGATGCAGAA3' y Rv 5'AAGCATTGCGGAGGACGAT 3'.

#### VI.6. Diseño, selección y prueba de partidores

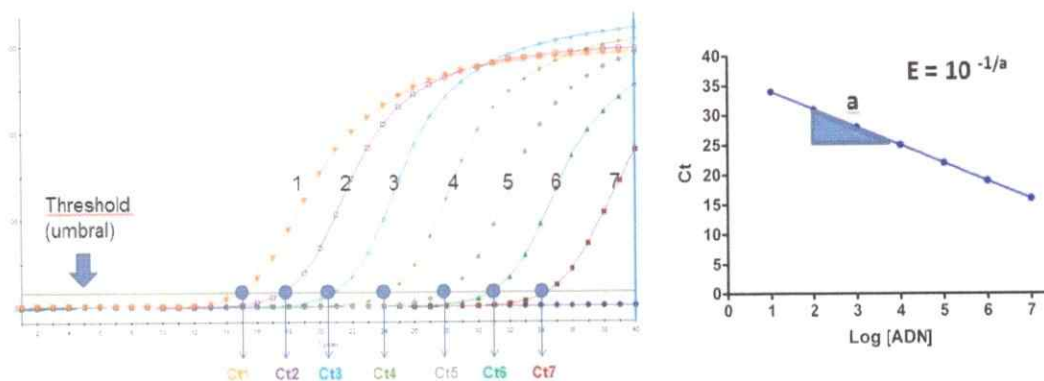
La cuantificación de la expresión de los genes anti apoptóticos *bcl-2*, *bcl-xL*, *xiap* y pro apoptóticos *fas*, *cas3* y *bax*, se realizó mediante qPCR en un equipo Agilent Mx3005P (Agilent Technologies). La modalidad utilizada fue cuantificación relativa, para lo cual se comparó la expresión de los genes en cada paciente con la expresión de los genes en el grupo control. También fue necesario utilizar tres genes como control endógeno de expresión; los seleccionados fueron  $\beta$  *act*, *b2m* y *hprt1*. Los partidores para cada gen fueron diseñados con el programa AmplifX.1.5.4 y se detallan en la Tabla 1, a continuación.

**Tabla 1. Secuencias de partidores utilizados en el estudio.**

Nombre	Partidor Forward*	Partidor Reverse*
<i>β act</i>	5' attgccgacaggatgcagaa 3'	5' aagcatttggaggagacgat 3'
<i>b2m</i>	5' gatgccgcatttggattgga 3'	5' tggagcaacctgctcagata 3'
<i>hpri1</i>	5' tctgtggccatctgcttagt 3'	5' aacaatccgccc aaagggaa 3'
<i>bcl-2</i>	5' ttgagttcgggtgggtcat 3'	5' cgtacagttccacaaaggca 3'
<i>bcl-xl</i>	5' ttcagtgcctgacatccca 3'	5' tgcgatccgactcaccaata 3'
<i>xiap</i>	5' ttgagaactgggcaggtgtg 3'	5' cactgcacttggtcaccaat 3'
<i>fas</i>	5' gcccaagtgcctgacatcaa 3'	5' actgtgcagtccttagcttt 3'
<i>cas3</i>	5' atactccacagcacctggtt 3'	5' tctgttgcaccttccggtt 3'
<i>bax</i>	5' tgcctcagggtttcatccag 3'	5' tgcagctccatgttactgtc 3'

\* Todos los partidores fueron diseñados haciendo uso del programa AmplifX.1.5.4.

Para realizar cuantificación relativa con el método seleccionado es necesario corroborar la eficiencia de amplificación de cada par de partidores, para lo cual se hicieron siete diluciones seriadas de un pool de ADNc de pacientes y controles. Este pool de ADNc y sus respectivas diluciones se utilizó como templado para las reacciones de qPCR. El equipo posteriormente es capaz de calcular la eficiencia (E) de amplificación de los partidores a partir de la curva generada con los valores de expresión de cada dilución de acuerdo a la ecuación  $E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$  (Figura 4).



**Figura 4. Cálculo de la eficiencia de reacción de cada par de partidores utilizado.** A partir de un pool de ADNc (1) se realizan diluciones seriadas (2-7) con cada una de las cuales se hace una reacción de PCR distinta, obteniendo un conjunto de curvas cada una con un Ct distinto. El Ct es el punto, medido en número de ciclos de la reacción de PCR, en el cual la fluorescencia de la muestra se hace significativa frente al ruido de fondo y cruza una línea denominada umbral. La palabra Ct viene del inglés *cycle threshold*, es decir el ciclo en el cual se cruza el umbral. Los valores de Ct son inversamente proporcionales a la cantidad de ADN en la muestra. Posteriormente, se calcula la eficiencia (E) de la reacción a partir de la pendiente (a) de la curva generada con los valores de Ct (B) y la ecuación  $E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$ .

#### VI.7. Cuantificación de la expresión génica

Se midió la expresión de los genes de interés en cada paciente, al igual que en el grupo control. Los valores de expresión génica se expresan en Ct, siendo el Ct el punto en el que la fluorescencia se eleva significativamente sobre la fluorescencia basal, posteriormente se compararon los Ct de los genes en los pacientes con los Ct de los genes en los controles. La reacción de qPCR fue llevada a cabo en un volumen total de 20  $\mu\text{L}$  de los cuales 2  $\mu\text{L}$  corresponden a ADNc sintetizado a partir de 300 ng de ARN, 10  $\mu\text{L}$  al master mix que contiene Sybr Green II (Stratagene),  $\text{MgCl}_2$ , dNTPs, la enzima polimerasa y sus cofactores; 1  $\mu\text{L}$  del stock de partidores 5  $\mu\text{M}$  (250 nM) y 7  $\mu\text{L}$  de agua

libre de nucleasas. En todos los casos el equipo fue programado de la siguiente manera: 10 minutos de denaturación inicial y activación de la enzima a 95°C, seguido de 40 ciclos compuestos de 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 60°C para el “annealing” y 15 segundos a 72°C para la elongación. Posteriormente para la curva de “melting” se utilizó 5 segundos a 95°C, 1 segundo a 25°C, 15 segundos a 70°C y un segundo a 95°C. Se fijaron dos puntos de medición de la fluorescencia: en la etapa de elongación de cada ciclo y en la fase final de la curva de “melting”.

#### **VI.8. Análisis de los resultados de qPCR**

Se utilizó la Ecuación de Pfaffl (Ecuación 1) para obtener las razones de amplificación de cada gen. Esta ecuación compara los Ct de cada paciente con los Ct del grupo control y lo normaliza con los valores de expresión de los genes de referencia, usados como control endógeno. Esta ecuación, a diferencia de la ecuación del  $\Delta\Delta Ct$ , que es la más usada en los análisis de qPCR, toma en cuenta el porcentaje de eficiencia de la reacción de PCR lo que aumenta la exactitud de los resultados (Pfaffl, 2001). Se obtiene un valor denominado Razón de expresión, el cual si es mayor que 1 indica que hay un aumento en la expresión del gen en estudio con respecto al grupo control, mientras que si es menor que 1 indica que hay una disminución en la expresión del gen en estudio con respecto al grupo control, un análisis estadístico posterior indicará si el cambio es significativo o no. Cabe mencionar que tras la utilización de esta ecuación para el análisis de los datos se obtiene un valor único (Razón de expresión). Este indicador incluye los Ct tanto de pacientes como controles, como se puede ver en la Ecuación 1,

por lo tanto ya no se tendrán datos únicos de pacientes o datos únicos de controles, sino un solo valor que relaciona a ambos.

#### Ecuación 1. Ecuación de Pfaffl.

$$R = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta Ct_{\text{target}}(\text{control}-\text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta Ct_{\text{ref}}(\text{control}-\text{sample})}}$$

Esta ecuación fue utilizada para calcular las razones de amplificación de cada gen a través del programa REST ©. *E* indica eficiencia de los partidores, “target” es el gen en estudio, “ref” es el gen de referencia o control endógeno; “sample” en este caso son los Ct de los pacientes con DM1 y “control” los de los controles sanos.

### VI.9. Análisis serológico

Se midieron los anticuerpos anti-GAD65 y anti-IA2 (característicos de DM1) y también el anticuerpo anti transglutaminasa, característico de celíacos, mediante inmunoensayo enzimático (ELISA) con el uso de kits comerciales de la marca MedizymR (Berlín, Alemania). Los inmunoensayos, están basados en la habilidad de los anticuerpos de formar un puente entre el antígeno respectivo unido a la placa de ELISA (GAD65, IA2 y TTG) y un segundo anticuerpo biotinilado. La unión de este segundo anticuerpo se correlaciona con la cantidad de anticuerpo a determinar presente en el suero estudiado, siendo cuantificado mediante la adición de streptavidina-peroxidasa más un sustrato (3,3',5,5'-tetrametilbencidina; TMB utilizado como cromóforo). Una vez incubada, durante los 120 minutos indicados por el fabricante, la placa fue leída en un lector óptico ASYS Hitech GmbH (Austria) a 450 nm y a 620 nm a modo de control. 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 para TTG. Aquellas muestras con un título mayor o igual a dicho valor fueron consideradas “muestras positivas” o con presencia del anticuerpo en cuestión.

