

Instituto de Investigaciones Biológicas  
Clemente Estable

Programa de Desarrollo en Ciencias  
Básicas- PEDECIBA

Área Biología- Subárea Genética  
Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas  
**Lic. Mariana Fernández**

# Análisis de metilación y expresión génica del gen Socs1 y su relación con el tratamiento de primera elección en la Diabetes tipo 2



**Orientadora de tesis** Dra. Adriana  
Mimbacas

**Laboratorio de ejecución**

Departamento de Genética, Instituto  
de Investigaciones Biológicas Clemente  
Estable.

**Tribunal**

Dr. Bernardo Bertoni

Dra. Silvia Olivera

Dra. Yanina Pancera

**Abril de 2014**

## **Agradecimientos**

Al PEDECIBA por permitirme desarrollar mi tesis.

A la ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación) por la financiación y apoyo al proyecto en el marco del llamado a proyectos M<sup>º</sup> Viñas 2010 y a Federico Secondo por la buena disposición como ejecutivo del proyecto.

A mi tutora, la Dra. Adriana Mimbacas, por aceptarme como estudiante de maestría y enseñarme todo lo que sabe, además de darme confianza siempre.

Al Dr. Gerardo Javiel y su equipo médico y de enfermeros del Hospital Pasteur por ayudarme en la colecta de pacientes y muestras para el proyecto.

A todos mis compañeros de laboratorio de Genética del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable por brindarme el apoyo humano y técnico imprescindible en la tarea diaria.

A los profesores y especialistas que me ayudaron con distintas problemáticas prácticas y teóricas desinteresadamente como el Dr. Ruben Pérez, la Dra. Mónica Capeta y el Mg. Gonzalo Manrique.

A mis amigos y familia por darme siempre la confianza de seguir adelante en los momentos de complicaciones y alegrarse conmigo cuando se cumplieron los logros.

Especialmente a mis padres por el apoyo y amor incondicional.

A mis amores Sebastián y Ramiro por el impulso de siempre y por el amor que me dan cada día.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>6</b>
<b>1-INTRODUCCIÓN</b>	<b>9</b>
<b>1.1 DIABETES MELLITUS, LA PATOLOGÍA Y SU TRATAMIENTO</b>	<b>9</b>
1.1.1 CONTEXTO EPIDEMIOLÓGICO DE LA PATOLOGÍA	9
1.1.2 DEFINICIÓN Y PATOGENIA	11
1.1.3 DIABETES MELLITUS TIPO 2 (DT2)	12
1.1.4 ABORDAJE TERAPÉUTICO INICIAL	15
1.1.5 METFORMINA COMO FÁRMACO DE PRIMERA ELECCIÓN	16
1.1.6 FALLAS EN EL TRATAMIENTO CON FÁRMACOS ORALES	17
<b>1.2 ASPECTOS INMUNOLÓGICOS DE LA PATOLOGÍA</b>	<b>18</b>
1.2.1 INMUNOLOGÍA Y DIABETES MELLITUS TIPO 2 HOY	18
1.2.2 INFLAMACIÓN EN DIABETES TIPO 2	20
1.2.3 MARCADOR MOLECULAR DE SISTEMA INMUNE: SOCS1	23
1.2.4 MARCADOR MOLECULAR DE SISTEMA INMUNE: HLA-DQB1*	25
<b>1.3 GENÉTICA Y EXIGENTICA DE LA DT2</b>	<b>26</b>
1.3.1 GENÉTICA DE LA DT2	26
1.3.2 EPIGENÉTICA	27
<b>1.4 JUSTIFICACIÓN</b>	<b>28</b>
<b>2-HIPOTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
<b>2.1 HIPÓTESIS</b>	<b>31</b>
<b>2.2 OBJETIVO GENERAL</b>	<b>31</b>
<b>2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>31</b>
<b>3-MATERIAL Y MÉTODO</b>	<b>33</b>
<b>3.1. DISEÑO CLÍNICO-METODOLÓGICO</b>	<b>33</b>
3.1.1 DISEÑO DE LA POBLACIÓN	33
3.1.2 MARCADOR PARA EL SEGUIMIENTO DEL CONTROL METABÓLICO	34
<b>3.2 ANÁLISIS DE ARN Y ADN</b>	<b>34</b>
3.2.1 EXTRACCIÓN DE ADN	34
3.2.2 ANÁLISIS DE ALELOS HLA	35
3.2.3 ANÁLISIS DE METILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN SOCS1	35
3.2.3.1 SELECCIÓN Y DISEÑO DE SECUENCIA	35
3.2.3.2 CONVERSIÓN CON BISULFITO DE SODIO	37
3.2.3.3 AMPLIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE CURVAS DE MELTING	38
3.2.4 CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LA EXPRESIÓN DEL GEN SOCS1	39
3.2.4.1 EXTRACCIÓN DE ARN Y RT-PCR	39
3.2.4.2 DISEÑO DE CUANTIFICACIÓN RELATIVA UTILIZANDO EL GEN ABL COMO REFERENCIA	40
<b>3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>42</b>
<b>4-RESULTADOS</b>	<b>44</b>
<b>4.1. ANÁLISIS CLÍNICO Y PARACLÍNICO</b>	<b>44</b>
4.1.1 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN	44
4.1.2 ANÁLISIS POR SEXO	45
<b>4.2 TIPIFICACIÓN DE ALELOS HLA-DQB1*</b>	<b>46</b>
<b>4.3 MIP (PCR METILACIÓN INDEPENDIENTE) Y CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA</b>	<b>47</b>
4.3.1 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE METILACIÓN	47
4.3.2 ANÁLISIS DE PRODUCTOS DE PCR METILACIÓN MEDIANTE SECUENCIACIÓN DIRECTA	49
4.3.3 ANÁLISIS DE CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	51
4.3.4 SECUENCIACIÓN CONFIRMATORIA DE PRODUCTOS DE CUANTIFICACIÓN	54