#### **VI.10. Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se utilizó en primera instancia el programa REST<sup>®</sup> (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 (randomisation test). 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 cálculos posteriores se realizaron con los programas SPSS-software package 15.0.1 (SPSS Inc, Chicago, IL) y GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc. San Diego CA, USA). Para comenzar, en SPSS 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 en GraphPad haciendo uso del test Kruskal –Wallis, donde se graficaron la mediana y el rango intercuartílico de los datos. Para determinar la relación entre expresión y antecedentes clínicos se utilizó un test de correlación bivariada. Finalmente, para determinar la relación entre expresión y presencia de cetoacidosis al momento del debut y presencia de auto-anticuerpos en el suero, se utilizó un test de Mann-Whitney. En todos los casos se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0,05$ .

## VII. RESULTADOS

### VII.1. Integridad de las muestras de ARN y ADNc

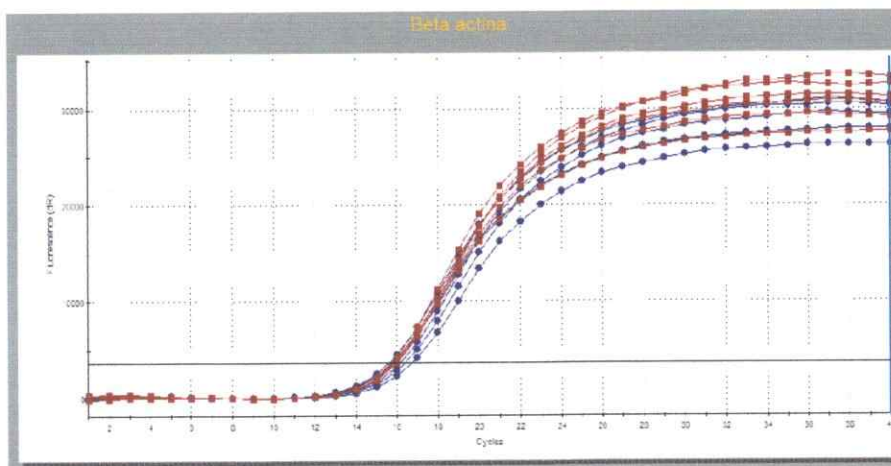
La integridad y calidad de las muestras de ARN fue confirmada midiendo la razón de absorbancia a 260/280 nm de todas las muestras. Los valores fueron obtenidos haciendo uso de un Nanodrop que permite cuantificar en forma exacta estos parámetros. La integridad de las muestras de ADNc, por su parte, también se comprobó mediante un gel de agarosa al 1,5%, luego de hacer una reacción de PCR utilizando partidores de actina como control (Figura 5). Se observa una banda única que da cuenta, en primer lugar, de la calidad de los partidores y de la ausencia de ADN genómico remanente de la extracción de ARN.



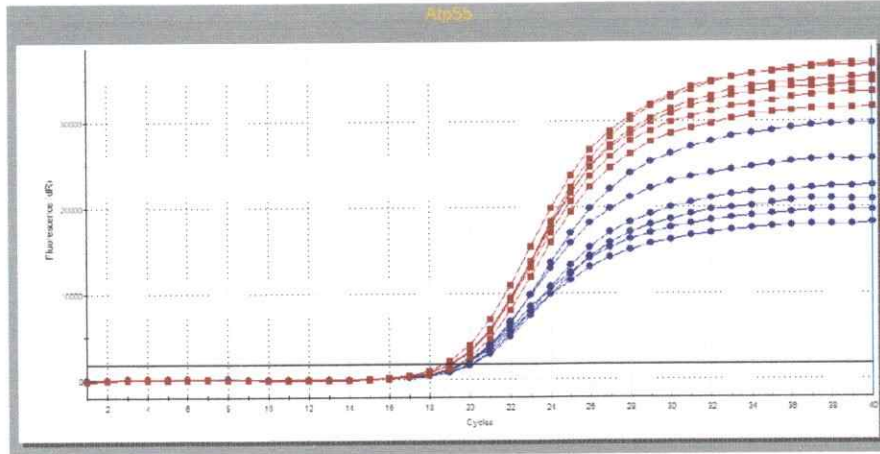
**Figura 5. Gel de integridad de ADNc.** Gel de agarosa al 1,5% que muestra el resultado de una PCR convencional con partidores de actina para corroborar la integridad del cADN sintetizado.

## VII.2. Selección de genes endógenos

Para seleccionar los genes endógenos óptimos para este estudio fue necesario probar siete pares de partidores utilizados comúnmente en qPCR. Con este objetivo se realizaron PCRs de pacientes y controles en todas las condiciones experimentales con cada par de partidores y se seleccionó aquellos en los que la variación en expresión observada entre pacientes y controles fuera menor. De este modo, se seleccionaron como controles endógenos  $\beta$ -actina, *b2m* y *hprt1* y se descartaron *ubc*, *atp5b*, *gapdh* y *ppib*. En la Figura 6 se muestran como ejemplo las curvas de amplificación de  $\beta$ -actina, que sí fue seleccionado y en la Figura 7 la curva de amplificación de *atp5b*, que no lo fue.



**Figura 6. Curvas de amplificación de  $\beta$ -actina.** Curvas de amplificación de una reacción de qPCR utilizando ADNc proveniente de pacientes (cuadros) y controles (círculos). Se observa que las curvas de pacientes y controles se superponen sin observarse una diferencia clara entre ambos grupos, que es lo esperado para un gen que será utilizado como control endógeno, por lo cual  $\beta$ -actina sí fue seleccionado.



**Figura 7. Curvas de amplificación de *atp5b*.** Curvas de amplificación de una reacción de qPCR utilizando ADNc proveniente de pacientes (cuadros) y controles (círculos). Se observa que las curvas de pacientes y controles no se sobreponen y se observa una clara diferencia entre ambos grupos, que no es lo esperado para un gen que será utilizado como control endógeno, por lo cual *atp5b* no fue seleccionado.

Pese a que al inicio del estudio se seleccionaron tres genes como controles endógenos, al momento de analizar los datos sólo se utilizaron dos:  $\beta$ -actina y *b2m*, el gen *hprt1* fue descartado debido a que sus valores de expresión diferían mucho con  $\beta$ -actina y *b2m*, por lo cual los resultados en vez de homogenizarse, se dispersaban.

### VII.3. Eficiencias de amplificación de los partidores utilizados.

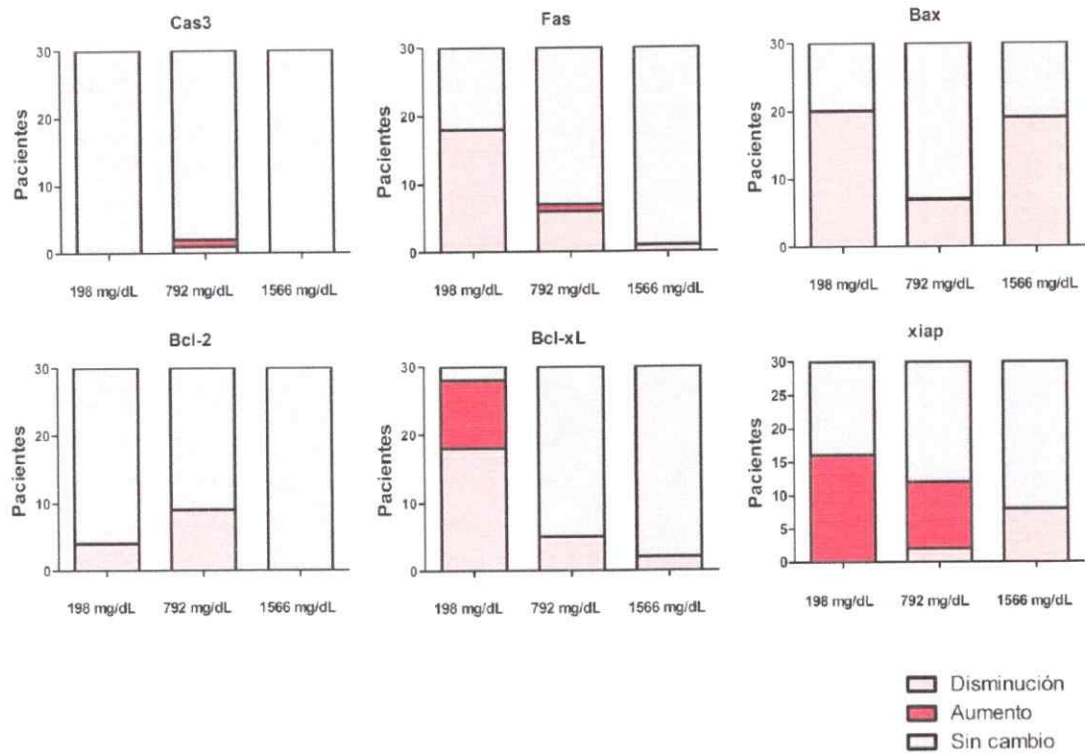
El primer paso al momento de realizar cuantificación relativa con PCR en tiempo real es determinar la eficiencia de los partidores que se utilizan, debido a que este valor es necesario posteriormente al momento de calcular la razón de expresión. El procedimiento para determinar la eficiencia se detalló en la Figura 2. La tabla 2, por su parte, muestra los valores de eficiencia calculados para cada par de partidores.

**Tabla 2. Valores de eficiencia de los partidores utilizados en el estudio.**

<b>Partidores</b>	<b>Eficiencia (%)</b>
$\beta$ act	102,0
B2m	94,6
Hprt1	93,1
Bcl2	95,1
Bcl-xL	102,6
Xiap	92,7
Fas	90,2
Cas3	90,5
Bax	98,0

#### **VII.4. Cuantificación de la expresión génica. Análisis individual.**

Haciendo uso de la ecuación de Pfaffl, a través del programa REST<sup>©</sup>, se calcularon las razones de amplificación de los seis genes de estudio en cada uno de los pacientes, a las tres concentraciones de glucosa utilizadas. Se realizó, en primera instancia, un análisis individual de los resultados, es decir se analizó el número exacto de pacientes, dentro del total de 30, que mostraron diferencias significativas con respecto a los controles en cada gen. La figura 8 muestra la mediana de las razones de expresión y el rango intercuartílico de los pacientes a cada una de las concentraciones de glucosa estudiadas.

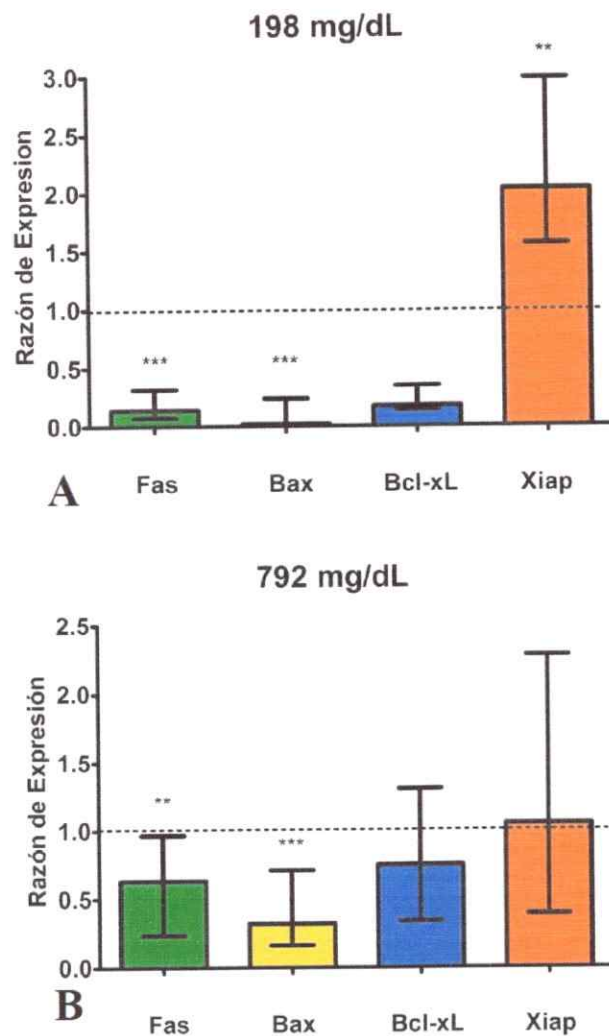


**Figura 8. Número de pacientes que presentaron variación en la expresión.** De un total de 30 pacientes, los gráficos indican el número exacto que mostraron una variación significativa en la expresión génica en relación a los controles y los que no mostraron variación. A partir de los resultados obtenidos de estos gráficos se determinó eliminar de los análisis futuros la concentración de 1566mg/dL de glucosa, debido a que sólo en uno de los seis genes estudiados se observan diferencias en más de la mitad de los pacientes. De igual modo se determinó dejar fuera del análisis los genes *cas3* y *bcl-2* debido al reducido número de pacientes que mostraron diferencias en la expresión en todas las concentraciones de glucosa estudiadas.

Tras el análisis individual se determinó la exclusión de los genes *cas3* y *bcl-2* del análisis posterior debido a que en el primer caso sólo dos pacientes mostraron diferencias en la expresión con respecto a los controles y en el segundo caso no son más de diez los pacientes que muestran cambios en la condición de 792 mg/dL de glucosa. De igual modo se consideró que la condición de 1566 mg/dL de glucosa no será considerada en los análisis posteriores debido a que sólo en el caso de *bax* más de la mitad de los pacientes muestran diferencias significativas en la expresión. Con respecto a *xiap* son nueve los pacientes con valores estadísticamente diferentes a los controles y en los cuatro genes restantes son menos de dos pacientes que presentan diferencias significativas con los controles. Debido a lo anterior el análisis se reduce a cuatro genes, dos pro-apoptóticos: *fas* y *bax* y dos anti-apoptóticos: *bcl-xL* y *xiap*.

#### **VII.5. Cuantificación de la expresión génica. Análisis grupal.**

Posteriormente se analizaron los datos de forma grupal, considerando la mediana y el rango intercuartílico de los datos y se determinó la significancia a nivel grupal de las variaciones en la expresión. La figura 9 muestra estos resultados, donde puede observarse que a 198 mg/dL los genes *fas* y *bax* están significativamente disminuidos en los pacientes con DM1, mientras que *xiap* está aumentado. Luego, a 792 mg/dL la significancia del aumento de *xiap* desaparece, pero la disminución de *fas* y *bax* se mantiene significativa.

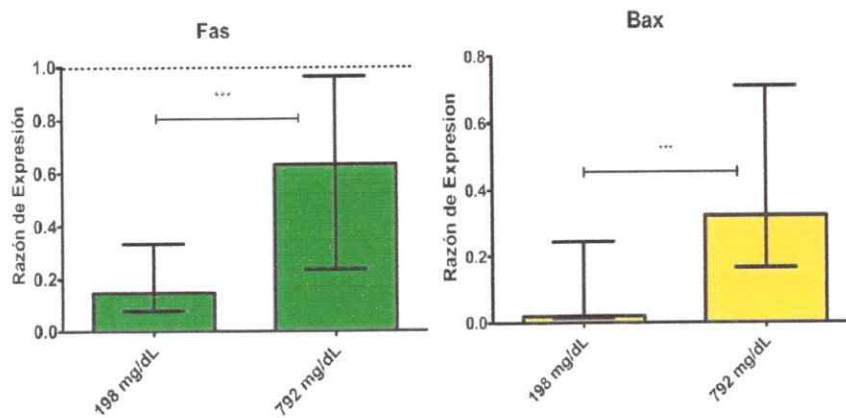


**Figura 9. Razones de expresión de los genes de estudio a 198 y a 792 mg/dL de glucosa.** Se muestran los valores obtenidos de las células cultivadas a 198 mg/dL (A) y a 792 mg/dL (B) de glucosa. Los gráficos indican la mediana y el rango intercuartílico de las razones de expresión individuales de los 30 pacientes. Valores mayores a 1 indican aumento de la expresión de los pacientes con respecto a los controles, por el contrario, valores menores a 1 indican disminución en la expresión. La prueba estadística utilizada para el análisis fue un test de randomización, a través del programa REST©, \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

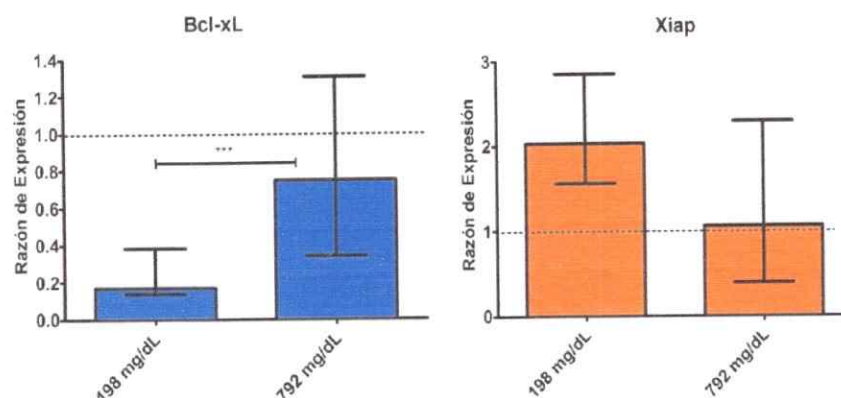


## VII.6. Cuantificación de la expresión génica. Efecto de la glucosa en la expresión.

Para visualizar mejor la variación de la expresión, en relación a la concentración de glucosa utilizada en el cultivo, se graficaron las razones de expresión de cada uno de los genes a las dos concentraciones de glucosa y se realizó la prueba estadística de Mann Whitney para determinar la significancia entre los dos grupos de datos. Se puede observar que en los cuatro genes los valores de expresión tienden al número uno al tratar las CMP con 792 mg/dL de glucosa, lo que está dando cuenta de una disminución en los valores de expresión entre pacientes y controles a esta concentración. Es decir, al aumentar la concentración de glucosa en el cultivo ésta afecta de manera similar la expresión de los genes medidos tanto en las células de los pacientes con en las de los controles. Los resultados se muestran en las Figuras 10 y 11.



**Figura 10. Efecto de glucosa en la expresión génica. Genes pro apoptóticos.** Medianas y rango intercuartílico de las razones de expresión de los genes de estudio en el grupo de pacientes con DM1 (n=30) en relación a los controles (n=28). Para determinar la significación se utilizó el programa GraphPad Prism 5 y el test estadístico Mann Whitney. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.



**Figura 11. Efecto de glucosa en la expresión génica. Genes anti apoptóticos.** Medianas de las razones de expresión de los genes de estudio en el grupo de pacientes con DM1 (n=30) en relación a los controles (n=28). Valores mayores a 1 indican aumento de la expresión de los pacientes con respecto a los controles, por el contrario, valores menores a 1 indican disminución en la expresión. Para determinar la significación se utilizó el programa GraphPad Prism 5 y el test estadístico Mann Whitney. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

### VII.7. Antecedentes clínicos

La tabla 3 resume los antecedentes clínicos relevantes de los 30 pacientes participantes del estudio. Se consideraron la duración de la enfermedad, la edad y glicemia de debut y si al momento del debut se presentó o no cetoacidosis. Este último parámetro se considera una complicación aguda en diabetes mellitus y puede servir como indicador de la agresividad del debut.