<b>5-DISCUSSION</b>	<b>57</b>
<b>5.1 DISEÑO DEL ESTUDIO</b>	<b>57</b>
<b>5.2 ALELOS HLA-DQB1*</b>	<b>60</b>
<b>5.3 METILACIÓN Y CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LA EXPRESIÓN DE SOCS1</b>	<b>61</b>
<b>6-PERSPECTIVAS</b>	<b>66</b>
<b>7-BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>68</b>
<b>8-ANEXOS</b>	<b>75</b>
<b>ANEXO 1. ASPECTOS TÉCNICOS</b>	<b>75</b>
<b>ANEXO 2. TABLAS</b>	<b>77</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Etiopatogenia de la Diabetes tipo 2.	13
<b>Figura 2:</b> Algoritmo 2010 de la Sociedad Española de Diabetes sobre el tratamiento farmacológico de la hiperglucemia en la diabetes tipo 2.	16
<b>Figura 3:</b> Tipos de respuesta inmune: innata y adquirida o adaptativa.	19
<b>Figura 4:</b> Estructura del supresor de la señalización de citoquinas 1 (SOCS1).	24
<b>Figura 5:</b> Mecanismo molecular mediante el cual las proteínas SOCS1 y SOCS3 regulan la señal de citoquinas.	24
<b>Figura 6:</b> Estructura del promotor del gen Socs1 en queratinocitos humanos donde se señalan los sitios de unión a los distintos factores de transcripción.	35
<b>Figura 7:</b> Secuencia con alto contenido GC resultado del análisis de 2000pb previos al nucleótido +1 con el programa EMBOSS CpGplot.	36
<b>Figura 8:</b> Predicción de islas CpG y primers.	36
<b>Figura 9:</b> Principio químico de la conversión con Bisulfito de Sodio.	37
<b>Figura 10:</b> Análisis de los patrones de metilación con el método conversión con Bisulfito de Sodio y análisis de curvas de melting.	39
<b>Figura 11:</b> Recomendaciones para el diseño de la cuantificación de la expresión del gen Socs1	40
<b>Figura 12:</b> Diseño del sistema de amplificación del gen Abl.	41
<b>Figura 13:</b> Resultado de la glicemia inicial en ambas subpoblaciones.	45
<b>Figura 14:</b> Variación individual de los valores de HbA1c antes del inicio de Metformina y 3 meses después de iniciado el tratamiento.	45
<b>Figura 15:</b> Glicemia inicial tomando en cuenta la distribución de género.	46
<b>Figura 16:</b> a. Curvas de amplificación, con Bisulfito de Sodio y control sin tratamiento b. Curvas de melting.	48
<b>Figura 17:</b> Contraste de las medias de Tm entre ambas subpoblaciones de respuesta.	49
<b>Figura 18:</b> Porción de cromatograma obtenido para cada muestra luego de la secuenciación de los productos de PCR del análisis de metilación del gen Socs 1.	50
<b>Figura 19:</b> Secuencia (5´-3´) analizada con el programa MethPrimer para el diseño del estudio de la metilación.	50
<b>Figura 20:</b> Curvas de amplificación, melting y curvas estándar con valores de eficiencia para cada gen en corrida ejemplo de cuantificación de la expresión relativa.	52
<b>Figura 21:</b> Desvío estándar para la cuantificación relativa.	54
<b>Figura 22:</b> Resultados de muestra del análisis de BLAST para los productos de cuantificación.	55

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Criterios diagnóstico de Diabetes Mellitus o trastornos de la regulación de la glucosa.	13
<b>Tabla 2:</b> Objetivos de control en el paciente con diabetes En base a Position statement ADA, 2011.	15
<b>Tabla 3:</b> Características clínicas y paraclínicas para los grupos de “Respondedores” y “No respondedores”.	44
<b>Tabla 4:</b> Análisis por sexo para evaluar esta variable como factor de confusión.	46
<b>Tabla 5:</b> Distribución de genotipos del loci HLA asociados a DT1.	47
<b>Tabla 6:</b> Cuantificación de la expresión del gen.	51
<b>Tabla 7:</b> Valores de expresión relativa según el software del equipo Rotor Gene 6000.	53