**Tabla 3. Antecedentes clínicos de los pacientes del estudio.**

Paciente	Sexo	Edad debut	Duración enfermedad (años)	Glicemia debut (mg/dL)	Cetoacidosis
1	M	1 año 6 meses	3	800	Si
2	F	8 años 10 meses	0	517	Si
3	M	12 años 2 meses	2	1009 *	Si
4	M	12 años 10 meses	5	500	Si
5	M	9 años 7 meses	0	552	No
6	M	3 años 1 mes	6	250	Si
7	F	7 años 5 meses	5	543	No
8	F	3 años 5 meses	4	>600	Si
9	M	4 años 3 meses	2	956	Si
10	M	8 años 6 meses	7	687	Si
11	M	11 años 8 meses	6	551	Si
12	F	6 años 4 meses	3	500	Si
13	M	10 años 2 meses	6	790	
14	F	12 años	0	395	Si
15	F	3 años	13	840	Si
16	F	13 años 5 meses	2	500	Si
17	F	3 años 7 meses	12	500	No
18	M	14 años	2	420	
19	F	12 años 9 meses	1	408	
20	M	4 años 9 meses	15	625	Si
21	F	9 años 10 meses	0	477	Si
22	M	5 años 1 mes	3	576	No
23	M	13 años 7 meses	2	576	Si
24	F	6 años 7 meses	6	1000 *	Si
25	F	9 años 2 meses	1	347	
26	M	9 años 7 meses	1	>600	Si
27	M	6 años 1 mes	1	425	Si
28	F	11 años	0	521	Si
29	M	13 años 5 meses	6	414	No
30	M	7 años 7 meses	5	>600	No

F: Femenino. M: Masculino. >600, indica la glicemia medida con un instrumento que posee un máximo de detección de 600 mg/dL, por lo cual cuando se sobrepasa este valor no es posible tener la cifra exacta. \* marcan los pacientes con glicemias de debut extremas. Las casillas en blanco son valores que no se encontraban en las fichas clínicas de los pacientes. Los pacientes indicados con "0" en duración de la enfermedad hacen referencia a los de diagnóstico reciente, que aún no cumplen un año desde el debut.

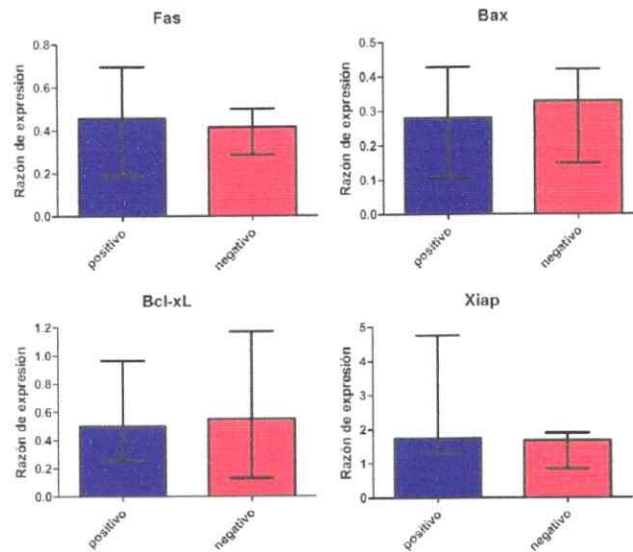
Se realizaron test de correlación bivariada para determinar si existe una relación entre la expresión génica y el año y glicemia de debut, así como para los años de duración de la enfermedad. En el caso del análisis de la edad de debut, la duración de la enfermedad y la glicemia de debut, se consideraron de manera individual los valores de expresión de los pacientes a cada concentración de glucosa. Los coeficientes de correlación se detallan en la Tabla 4, un valor cercano a 1 o -1 indica que hay una correlación entre los datos, considerando significativo un  $p < 0,05$ ; sin embargo ninguno de los valores resultó significativo, por lo cual la expresión de los distintos genes de estudio no guarda relación con los antecedentes clínicos detallados.

**Tabla 4. Relación entre la expresión y los antecedentes clínicos de los pacientes.**

<b>Genes / [glucosa]</b>	<b>Edad debut (coef. correlación)</b>	<b>Duración DM1 (coef. correlación)</b>	<b>Glicemia debut (coef. correlación)</b>
<i>cas3</i> 198 mg/dL	0,222	0,009	0,159
<i>cas3</i> 792 mg/dL	0,116	-0,227	-0,251
<i>fas</i> 198 mg/dL	0,265	-0,219	-0,236
<i>fas</i> 792 mg/dL	0,189	-0,055	0,306
<i>bax</i> 198 mg/dL	0,123	-0,175	-0,079
<i>bax</i> 792 mg/dL	-0,009	-0,094	0,108
<i>bcl-2</i> 198 mg/dL	0,063	-0,132	0,009
<i>bcl-2</i> 792 mg/dL	0,084	0,099	0,188
<i>bcl-xL</i> 198 mg/dL	-0,048	0,017	0,095
<i>bcl-xL</i> 792 mg/dL	0,013	-0,196	0,162
<i>xiap</i> 198 mg/dL	-0,109	0,041	0,359
<i>xiap</i> 792 mg/dL	-0,413	-0,212	0,097

[Glucosa] indica las diferentes concentraciones de glucosa utilizadas en el estudio.

Por su parte, para analizar la expresión génica con la presencia de cetoacidosis al momento del debut, se utilizó el test estadístico de Mann-Whitman. Para realizar este test se promediaron los valores de expresión de cada paciente a 198 y 792mg/dL obteniéndose un valor único que fue utilizado en los gráficos. Estos resultados se muestran en la Figura 12.



**Figura 12. Razones de expresión en función a presencia de cetoacidosis al debut.** Se promediaron las razones de expresión a las dos menores concentraciones de glucosa en los 26 pacientes de los cuales se disponía el antecedente de presencia o ausencia de cetoacidosis al momento del debut (ver tabla 4). Se graficaron la mediana y el rango intercuartílico de las razones de expresión de todos los genes de estudio, haciendo la diferencia entre los dos grupos de pacientes: aquellos que presentaron cetoacidosis al momento del debut y aquellos que no. Se realizó el test estadístico de Mann-Whitney, considerando significativo un valor de  $p < 0,05$ . Ninguna de las medianas presentó una diferencia significativa.

De la Tabla 4 y la Figura 12 se puede concluir que no existe relación significativa en la expresión génica de los pacientes con DM1 (en relación con los controles sanos) y los antecedentes clínicos tales como duración de la enfermedad, edad y glicemia de debut y presencia de cetoacidosis al debut.

#### **VII. 8. Análisis serológico.**

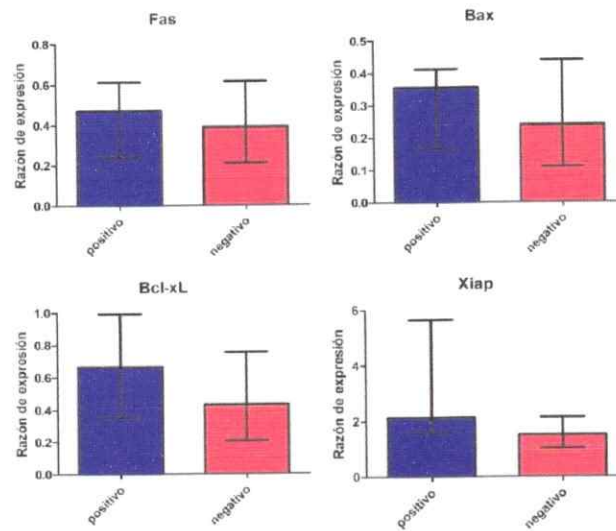
Como último antecedente para analizar y relacionar con la expresión génica se consideró el perfil de auto anticuerpos de los pacientes. Se cuantificaron mediante ELISA los anticuerpos anti descarboxilasa del ácido glutámico (GAD65) y anti la tirosina fosfatasa pancreática (IA-2), ambos propios de diabetes tipo 1. También se midió el anticuerpo anti transglutaminasa (TTG), propio de pacientes celíacos, ya que es común que los pacientes que padecen una enfermedad autoinmune puedan tener mayor predisposición a padecer otras patologías de la misma naturaleza, lo cual también se podría ver relacionado con la expresión de marcadores de apoptosis. La Tabla 5 resume todos los datos. Se puede observar que prácticamente todos los pacientes son negativos para anti-TTG; sin embargo fueron bastantes los que resultaron positivos para GAD65 e IA-2.

Para analizar la relación entre la expresión génica y la presencia de auto-anticuerpos se realizaron test de Mann-Whitney, donde se compararon las medianas de los dos grupos de pacientes: aquellos que resultaron positivos para cada auto-anticuerpo y aquellos que resultaron negativos. En el caso de GAD-65 sólo en la expresión de *cas3* se puede observar una diferencia significativa entre pacientes positivos y negativos. Mientras que para IA-2 no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos. Estos resultados se grafican en la Figura 13 y 14.

Con respecto al anticuerpo anti-TTG, este fue detectado solo en el paciente N°7, el cual no exhibe razones de expresión extremas ni ningún cuadro clínico en particular, por lo cual puede considerarse que tampoco hay relación entre la expresión génica y el anticuerpo anti-TTG en los pacientes estudiados.

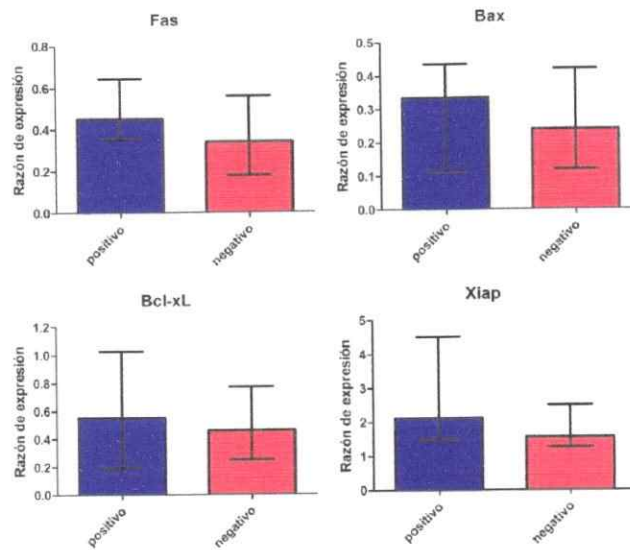
**Tabla 5. Análisis serológico de los pacientes del estudio.**

Paciente	ANTI-GAD 65	ANTI-IA-2	ANTI-TTG
1	<b>Positivo</b>	Negativo	Negativo
2	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	Negativo
3	Negativo	Negativo	Negativo
4	<b>Positivo</b>	Negativo	Negativo
5	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	Negativo
6	<b>Positivo</b>	Negativo	Negativo
7	Negativo	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>
8	Negativo	Negativo	Negativo
9	Negativo	Negativo	Negativo
10	Negativo	Negativo	Negativo
11	Negativo	Negativo	Negativo
12	<b>Positivo</b>	Negativo	Negativo
13	Negativo	<b>Positivo</b>	Negativo
14	Negativo	Negativo	Negativo
15	<b>Positivo</b>	Negativo	Negativo
16	Negativo	Negativo	Negativo
17	Negativo	Negativo	Negativo
18	Negativo	Negativo	Negativo
19	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	Negativo
20	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	Negativo
21	Negativo	Negativo	Negativo
22	Negativo	Negativo	Negativo
23	Negativo	Negativo	Negativo
24	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	Negativo
25	Negativo	Negativo	Negativo
26	Negativo	Negativo	Negativo
27	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	Negativo
28	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	Negativo
29	Negativo	<b>Positivo</b>	Negativo
30	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	Negativo



**Figura 13. Razones de expresión en función a presencia de anti GAD-65.** Se promediaron las razones de expresión a las dos menores concentraciones de glucosa en los 30 pacientes. Se graficaron la mediana y el rango intercuartilico de las razones de expresión de todos los genes de estudio, haciendo la diferencia entre aquellos pacientes en los que hubo presencia del auto-anticuerpo GAD-65 y aquellos que no. Se realizó el test estadístico de Mann-Whitney, considerando significativo un valor de  $p < 0,05$ . Sólo en caspasa 3 se puede observar una diferencia significativa entre las razones de expresión.





**Figura 14. Razones de expresión en función a presencia de anti IA-2.** Se promediaron las razones de expresión a las dos menores concentraciones de glucosa en los 30 pacientes. Se graficaron la mediana y el rango intercuartílico de las razones de expresión de todos los genes de estudio, haciendo la diferencia entre aquellos pacientes en los que hubo presencia del auto-anticuerpo IA-2 y aquellos que no. Se realizó el test estadístico de Mann-Whitney, considerando significativo un valor de  $p < 0,05$ . Se observa que en ninguno de los casos hay una diferencia significativa en los valores de expresión de los pacientes positivos y negativos para este auto-anticuerpo.

## VIII. DISCUSION Y CONCLUSIONES

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) es una enfermedad autoinmune que afecta principalmente a niños. Se caracteriza por una destrucción progresiva de las células  $\beta$  del páncreas debido a la infiltración en el tejido pancreático de células mononucleares periféricas (CMP), que ocasionan una disminución en la producción de insulina. La etiología de la enfermedad es compleja, incluyendo factores genéticos y ambientales que no están del todo claros (Van Belle y col, 2011). Recientemente, se han publicado artículos donde se muestra que pacientes con enfermedades autoinmunes, entre ellas DM1, presentan una expresión disminuida del principal ejecutor de apoptosis: caspasa 3, en un modelo de células mononucleares periféricas. Esta situación estaría dando cuenta de una disminución en los procesos apoptóticos en éstas células (Vendrame y col, 2005). De acuerdo a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue medir la expresión de marcadores de apoptosis en CMP de pacientes con DM1 y comparar estos patrones de expresión con los presentados en sujetos controles sin la enfermedad. Por otro lado, se estudió la relación entre la expresión de los marcadores de apoptosis y los antecedentes clínicos de los pacientes, tales como su edad de debut, años de enfermedad, presencia o ausencia de auto-anticuerpos y presencia o ausencia de cetoacidosis en el debut.

### VIII.1. Modelo de estudio.

En el momento en que se colectaron las muestras, los niveles de glucosa en la sangre de los pacientes se encontraban estabilizados, debido a que ninguno de los niños(as) era de debut reciente; sin embargo, esto no es la condición habitual en una persona que padece DM1, ya que al momento del diagnóstico clínico de la enfermedad se presentan cuadros de hiperglicemias muy elevadas (entre 200 y 1300 mg/dL), ambiente bajo el cual podrían haberse estado alterando los mecanismos apoptóticos normales en las células de los pacientes. Debido a lo anterior, el modelo de CMP fue sometido a estímulos crecientes de glucosa, con el objetivo de evaluar el efecto que las hiperglicemias están teniendo en la expresión de los genes de interés.

Las células que competen, para objeto del estudio, son aquellas que atacan el páncreas generando la destrucción de las células  $\beta$ , es decir, directamente los LT citotóxicos o CD8+, e indirectamente los LT de ayuda o CD4+ que son los que ayudan a la activación de los LT CD8+ y también a la conversión de los LB en células plasmáticas secretoras de auto-anticuerpos. Se utilizó un modelo de CMP debido a que son una buena fuente de linfocitos. Concretamente, más del 80% de las CMP son LT, encontrándose en porcentajes menores LB, monocitos y macrófagos (Vendrame y col, 2006). Es por este motivo que los resultados observados en el conjunto de CMP se pueden considerar significativos de la expresión de los LT, por ser la gran mayoría de las células presentes.

## VIII. 2. Apoptosis en células T.

Durante su desarrollo, los LT experimentan un proceso de maduración, llevado a cabo en el timo, donde son seleccionados de acuerdo a su afinidad a las moléculas de histocompatibilidad (MHC). Se generan dos tipos de selecciones, positiva y negativa, luego de las cuales sobreviven aquellos LT que reconocen MHC propias con baja afinidad. Pese a esto, el proceso de selección no es perfecto y ocurre liberación hacia la periferia de LT con alta afinidad a MHC propias que de no ser controlados por mecanismos de tolerancia periférica pueden generar enfermedades autoinmunes. En la periferia los LT mueren a través de apoptosis en un proceso conocido como AICD (activation-induced cell death). La AICD puede ocurrir tanto por la vía intrínseca como extrínseca de apoptosis. En este trabajo se estudió la expresión de los genes que codifican para proteínas pertenecientes a ambas rutas, más específicamente BAX, BCL-2 y BCL-XL pertenecen a la vía intrínseca, FAS pertenece a la vía extrínseca y CAS3 y XIAP son comunes para ambas vías.

Los resultados de esta trabajo, tomando en cuenta los resultados individuales, mostraron que los genes *fas* y *bax* tienen una expresión disminuida en los pacientes con DM1 en relación a los controles sanos al tratar las CMP con 198mg/dL de glucosa y con 792mg/dL. El gen *xiap* presentó un aumento en la expresión al tratar las CMP con 198mg/dL. En contraste a los estudios previos, no se observó una diferencia significativa en la expresión de *cas3*, por el contrario, la expresión a las tres condiciones de glucosa se mantuvo prácticamente inalterada, de igual modo sucedió con *bcl-2* y *bcl-xL*.

Mirándolo desde el punto de vista de la apoptosis, era de esperar (de acuerdo a la hipótesis planteada en este estudio), que los tres genes que promueven apoptosis (*cas3*, *fas* y *bax*) tuvieran una expresión disminuida en pacientes con DM1 en relación a los controles y que los tres genes que evitan apoptosis (*bcl-2*, *bcl-xL* y *xiap*) tuvieran una expresión aumentada. Sin embargo, sólo *fas*, *bax* y *xiap* se comportaron de acuerdo a lo esperado, ya que *cas3*, *bcl-xL* y *bcl-2* no mostraron cambios.

Previamente se ha descrito que los LT en la periferia mueren por AICD, principalmente a través de la vía extrínseca que involucra a FAS, sin embargo en este trabajo se ha podido comprobar que no sólo los genes que codifican para las proteínas de ésta vía tienen una expresión diferenciada entre pacientes con DM1 y controles sin la enfermedad. Más aún, otras proteínas independientes de ambas vías también están siendo modificadas, como es el caso de XIAP.