## RESUMEN

La Diabetes mellitus es una patología de origen multifactorial, es decir, con determinación genética por parte de varios genes y con influencia del medioambiente. Esta característica hace que tanto su clasificación como su terapéutica sean dificultosas y se opte en la práctica por el método de “ensayo y error” para ajustar la medicación a cada paciente y a cada etapa de la enfermedad. Esto último implica grandes costes económicos para los servicios de salud y sus usuarios, así como una pérdida de tiempo en el control del desajuste y la prevención de complicaciones graves y crónicas. Las drogas clasificadas como sensibilizadoras a la acción de la insulina, del tipo de la Metformina, son el tratamiento de primera línea en el mundo para pacientes con diabetes mellitus tipo 2. La Metformina, así como la mayor parte de la terapéutica tiene como diana contrarrestar la insulino-resistencia asociada a este tipo de diabetes pero en los últimos años ha crecido el interés por el estudio de la inflamación crónica ya que la secreción por parte de macrófagos y células endoteliales de citoquinas proinflamatorias contribuye a la patogénesis de la insulino-resistencia. Un regulador importante de la inflamación, perteneciente al sistema inmune, es la proteína expresada por el gen *Socs1* (supresor de la señalización de citoquinas 1). En trabajos recientes se ha observado que el aumento de la actividad del promotor de *Socs1* en sangre está asociado con la sensibilidad mejorada a la insulina. Esta mejora en la sensibilidad a la insulina observada como consecuencia de la mayor expresión de *Socs1*, podría deberse a que individuos con mayor cantidad de la proteína *SOCS1* presentan mejor control del estado inflamatorio y un ambiente más favorable para la correcta acción de la insulina, favoreciendo la acción de la Metformina y sus efectos. Para estudiar la influencia de este marcador genético en la variabilidad de respuesta a la Metformina observada en diabetes mellitus tipo 2 se construyeron dos subpoblaciones (de 20 pacientes cada una) de pacientes diabéticos tipo 2 diferenciadas en “Respondedores” y “No respondedores” a esta medicación en base al descenso del valor de hemoglobina glicosilada (HbA1c) a los tres meses de iniciado el tratamiento. Ambas subpoblaciones se contrastaron para el estudio de la metilación del promotor y la expresión del gen *Socs1* a partir de sangre periférica. El análisis de metilación se realizó mediante conversión con bisulfito de sodio-PCR y análisis de curvas de melting. Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.0001$ ), encontrándose mayores niveles de metilación en los individuos catalogados como “No respondedores”. Esto fue concordante con lo hallado para la cuantificación de la expresión del gen. Esto último se realizó por cuantificación relativa por real time PCR utilizando el gen *Abl* como referencia donde también se obtuvo diferencia estadística significativa ( $p = 0.0209$ ), observándose menor expresión del gen en individuos “No respondedores”. Estos resultados van en línea con la idea que un mejor manejo del estado inflamatorio se asocia con la buena respuesta a la Metformina. Este trabajo aporta evidencia que sustenta el concepto que el sistema inmune es clave en el desarrollo de la patología y, particularmente en la respuesta a Metformina y que son las características genéticas las que pueden orientar de forma más certera al clínico a la hora de iniciar la conducta terapéutica.

## ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a disease of multifactorial origin that depends on genetic determination by multiple genes and is influenced by the environment. Because of the DM complexity, its classification and therapeutic is difficult. DM complexity also makes the trial and error method the most useful to adjust the medication to each patient and disease stage, which implies large economic health services and users costs together with a loss of time to control the imbalance in medication and to prevent acute and chronic complications. Drugs classified as sensitizers of insulin, such as metformin and metformin-like drugs, are the worldwide first-line treatment in type 2 DM with a main action directed to counteract the type 2 DM associated insulin resistance. However, in the last years, there is an increasing interest in the chronic inflammation described in type 2 DM patients, since it has been shown that secretion of pro-inflammatory cytokines by macrophages and endothelial cells contribute to the insulin resistance pathogenesis. An important regulator of inflammation, that belongs to the immune system, is the protein expressed by the gene SOCS1 (suppressor of cytokine signaling 1). Recent work has shown that increased activity of SOCS1 promoter, with resulting increased SOCS1 expression in blood, is associated with an improved insulin sensitivity, which may suggest that patients with a better control of the inflammatory state have a more favorable environment to a proper insulin action, this favoring action and effects of metformin. To study the influence of this genetic marker in the variability of the response to metformin observed in type 2 DM patients, two subpopulations of 20 patients each were differentiated into "responders" and "non-responders" to metformin based on the decreased value of the glycosylated hemoglobin (HbA1c) after three months of treatment. The level of promoter methylation and gene expression of SOCS1 in peripheral blood were compared in both populations. Methylation was studied by using the conversion method with sodium bisulfite-PCR and analysis of melting curves. Results showed the "non-responders" group has significantly higher methylation levels ( $p < 0.0001$ ), which was consistent with a significant decreased gene expression obtained by relative quantification using real-time PCR and the Abl gene as the reference gene ( $p = 0.0209$ ). Both results agreed with the idea that a better management of the inflammatory state is associated with a good response to metformin. This work supports the concept that the immune system is crucial for the development of the pathology, and in particular, in the response to metformin. Also suggests that the genetic characteristics may give more exact clues to the physician when starting the therapeutic approach.

# 1-INTRODUCCION

- 1.1 Diabetes mellitus, la patología y su tratamiento
- 1.2 Aspectos inmunológicos de la patología
- 1.3 Genética y epigenética de la diabetes mellitus tipo 2
- 1.4 Justificación