Lo primero que puede deducirse de los resultados, es que al estar disminuida la expresión de *fas*, habría por tanto menos proteína disponible en la membrana plasmática ejerciendo su función como receptor. Esto se traduce en que independiente de la expresión que puedan tener todas las proteínas que vienen posteriormente en la ruta de señalización (como CAS8 y CAS3), la apoptosis a través de esta vía debería estar disminuida. Incluso aunque estuvieran presentes las señales adecuadas en exceso, como el ligando de FAS (FASL), si no hay suficiente receptor que lo capte, entonces la ruta no va a activarse. Este resultado por sí solo, claramente no se traduce en que no va ocurrir apoptosis en general, ya que ésta podría estar ocurriendo mediada por la vía intrínseca.

Con respecto a esa vía, de los tres genes que se consideraron en este trabajo, dos de ellos no mostraron cambios significativos en la expresión de los pacientes con respecto a los controles, este es el caso de *bcl-2* y *bcl-xL*. Por su parte, el gen pro-apoptótico *bax* mostró una disminución en la expresión. La función que cumplen normalmente BCL-2 y BCL-XL es inhibir a BAX y de esta manera evitar que se permeabilice la membrana mitocondrial, evitando la salida de citocromo c y la consecuente formación del apoptosoma que lleva a la activación de caspasas y por tanto apoptosis. En el contexto de este trabajo, al estar ambos genes expresándose de igual modo en pacientes y controles, no se puede establecer una función diferencial en la apoptosis de diabéticos y de personas sanas, por lo que estos genes no entregan datos relevantes para este estudio. Por otro lado, *bax* tiene disminuida su expresión en los pacientes, lo que por sí sólo podría traducirse como una disminución en la muerte celular mediada por la vía intrínseca al no haber suficiente BAX que genere la permeabilización de la membrana externa mitocondrial. Sin embargo, se sabe que BAX actúa en la mitocondria junto a otra proteína, denominada BAK, que ejerce la misma función en la membrana. Lamentablemente BAK no fue considerada en este estudio por lo cual es imposible saber los niveles de expresión que posee en los pacientes con DM1, motivo por el cual no se puede determinar si la apoptosis mediada por la vía intrínseca está disminuida o no.

El resultado más interesante de este trabajo consistió en los niveles de expresión observados en el gen anti-apoptótico *xiap*. XIAP es una proteína que no forma parte directa en ninguna de las dos vías de apoptosis, ejerce su función sobre las caspasas efectoras 3 y 7 y además sobre caspasa 9. El mecanismo utilizado por esta proteína

consiste en inactivar la actividad enzimática de las caspasas al unirse a ellas, a diferencia de otros integrantes de la familia de proteínas IAPs, que generan una marca en las caspasas blanco lo que permite que sean reconocidas por el proteosoma y de este modo sean destruidas (Eckelman y col, 2006). Si XIAP actúa sobre CAS9 genera una detención en la apoptosis a través de la vía intrínseca, ya que al inhibir a CAS9 no podrán ser activadas sus caspasas blanco CAS3, CAS6 y CAS7, que son las efectoras finales de apoptosis. Por otro lado XIAP puede unirse a CAS3 y CAS7 inhibiéndolas directamente y con ello la apoptosis proveniente de todas las vías, ya que la activación de estas caspasas es el punto de encuentro y final de todas las rutas de muerte celular.

En este trabajo se pudo comprobar que la expresión del gen *xiap* se encuentra aumentada en los pacientes con DM1 en relación a los controles sanos en las CMP tratadas con 198mg/dL de glucosa, lo que de acuerdo a todo lo anteriormente expuesto, debería estar teniendo repercusiones importantes en los procesos apoptóticos de las células T periféricas de los pacientes. El hecho de que sea *xiap* el único gen que muestra una expresión aumentada, es equivalente, en términos de apoptosis, a los resultados publicados recientemente, sobre la disminución en la expresión de *cas3* en pacientes con enfermedades autoinmunes, incluida DM1 (Vendrame y col, 2006). En estos trabajos, los investigadores realizaron posteriormente ensayos de sobrevivencia en linfocitos activados de pacientes y controles, pudiendo observar que en el caso de los primeros había una resistencia a la muerte celular mediada por FAS, que claramente puede asociarse a la expresión alterada de *cas3*. En el desarrollo de este trabajo no se incluyeron ensayos de sobrevivencia, por lo cual no se puede afirmar con certeza que el

aumento observado en la expresión de *xiap* conlleva necesariamente a una disminución en la apoptosis de las células T. Sin embargo, nuestros experimentos mostraron no sólo aumento en la expresión de *xiap*, si no también disminución en la expresión de *fas*. Por lo tanto, las CMP en los pacientes están teniendo una sumatoria de mecanismos anti apoptóticos activos, al menos a nivel de ARNm, lo cual debería verse reflejado a nivel funcional.

Otro aspecto que también debe considerarse al momento de ser autocríticos con los resultados obtenidos, es que el estudio sólo se realizó a nivel de expresión génica y no de traducción, por lo cual podría pensarse que los niveles de ARNm no están necesariamente reflejando lo que sucede a nivel de proteínas. En relación a lo anterior, si tomamos en cuenta sólo los dos genes que nos entregan información significativa sobre apoptosis: *xiap* y *fas*, se puede concluir que los niveles de proteína no son trascendentes al momento de analizar la apoptosis. Específicamente, en el caso de *fas*, los resultados indican que hay menos ARNm en los pacientes con DM1 que en los controles sin la enfermedad. Situándose en el caso de que el ARNm de *fas* estuviera teniendo modificaciones post transcripcionales y por lo tanto no se está traduciendo (por completo o en menor medida), esto potenciaría el efecto anti apoptótico que la disminución del ARNm indica por sí sólo. Por el contrario, es imposible que se traduzca más proteína que los niveles presentes de ARNm que la codifica, es decir, si se cuenta con una cantidad reducida de ARNm entonces obligatoriamente la cantidad de proteína traducida será reducida. Por su parte, el gen *xiap* mostró niveles mayores de ARNm en los pacientes con DM1 que en los controles en el caso de 198mg/dL de glucosa,



siguiendo la misma lógica anterior, la única posibilidad que se presenta es que el ARNm esté experimentando modificaciones post transcripcionales que den cuenta de una cantidad menor de proteína. En este caso, sí afectaría los resultados, ya que para poder afirmar que *xiap* está regulando negativamente la apoptosis de los LT, necesitamos saber que la proteína se está traduciendo y en este caso no se puede afirmar con certeza. Sin embargo, incluso si *xiap* no se estuviera traduciendo lo suficiente para ejercer su efecto inhibitor, esto no indicaría otra cosa más que *xiap* no está participando activamente en los procesos apoptóticos en los LT. Sin embargo no desmiente que la apoptosis en las células está alterada, ya que para poder realizar esa afirmación los resultados de *fas* son suficientes por sí solos.

En resumen, considerando todos los genes, sólo la expresión de *bax* dentro de aquellos que se integran en la vía intrínseca de apoptosis, mostró una disminución en la expresión a todas las concentraciones de glucosa estudiadas, mientras que *bcl-2* y *bcl-xL* no mostraron cambios significativos en la expresión. Los genes que permiten obtener conclusiones a partir de su expresión fueron *fas* y *xiap*, los que mostraron niveles de expresión disminuidos y aumentados respectivamente, que estarían indicando que la apoptosis a través de la vía extrínseca está disminuida, por la contribución de *fas*; mientras que la apoptosis mediada por caspasas en general está siendo inhibida por un aumento en la expresión de *xiap*.

### VIII.3. Efecto del estímulo de glucosa en la expresión.

Para simular las condiciones de hiperglicemia presentes al momento del debut de la enfermedad se sometió el cultivo de CMPs a concentraciones crecientes de glucosa, partiendo por 198 mg/dL, luego 792 mg/dL y 1566 mg/dL. Se debe tener en cuenta que al momento del debut con DM1 los pacientes ingresan con niveles de glucosa incluso por sobre los 1000mg/dL, como es el caso de uno de los niños considerados en este estudio. Por este motivo, las concentraciones menores de glucosa utilizadas: 198mg/dL y 792mg/dL son completamente acordes a las observadas en la enfermedad. El valor de 1566 mg/dL fue incorporado para forzar el sistema y observar si había cambios notoriamente incrementados con esta concentración de glucosa. Este objetivo no se cumplió, ya que a 198 mg/dL se observan cambios significativos en la expresión de los genes entre pacientes y controles, posteriormente a 792 mg/dL la razón de expresión de todos los genes estudiados se acerca al valor 1, lo que significa que los niveles de RNA mensajero son similares entre pacientes y controles y que por tanto la glucosa está afectando de manera similar la expresión tanto de pacientes como de controles. Al analizar la expresión individual a 1566 mg/dL no se observan diferencias entre pacientes y controles, ya que del total de 30 niños (as) sólo en los genes *xiap* y *bax* se observan diferencias en 8 y en 19 pacientes respectivamente. En el caso de los genes *cas3* y *bcl-2* ningún paciente mostró diferencias en la expresión con respecto a los controles y en el caso de *bcl-xL* y *fas* sólo 2 y 1 paciente respectivamente resultaron significativamente diferentes a los controles.

Es difícil explicar estas tendencias, contando sólo con los datos aportados por esta tesis, ya que el efecto de glucosa en linfocitos no es un tema ampliamente estudiado. Principalmente, en estudios de diabetes el foco de la investigación es la célula  $\beta$  pancreática. Este trabajo es novedoso porque aborda otro aspecto de la enfermedad, las características de las células que generan el ataque a la célula  $\beta$ . Sin embargo, por el hecho de ser novedoso, no hay antecedentes suficientes para poder contrastar o complementar la información obtenida.