# 1.1 DIABETES MELLITUS, LA PATOLOGÍA Y SU TRATAMIENTO

## 1.1.1 Contexto epidemiológico de la patología

La diabetes se encuentra entre las 10 principales causas de discapacidad en el mundo y socava la productividad y el desarrollo humano. Es uno de los desafíos de salud y desarrollo más importantes del siglo XXI. Cada año, más de cuatro millones de personas mueren por diabetes y decenas de millones más sufren complicaciones incapacitantes y potencialmente letales, como infarto de miocardio, ataque cerebrovascular (ACV), insuficiencia renal, ceguera y amputación, en muchos casos sin siquiera haber sido diagnosticados. Por estas razones la diabetes no es sólo una crisis sanitaria, es una catástrofe social mundial. De no emprenderse ninguna acción, se prevé que el número de personas con diabetes aumentará desde los más de 366 millones de 2011 hasta 552 millones en 2030 (o un adulto de cada diez) y otros 398 millones de personas estarían en alto riesgo de padecerla. A su vez, esta patología también tiene consecuencias negativas para algunas enfermedades infecciosas, y está implicada en otras enfermedades no transmisibles y la salud mental. Los gobiernos de todo el mundo luchan por cubrir los costes de la atención diabética. Tres de cada cuatro personas con diabetes viven hoy en países de ingresos medios y bajos. A lo largo de los próximos 20 años, las regiones de África, Oriente Medio y Sudeste Asiático soportarán el mayor aumento de la prevalencia de diabetes. Incluso en los países ricos, los grupos desfavorecidos, como los pueblos indígenas y las minorías étnicas, los migrantes recientes y los habitantes de barrios marginales sufren un mayor índice de diabetes y sus complicaciones. Ningún país, rico o pobre, es inmune a esta pandemia (Plan mundial contra la Diabetes 2011-2021, IDF).

La dinámica de la pandemia de diabetes está cambiando rápidamente. La que una vez fue una enfermedad del oeste, se ha extendido a todos los países en el mundo. La que una vez fue "la enfermedad de la abundancia" ahora es cada vez más común en lugares pobres.

Esta era también una enfermedad del adulto casi desconocida en los niños pero el aumento de las tasas de obesidad infantil ha determinado que sea cada vez más común en la población pediátrica, especialmente en ciertos grupos étnicos. A nivel mundial, se estima que la diabetes representó el 12% del gasto sanitario en 2010, por lo menos 376 mil millones de dólares, una cifra que se espera que llegue a 490 mil millones en 2030 (Zhang y col., 2010). Su creciente prevalencia y los problemas de salud asociados a las complicaciones crónicas derivadas pueden llegar a dificultar la economía de países en vías de desarrollo que poseen limitada infraestructura para el cuidado de la diabetes y están mal equipados para manejar esta epidemia. A pesar de todos los esfuerzos realizados para controlar esta enfermedad, hoy sigue siendo un desafío reducir los costes humanos y económicos por lo que los esfuerzos se enfocan en el diagnóstico precoz, un control más eficaz y la búsqueda de estrategias de prevención contra el desarrollo de nuevos casos.

Es así como uno de los objetivos primordiales planteados en el Plan mundial contra la diabetes 2011-2021 de la Federación Internacional de Diabetes (IDF) para lograr una exitosa lucha contra la diabetes, es la generación y utilización de pruebas científicas en forma estratégica para enfocar los trabajos de investigación hacia la búsqueda de mejores algoritmos de clasificación y determinación del tratamiento adecuado. Generar pruebas que sirvan de fundamento a los esfuerzos por combatir la diabetes exige el compromiso de una amplia gama de métodos y disciplinas de investigación, que incluyen, entre otros, la medicina clínica y de laboratorio, la salud pública, la educación, la sociología, la psicología, la agricultura, la arquitectura y el urbanismo y la economía.

No todos los países tienen la capacidad de emprender investigaciones integrales, pero generar y aplicar las pruebas locales a la política y la práctica puede ser una herramienta poderosa para conseguir el máximo provecho del gasto sanitario. La eficiencia de los fondos para la investigación se puede optimizar mediante:

- El desarrollo de una agenda priorizada de investigación nacional que identifique los vacíos de conocimiento.

- Desarrollar la capacidad de investigación dando respaldo a la investigación centrada en las prioridades identificadas.

Es necesario identificar los procesos y los mecanismos, que hayan sido más eficaces y relevantes, procedentes de la investigación, para incluirlos dentro de las políticas y las prácticas. Además, los esfuerzos por evaluar los métodos y los mecanismos para mejorar la prevención de la diabetes y para mejorar y facilitar la distribución de medicamentos y tecnologías, especialmente en las comunidades remotas faltas de recursos, deberían perseguirse como un desafío mundial de investigación a gran escala, al igual que encontrar una cura tanto para la diabetes tipo 1 (DT1) como para la tipo 2 (DT2). También se plantea la importancia de monitorizar, valorar y comunicar los resultados logrados por las últimas investigaciones.

### **1.1.2 Definición y patogenia**

La diabetes es una de las cuatro enfermedades no transmisibles (ENT) prioritarias identificadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), junto con la enfermedad cardiovascular (ECV, que incluye el infarto de miocardio y ACV), el cáncer y la enfermedad respiratoria crónica (OMS, 2001). Se caracteriza por una hiperglicemia (altos niveles de glucosa en la sangre), que es el resultado de la falta de insulina (en DT1) o que haya insulina insuficiente y resistencia a la misma (en DT2) (American Diabetes Association, ADA, 2011a).

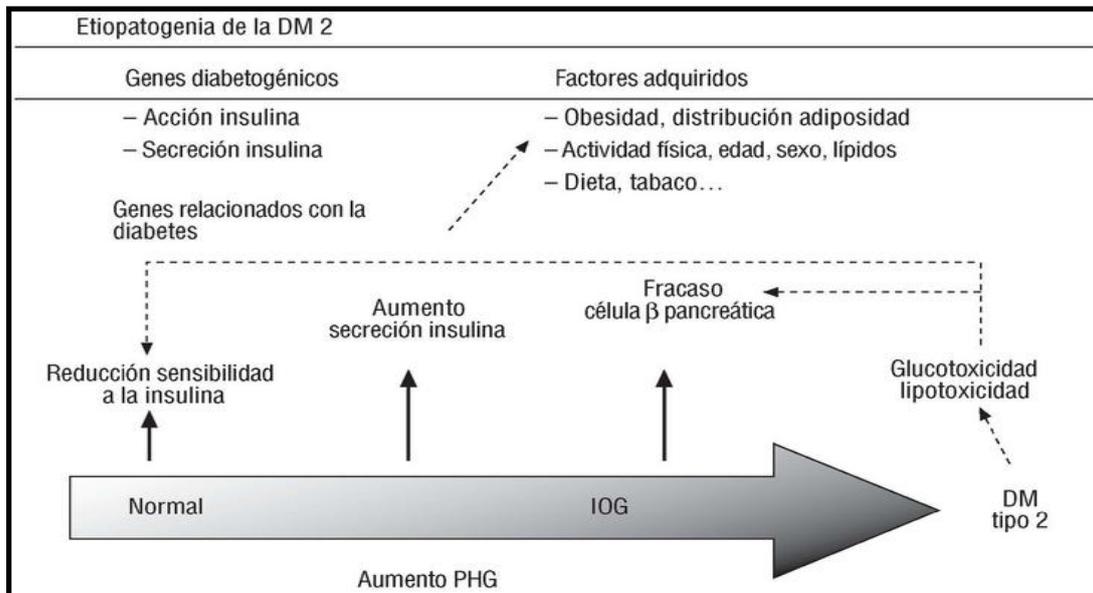
Tiene un componente genético y algunas personas sencillamente son más susceptibles que otras de desarrollar diabetes. La diabetes es una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. La insulina es una hormona que regula los niveles de azúcar en la sangre. El efecto de la hiperglicemia no controlada conduce, con el tiempo, a daño grave de muchos órganos y sistemas, especialmente los nervios y los vasos sanguíneos. La DT2 en particular se debe a una utilización ineficaz de la insulina (insulino-resistencia, IR), fundamentalmente en los primeros años del desarrollo de la enfermedad, dado que a medida que progresa la patología se acentúa

el déficit de insulina o la insulinopenia. Este tipo de diabetes representa el 90% de los casos mundiales y se debe en gran medida a un peso corporal excesivo y a la inactividad física. Es una patología paucisintomática (con pocos síntomas), lo que conlleva a un diagnóstico tardío y frecuentemente en el contexto de una complicación macrovascular (Infarto Agudo de Miocardio, IAM) o microvascular (RPD-Retinopatía diabética). Rara vez los síntomas son similares a los de la DT1, en el momento del diagnóstico (OMS, 2011).

### **1.1.3 Diabetes mellitus tipo 2 (DT2)**

La DT2 aparece como resultado de una interacción compleja entre factores genéticos y ambientales que definen la etiopatogenia de la DT2 (figura 1). Las personas susceptibles a desarrollarla heredan un conjunto de alelos que provocan que sus tejidos sean resistentes a la insulina (DeFronzo, 1988; Eriksson y col., 1989; Rothman y col., 1995; Pratipanawatr y col., 2001; Kashyap y col., 2003; Morino y col., 2005; Pendergrass y col., 2007; Groop y Lyssenko, 2008). A nivel particular de los órganos implicados en su etiopatogenia, en el hígado la resistencia a la insulina se manifiesta por una sobreproducción de glucosa durante el estado basal y una supresión de la producción de glucosa hepática (HGP) en respuesta a la insulina (Groop y col., 1989).

A nivel de tejido muscular (DeFronzo y col., 1979; DeFronzo y col., 1985; Groop y col., 1989; Pendergrass y col., 2007), la resistencia a la insulina se manifiesta por el deterioro de la captación de glucosa después de la ingesta de hidratos de carbono, observándose hiperglicemia postprandial (después de una comida) (Ferrannini y col., 1988). Como decíamos anteriormente, aunque los orígenes de la resistencia a la insulina se pueden remontar a sus antecedentes genéticos (DeFronzo, 1997; Groop y Lyssenko, 2008) la epidemia de DT2 se asocia a lugares de epidemias de obesidad y poca actividad física (James, 2008; DeFronzo, 2009).



**Figura 1:** Etiopatogenia de la Diabetes mellitus tipo 2. PHG: producción hepática de glucosa; IOG: tolerancia disminuida a la glucosa (Conget, 2002).

Los criterios diagnósticos de diabetes o trastornos de la regulación de glucosa se basan en los puntos de corte para plasma o suero venoso detallados en la tabla 1.

**Tabla 1:** Criterios diagnóstico de Diabetes Mellitus o trastornos de la regulación de la glucosa. Tomado de las Guías de la Asociación Latinoamericana de Diabetes, ALAD (2013).

	Normal	"Prediabetes"		Diabetes Mellitus
		Glucemia de ayuno alterada (GAA)	Intolerancia a la glucosa (IGA)	
<b>Glucemia de ayuno</b>	<100 mg/dL	100 - 125 mg/dL	No aplica	$\geq$ 126 mg/dL
<b>Glucemia 2 horas poscarga</b>	<140 mg/dL	No aplica	140 - 199 mg/dL	$\geq$ 200 mg/dL
<b>Hemoglobina glucosilada A1c</b>	<5.7 %	5.7 - 6.4%		$\geq$ 6.5%

Los pacientes con DT2 pueden presentar características tanto de resistencia a la insulina como defectos en la secreción de insulina, aunque existe controversia en cuanto a que defecto (la resistencia a la insulina o la disfunción de las células  $\beta$ ), representa la alteración primaria (DeFronzo, 2009; DeFronzo y Tripathy, 2009). Existen evidencias a favor de un desarrollo en dos etapas de la DT2. Durante el primer estadio, individuos con tolerancia normal a la glucosa progresarían hacia la intolerancia a la glucosa con resistencia a la insulina como el principal factor determinante.