El aumento en la expresión de *xiap* en los pacientes con DM1 en relación a los controles, podría ser explicado por la condición de hiperglicemia. Se ha descrito en monocitos que en presencia de altos niveles de glucosa en la sangre, estas células aumentan la expresión y actividad (entre otras proteínas) del factor transcripcional NF- $\kappa$ B (Dasu, 2008). No hay estudios concluyentes sobre los mecanismos mediante los cuales se estaría activando NF- $\kappa$ B en condiciones de hiperglicemia, por otro lado, tampoco se ha reportado literatura acerca de los efectos de la hiperglicemia sobre NF- $\kappa$ B en linfocitos, por lo cual suponer que en este tipo celular está ocurriendo un mecanismo similar que en monocitos, es simplemente especulativo. Sin embargo, precisamente NF- $\kappa$ B es el factor nuclear que actúa a nivel de promotor, induciendo la transcripción de *xiap* y otras proteínas anti-apoptóticas, en este sentido es lógico pensar que si aumenta la expresión de un gen determinado, probablemente se deba al aumento en la expresión o en la activación de sus factores transcripcionales. Pese a todo, sería necesario realizar más estudios para determinar el mecanismo preciso mediante el cual está ocurriendo el aumento de expresión de *xiap*.

#### **VIII.4. Relación con perfil de anticuerpos y antecedentes clínicos**

Los patrones de expresión de los seis genes estudiados en los pacientes con DM1 se compararon con el perfil de auto-anticuerpos presentes en cada uno. Se realizó el mismo procedimiento con los antecedentes clínicos más relevantes, tales como duración de la enfermedad, edad de debut, glicemia de debut y presencia o ausencia de cetoacidosis al debut. Los valores de expresión resultaron ser independientes de todos los antecedentes clínicos y de los perfiles de anticuerpos. Sólo en el caso de *cas3* se vio una diferencia significativa entre los niveles de expresión de los pacientes que resultaron positivos para el auto-anticuerpo anti GAD65 y los que resultaron negativos. Sin embargo, los niveles de expresión de los pacientes no son significativamente distintos a los de los controles, por los cuales esta diferencia no puede considerarse relevante.

### VIII.5. Proyecciones.

El diagnóstico de DM1 hoy en día se produce cuando los pacientes presentan cuadros de hiperglicemia graves. En este momento, la mayor parte de la masa de células  $\beta$  pancreáticas ha sido destruida, producto del sistema inmunológico del propio paciente. En el momento del diagnóstico se comienzan a realizar todas las medidas para mantener al margen la enfermedad, sin embargo, en la destrucción de las células  $\beta$  ya no hay marcha atrás y el paciente está destinado a una terapia insulínica por el resto de su vida. Si se toma en cuenta que la mayoría de las personas que debutan cada año con DM1 son niños menores de 17 años, se hace aún más imperativo intentar buscar soluciones para un diagnóstico precoz de la enfermedad. En este trabajo, se encontró que los pacientes con DM1, a diferencia de los controles sin la enfermedad, poseen niveles de expresión elevados de un gen que codifica para una proteína anti-apoptótica, denominada XIAP y presentan además niveles disminuidos del gen que codifica para la proteína pro-apoptótica FAS, al someter las CMP a concentraciones elevadas de glucosa.

Los resultados sugieren la posibilidad de desarrollar un test pediátrico diagnóstico, especialmente dirigido a los sujetos de riesgo mayor, tales como hijos o hermanos de personas que padezcan la enfermedad, o los individuos que porten los alelos HLA de susceptibilidad. La idea sería, mediante una muestra de sangre periférica sometida a altas concentraciones de glucosa, analizar los patrones de expresión de *xiap* y *fas* y/u otros marcadores de apoptosis en los niños y ayudar de esta manera a determinar el riesgo a padecer la enfermedad.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Arends M, Wyllie A. (1991). Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 32: 223-254.
- Arnold R, Brenner D, Becker M, Frey C & Krammer P. (2006). How T lymphocytes switch between life and death. *Eur J Immunol* 36: 1654-1658
- Bennett S, Lucassen A, Gough S, Powell E, Undlien 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.
- Bona G, Defranco S, Chiochetti A, Indelicato M, Biava A, Difranco D, Dianzani I, Ramenghi U, Corrias A, Weber G, et al. (2003). Defective function of Fas in T cells from paediatric patients with autoimmune thyroid diseases. *Clin Exp Immunol* 133: 430-437.
- Bottini N, Vang T, Cucca F, Mustelin T. (2006). Role of PTPN22 in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. *Semin Immunol* 18: 207-213.
- Bouwens M, Grootte Bromhaar M, Jansen J, Müller M, Afman LA. (2010). Postprandial dietary lipid-specific effects on human peripheral blood mononuclear cell gene expression profiles. *Am J Clin Nutr* 91: 208-217.
- Chipuk J, Bouchier-Hayes, Green D. (2006). Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ* 13: 1396-1402.
- Clarke A, Cummings M, Harrison D. (1995). Interaction between murine germline mutations in p53 and APC predisposes to pancreatic neoplasia but not to increased intestinal malignancy. *Oncogene* 11(9): 1913-1920.
- Concannon P, Rich S, Nepom G. (2009). Genetics of type 1A diabetes. *N Engl J Med* 360: 1646-1654.
- Chatenoud L, Bluestone JA. (2007). CD3-specific antibodies: a portal to the treatment of autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 7: 622-632.
- Dasu MR, Devaraj S, Zhao L, Hwang DH, Jialal I. (2008). High Glucose Induces Toll-Like Receptor Expression in Human Monocytes. *Diabetes* 57(11): 3090-3098.
- Eckelman B, Salvesen G, Scott F. (2006). Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO reports* 7: 988-994
- Eisenbarth GS. (1986). Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med* 314: 1360-1368.
- Encuesta Nacional de Salud Chile, 2009-2010. Ministerio de Salud. Chile.
- Erlich HA, Zeidler A, Chang J, Shaw S, Raffel LJ. (1993). HLA class II alleles and susceptibility and resistance to insulin dependent diabetes mellitus in Mexican-American families. *Nat Genet* 3: 358-364.

- Erlich HA, Valdes AM, Noble J, Carlson JA, Varney M. (2008). HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. *Diabetes* 57: 1084–1092.
- Farid NR, Sampson L, Noei P, Barnard JM, Davis AJ, Hillman DA. (1979). HLA-D-related (DRw) antigens in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes* 28: 552–557.
- Fennessy M, Metcalfe K, Hitman GA, Niven M, Biro PA, Tuomilehto J, Tuomilehto-Wolf E. (1994). A gene in the HLA class I region contributes to susceptibility to IDDM in the Finnish population Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *Diabetologia* 37: 937–944.
- Fife B, Bluestone J. (2008). Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunological Reviews* 224: 166–182.
- Fourlanos S, Varney MD, Tait BD, Morahan G, Honeyman MC, Colman PG, Harrison LC. (2008). The rising incidence of type 1 diabetes is accounted for by cases with lower-risk human leukocyte antigen genotypes. *Diab Care* 31(8): 1546–1549.
- Gillespie KM, Bain SC, Barnett AH, Bingley PJ, Christie MR, Gill GV, Gale EA. (2004). The rising incidence of childhood type 1 diabetes and reduced contribution of high-risk HLA haplotypes. *Lancet* 364(9446): 1699–1700.
- Golstein P, Kroemer G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* 32: 37–43.
- Hakem R, Hakem A, Duncan GS, Henderson JT, Woo M, Soengas MS, Elia A, de la Pompa JL, Kagi D, Khoo W, et al. (1998). Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 94: 339–352.
- Hao Z, Duncan GS, Chang CC, Elia A, Fang M, Wakeham A, Okada H, Calzascia T, Jang Y, You-Ten A, et al. (2005). Specific ablation of the apoptotic functions of cytochrome c reveals a differential requirement for cytochrome c and Apaf-1 in apoptosis. *Cell* 121, 579–591.
- Harlin H, Reffey S, Duckett C, Lindsten T, Thompson C. Characterization of XIAP-deficient mice. (2001). *Mol Cell Biol* 21: 3604–3608.
- Hildeman D, Zhu Y, Mitchell T, Kappler J, Marrack P. (2002). Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo. *Curr. Opin. Immunol.* 14: 354–359.
- Holzelova E, Vonarbourg C, Stolzenberg MC, Arkwright PD, Selz F, Prieur AM, Blanche S, Bartunkova J, Vilmer E, Fischer A, et al. (2004). Autoimmune lymphoproliferative syndrome with somatic Fas mutations. *N Engl J Med* 351: 1409–1418.
- Honeyman MC, Harrison LC, Drummond B, Colman PG, Tait BD. (1995). Analysis of families at risk for insulin-dependent diabetes mellitus reveals that HLA antigens influence progression to clinical disease. *Mol Med* 1: 576–582.
- Ju ST, Panka DJ, Cui H, Ettinger R, el-Khatib M, Sherr DH, Stanger BZ, Marshak-Rothstein A. (1995). Fas/FasL interactions required for programmed cell death after T cell activation. *Nature* 373: 444–8.