En el estadio siguiente, habría un aumento de la intolerancia a la glucosa en asociación con un progresivo deterioro de la función de las células  $\beta$  (Buchanan y col., 2002; Abdul-Ghani y col., 2006a; Abdul-Ghani y col., 2006b; DeFronzo, 2009). La progresión de la intolerancia a la glucosa en la diabetes también se asocia con una pequeña disminución en sensibilidad a la insulina (Saad y col., 1991; Abdul-Ghani y col., 2006a; DeFronzo, 2009). La resistencia a la acción de la insulina es una discapacidad característica de DT2 (DeFronzo y Ferrannini, 1991; DeFronzo, 2009) y tiene lugar en el hígado (DeFronzo, 2009), tejido muscular (DeFronzo, 2009; DeFronzo y Tripathy, 2009) y en el tejido adiposo (DeFronzo, 2009). La resistencia a la insulina es el rasgo más notable y juega un papel fundamental en el desarrollo de la DT2 (Gulli y col., 1992; DeFronzo, 1997; Weyer y col., 2001; Abdul-Ghani y col., 2006a; Abdul-Ghani y col., 2006b; DeFronzo, 2009). Familiares de primer grado de diabéticos tipo 2 (que tienen un alto riesgo de desarrollar diabetes) son individuos notablemente resistentes a la insulina (Gulli y col., 1992; DeFronzo, 2009). Del mismo modo, las personas con intolerancia a la glucosa que son resistentes a la insulina manifiestan hiperinsulinemia compensatoria (Saad y col., 1991; DeFronzo, 1997; Abdul-Ghani y col., 2006a; Abdul-Ghani y col., 2006b; DeFronzo, 2009). Esta hiperinsulinemia refleja una resistencia a la insulina subyacente (Gulli y col., 1992; Abdul-Ghani y col., 2006a; Abdul-Ghani y col., 2006b; DeFronzo, 2009).

En resumen, la resistencia a la insulina es una característica universal de la DT2 y ocurre al principio de la historia natural de la enfermedad, es decir, las personas con intolerancia a la glucosa son individuos genéticamente predispuestos.

Por lo tanto, las intervenciones diseñadas para mejorar la sensibilidad a la insulina en sujetos con intolerancia a la glucosa tienden a ser eficaces en la prevención y en el retraso en la progresión de intolerancia a la glucosa y a DT2.

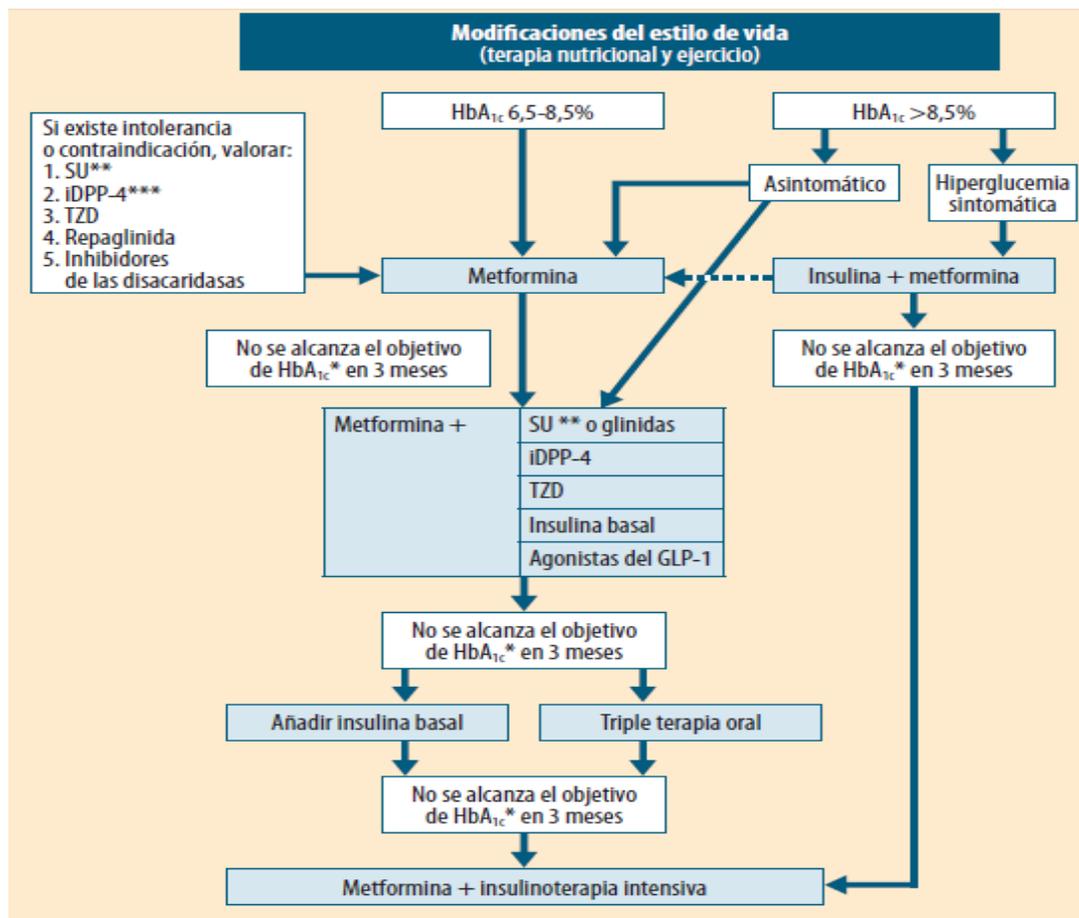
De este modo, se plantean objetivos de control, tanto en la etapa de prevención como en la terapéutica, utilizando valores paraclínicos de rutina. En la siguiente tabla se exponen los objetivos de control en el paciente con diabetes sugeridos por asociaciones de Diabetes a nivel mundial.

**Tabla 2:** Objetivos de control en el paciente con Diabetes en base a Position Statement, ADA (2011b) y guía de tratamiento de la Canadian Diabetes Association (2008).

FACTOR	OBJETIVO
HbA1c (%)	<6.5
Glicemia basal/Preprandial (mg/dL)	70-126
Glicemia posprandial (mg/dL)	<200
Colesterol LDL (mg/dL)	<36
Triglicéridos (mg/dL)	<180
PA (mmHg)	<130/80
Tabaco	NO

#### 1.1.4 Abordaje terapéutico inicial

La mayoría de los diabéticos tipo 2 inicia su padecimiento con pocas manifestaciones clínicas, lo que determina que muchos sean diagnosticados tardíamente por escasa o nula sintomatología. Si el paciente está clínicamente estable, poco sintomático, sin cetosis, con glucosa de ayuno entre 126 mg/dl (7 mmol/l) y 240 mg/dl (13.3 mmol/l), y/o HbA1c < 9%, se recomienda iniciar un estilo de vida saludable, con una alimentación adecuada, ejercicio regular y se debe cesar el consumo de tabaco y alcohol si corresponde. Junto con estas recomendaciones iniciar Metformina en dosis de 500 a 850 mg/día con incremento de 500 a 850 mg cada 1 a 2 semanas para alcanzar en forma progresiva la dosis máxima de 2.5 gr/día, si fuera necesario, para lograr meta terapéutica en un plazo de 3 meses. En la figura 2 se expone el algoritmo aconsejado para el tratamiento de la DT2. Además de reconocer todos los efectos terapéuticos de la Metformina, y la evidencia demostrada en la disminución de complicaciones cardiovasculares a mediano y largo plazo, es un fármaco de fácil acceso para prácticamente todas las poblaciones latinoamericanas. (ALAD, 2010).



**Figura 2:** Algoritmo 2010 de la Sociedad Española de Diabetes sobre el tratamiento farmacológico de la hiperglucemia en la DT2 (Menéndez y col., 2010).

### 1.1.5 Metformina como fármaco de primera elección

Tanto el documento conjunto de las sociedades de diabetes estadounidense (ADA) y europea (EASD) sobre el tratamiento de la DT2 (Nathan y col., 2006) como la guía clínica de la International Diabetes Federation (IDF) (Home, 2006) consideran la Metformina como el fármaco de primera elección en monoterapia, reservando los demás fármacos orales y la insulina para el tratamiento combinado con Metformina.

La Metformina es un fármaco perteneciente a la familia de las biguanidas. Es un agente insulino-sensibilizador y también disminuye la producción de glucosa hepática (Krentz y col., 2005). El mecanismo de acción principal de Metformina es la reducción de la producción hepática de glucosa mediante la disminución de la gluconeogénesis hepática, aunque, en menor grado, también aumenta la captación de glucosa en la célula muscular.

La Metformina es la única biguanida recomendada, tanto en adultos como en adolescentes y niños mayores de 10 años, ya que fenformina y buformina tienen un riesgo inaceptablemente elevado de acidosis láctica (Mata Cases y col., 2004; Saenz Calvo y col., 2005)

### **1.1.6 Fallas en el tratamiento con fármacos orales**

El control intensivo de la glucosa en sangre puede reducir y retrasar significativamente las complicaciones microvasculares como la retinopatía, nefropatía y neuropatía (Schellhase y col., 2005). Los efectos comparativos de los fármacos orales para la diabetes y sus resultados clínicos son inciertos (Bolen y col., 2007). Existe una gran variación interindividual en la respuesta a fármacos antihiper glucémicos y no se ha encontrado hasta la fecha, un único tratamiento que asegure el control de la glucosa en sangre (Krentz y col., 2005). En un gran número de pacientes se observa que a pesar de tener buena adherencia al tratamiento requieren otra medicación debido a la falla del tratamiento con Metformina. La historia natural de la DT2 va siempre hacia la falla del tratamiento oral. En general, con monoterapia oral sólo se logra una reducción de 1–1,5% en los valores de la HbA1C y adicionando un segundo medicamento se consigue disminuir la HbA1C otro 1,5% más (Defronzo, 1999; Levobitz, 2001; Leahy, 2003).

La eficacia del tipo de droga de la Metformina se puede medir en términos de reducción de la hemoglobina glicosilada (HbA1c), en un rango de entre 1.0 y 1.5% como monoterapia inicial. Esta respuesta favorable no se observa de forma general y regular en la práctica médica sino que existe una variabilidad interindividual en la respuesta al fármaco.