- Julier C, Hyer RN, Davies J, Merlin F, Soularue P. (1991). Insulin-IGF2 region on chromosome 11p encodes a gene implicated in HLA-DR4-dependent diabetes susceptibility. *Nature* 354: 155–159.
- Kaufmann T, Tai L, Ekert PG, Huang DC, Norris F, Lindemann RK, Johnstone RW, Dixit VM, Strasser A. (2007). The BH3-only protein Bid is dispensable for DNA damage- and replicative stress- induced apoptosis or cell-cycle arrest. *Cell* 129: 423–433.
- Kennedy GC, German MS, Rutter WJ. (1995). The minisatellite in the diabetes susceptibility locus IDDM2 regulates insulin transcription. *Nat Genet* 9: 293–298.
- Korsmeyer SJ, Yin XM, Oltvai ZN, Veis-Novack DJ, Linette GP. (1995). Reactive oxygen species and the regulation of cell death by the Bcl-2 gene family. *Biochim Biophys Acta* 1271(1): 63–66.
- Krammer PH. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407: 789–795.
- Kroemer G & Jaattela M. (2005). Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nature Rev Cancer* 5: 886–897.
- Krueger A, Fas S, Baumann S, Krammer PH. (2003). The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. *Immunol Rev* 193: 58–69.
- Lie BA, Todd JA, Pociot F, Nerup J, Akselsen HE. (1999). The predisposition to type 1 diabetes linked to the human leukocyte antigen complex includes at least one non-class II gene. *Am J Hum Genet* 64: 793–800.
- Lohmann T, Leslie RD, Londei M. (1996). T cell clones to epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 raised from normal subjects and patients with insulin-dependent diabetes. *J Autoimmun* 9: 385–389.
- Lorenz HM, Herrmann M, Winkler T, Gaipf U, Kalden JR. (2000). Role of apoptosis in autoimmunity. *Apoptosis* 5: 443–449.
- Lowe CE, Cooper JD, Brusko T, Walker NM, Smyth DJ. (2007). Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes. *Nat Genet* 39: 1074–1082.
- Lucassen AM, Julier C, Beressi JP, Boitard C, Froguel P, Lathrop M, Bell JI. (1993). Susceptibility to insulin dependent diabetes mellitus maps to a 4.1 kb segment of DNA spanning the insulin gene and associated VNTR. *Nat Genet* 4: 305–310.
- Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka HI, Spinas GA, Kaiser N, Halban PA, Donath MY. (2002) Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest* 110: 851–860.
- Maher S, Toomey D, Condrón C, Bouchier-Hayes D. (2002). Activation-induced cell death: The controversial role of Fas and Fas ligand in immune privilege and tumour counterattack. *Immunology and Cell Biology* 80: 131–137.
- Marsden VS, O'Connor L, O'Reilly L, Silke J, Metcalf D, Ekert P, Huang D, Cecconi F, Kuida K, Tomaselli K, et al. (2002). Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature* 419: 634–637.



- Martinou JC & Youle RJ. (2006). Which came first, the cytochrome c release or the mitochondrial fission? *Cell Death Differ* 13: 1291–1295
- Mayer-Davis EJ, Bell RA, Dabelea D, D'Agostino R Jr, Imperatore G, Lawrence JM, Liu L, Marcovina S. (2009). The many faces of diabetes in American youth: type 1 and type 2 diabetes in five race and ethnic populations: the SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Diab Care* 32(Suppl. 2): S99-S101.
- Miller JF & Flavell RA. (1994). T-cell tolerance and autoimmunity in transgenic models of central and peripheral tolerance. *Current Opinion in Immunology* 6: 892–899.
- Nejentsev S, Howson JM, Walker NM, Szeszkó J, Field SF. (2007). Localization of type 1 diabetes susceptibility to the MHC class I genes HLA-B and HLA-A. *Nature* 450: 887–892.
- Nerup J, Platz P, Andersen OO, Christy M, Lyngsoe J. (1974). HL-A antigens and diabetes mellitus. *Lancet* 2: 864–866.
- Newmeyer DD & Ferguson-Miller S. (2003). Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 112: 481–490.
- Nistico L, Buzzetti R, Pritchard LE, Van der Auwera B, Giovannini C. (1996). The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, associated with, type 1 diabetes. *Belgian Diabetes Registry. Hum Mol Genet* 5: 1075–1080.
- Noble JA, Valdes AM, Bugawan TL, Apple RJ, Thomson G, Erlich HA. (2002). The HLA class I A locus affects susceptibility to type 1 diabetes. *Hum Immunol* 63: 657–664.
- Okada H, Suh WK, Jin J, Woo M, Du C, Elia A, Duncan GS, Wakeham A, Itie A, Lowe SW, et al. (2002). Generation and characterization of Smac/DIABLO-deficient mice. *Mol Cell Biol* 22: 3509–3517.
- Owerbach D, Lernmark A, Platz P, Ryder LP, Rask L, Peterson PA, Ludvigsson J. (1983). HLA-D region beta-chain DNA endonuclease fragments differ between HLA-DR identical healthy and insulindependent diabetic individuals. *Nature* 303: 815–817.
- Pfaffl M. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9): E45.
- Paffl M, Horgan G, Dempfle L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucl Acids Res* 30 (9): e36.
- Pitkaniemi J, Onkamo P, Tuomilehto J, Arjas E. (2004). Increasing incidence of type 1 diabetes—role for genes? *BMC Genet* 5(1): 5.
- Pugliese A. (2004). Genetics of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 33(1): 1-16.
- Ravirajan CT, Pittoni V, Isenberg DA. (1999). Apoptosis in human autoimmune diseases. *Int Rev Immunol* 18: 563–589.
- Riboulet-Chavey A, Diraison F, Siew LK, Wong FS, Rutter GA. (2008). Inhibition of AMP-activated protein kinase protects pancreatic beta-cells from cytokine-mediated apoptosis and CD8<sup>+</sup> T-cell-induced cytotoxicity. *Diabetes* 57: 415–423.

- Ryan A, Murphy M, Godson C, Hickey F. (2008). Diabetes mellitus and apoptosis: inflammatory cells. *Apoptosis* 14: 1435-1450.
- Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C. (1989). Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest* 83(3): 865-875.
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Kramer PH, Peter ME. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signalling pathways. *EMBO J* 17: 1675-1687.
- Semra YK, Seidi OA, Sharief MK. (2001). Overexpression of the apoptosis inhibitor FLIP in T cells correlates with disease activity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 113: 268-274.
- Semra YK, Seidi OA, Sharief MK. (2002). Disease activity in multiple sclerosis correlates with T lymphocyte expression of the inhibitor of apoptosis proteins. *J Neuroimmunol* 122: 159-166.
- Shi, Y. (2006). Mechanical aspects of apoptosome assembly. *Curr Opin Cell Biol.* 18: 677-684
- Singal DP & Blajchman MA. (1973). Histocompatibility (HL-A) antigens, lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus. *Diabetes* 22: 429-432.
- Smyth D, Cooper JD, Collins JE, Heward JM, Franklyn JA. (2004). Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes: evidence for its role as a general autoimmunity locus. *Diabetes* 53: 3020-3023.
- Sprent J & Kishimoto H. (2002). The thymus and negative selection. *Immunology Reviews* 185: 126-135.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-1316.
- Thorsby E, Ronningen KS. (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.
- Todd JA, Bell JI, McDevitt HO. (1987). HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 329: 599-604.
- Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228: 1440-1443.
- Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H. (2003). Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 423: 506-511.
- Undlien DE, Friede T, Rammensee HG, Joner G, Dahl-Jorgensen K. (1997). HLA-encoded genetic predisposition in IDDM: DR4 subtypes may be associated with different degrees of protection. *Diabetes* 46: 143-149.
- Van Belle T, Coppieters K, Von Herrath M. (2011). Type 1 Diabetes: Etiology, Immunology, and Therapeutic Strategies. *Physiol Rev* 91(1): 79-118.
- Van Noort JM, van Sechel A, Boon J, Boersma WJ, Polman CH, Lucas CJ. (1993). Minor myelin proteins can be major targets for peripheral blood T cells from both multiple sclerosis patients and healthy subjects. *J Neuroimmunol* 46: 67-72.

- Vehik K, Hamman RF, Lezotte D, Norris JM, Klingensmith GJ, Rewers M, Dabelea D. (2008). Trends in high-risk HLA susceptibility genes among Colorado youth with type 1 diabetes. *Diab Care* 31(7): 1392–1396.
- Vehik K. & Dabelea D. (2011). The changing epidemiology of type 1 diabetes: why is it going through the roof?. *Diabetes Metab Res Rev* 27: 3–13.
- Vella A, Cooper JD, Lowe CE, Walker N, Nutland S. (2005). Localization of a type 1 diabetes locus in the IL2RA/CD25 region by use of tag single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet* 76: 773–779.
- Vendrame F, Santangelo C, Misasi R, Dionisi S, Gizzi C, Realacci M, Grasseti D, Di Mario U, Dotta F. (2005). Defective lymphocyte caspase-3 expression in type 1 diabetes. *Eur J Endocrinol.* 152: 119-125.
- Vendrame F, Segni M, Grasseti D, Tellone V, Augello G, Trischitta V, Torlontano M, Dotta F. (2006). Impaired Caspase-3 Expression by Peripheral T Cells in Chronic Autoimmune Thyroiditis and in Autoimmune Polyendocrine Syndrome-2. *J Clin Endocrinol Metab* 91(12): 5064-5068.
- Wang X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 15: 2922–2933.
- Yin XM, Wang K, Gross A, Zhao Y, Zinkel S, Klocke B, Roth KA, Korsmeyer SJ. (1999). Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* 400: 886–891.
- Youle R, Strasser A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9: 47-59.