Dadas las variaciones en los grados de respuesta a las drogas se realizan revisiones constantes a los consensos en cuanto a la conducta terapéutica a seguir para la DT2 (Nathan y col., 2006).

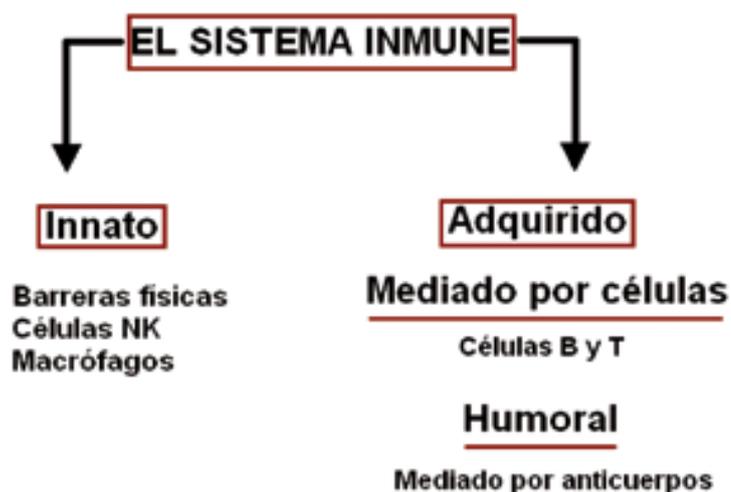
## 1.2 ASPECTOS INMUNOLÓGICOS DE LA PATOLOGÍA

### 1.2.1 Inmunología y Diabetes mellitus tipo 2 hoy

Existe evidencia que la DT2 está relacionada con una desregulación del sistema inmune (Feurerer y col, 2009; Liu y col, 2009; Nishimura y col, 2009). Dentro de la clasificación actual existen pacientes en los que es difícil definir qué tipo de diabetes presentan; hay un número creciente de sujetos jóvenes que serían clasificados como DT2, por ser obesos y presentar resistencia a la insulina, pero también como DT1 porque presentan autoanticuerpos contra células  $\beta$  (Pozzilli y Buzzetti, 2007). A esto se le agrega una afectación del sistema inmunitario que interfiere en la defensa contra patógenos como se reveló en un estudio retrospectivo de 15 años donde se observó un riesgo 41 veces mayor de muerte por infecciones en pacientes con DT2 en comparación con la población sana (Seacrest y col., 2010; Chen y col, 2013).

La DT2 junto con la diabetes autoinmune en adultos, LADA del inglés “Latent Autoimmune Diabetes in Adults”, entre un 10-20% de los adultos diabéticos) están caracterizadas por la participación etiopatogénica de componentes inmunológicos y genéticos altamente heterogéneos.

En términos inmunológicos, mientras el LADA está esencialmente influenciado por la inmunidad adquirida humoral (autoanticuerpos); (Pozzilli y Di Mario, 2001), la etiopatogenia de la DT2 posee un componente inmunológico representado por la inmunidad innata (Kolb, 2005). Como se observa en la figura 3 el sistema inmune tiene dos líneas de defensa: mientras el sistema inmune innato es la primera línea de defensa, sin especificidad ni memoria, la inmunidad adquirida o adaptativa utiliza mecanismos celulares y de reconocimiento más especializados y basados en el aprendizaje de memoria (Cañas, 2011).



**Figura 3:** Tipos de respuesta inmune: innata, como son las barreras físicas, las células asesinas naturales (NK-natural killer), o los macrófagos, entre otros, los cuales nos defienden en forma general, sin dirigirse a antígenos específicos previamente reconocidos; y adquirida o adaptativa, con respuestas a antígenos específicos y previamente reconocidos empleando dos tipos de estrategias, una mediada por células (linfocitos B y T) y otra con la producción de anticuerpos (Cañas, 2011).

Los factores huésped-específicos han sido implicados en la contribución a las anomalías de la inmunidad innata y adaptativa. En la diabetes se han observado anomalías de la inmunidad innata mediada por leucocitos, macrófagos, células asesinas naturales, y las células dendríticas (Robertson y Polk, 1974; Repine y col, 1980; Geerlings y Hoepelman, 1999). Se ha visto que la diabetes también deteriora la inmunidad adaptativa vía inmunidad celular (Mahmoud y col, 1976; Plouffe y col, 1978) e inmunidad humoral (Geerlings y Hoepelman, 1999). Estos trastornos de la inmunidad mediada por células en la diabetes se reflejan en una reducción de la adhesión de leucocitos, la quimiotaxis y la fagocitosis, estallido oxidativo, alteración de las actividades bactericidas intracelulares, y disminución de la producción de moléculas antimicrobianas extracelulares (Geerlings y Hoepelman, 1999; Summers y col, 2006; Andreasen y col, 2010). Otro factor de común aparición en estos pacientes es la elevación de la proteína C reactiva (producida por el hígado) la cual promueve la inflamación de las células endoteliales, estimula la expresión del inhibidor 1 del activador de plasminogeno (PAI-1 del inglés) y de moléculas de adhesión vascular, así como aumenta la síntesis de “Monocyte chemoattractant protein-1” (MCP-1), todos factores que promueven la inflamación endotelial. Estos mecanismos aumentan el riesgo para el desarrollo de diabetes y sus complicaciones debido a que la hiperglicemia sostenida genera aún más daños en estos tejidos inflamados (Sjoholm y Nystrom, 2005).

Esta afectación general del sistema inmunológico también resulta en un aumento de los perfiles de expresión de citoquinas proinflamatorias. Las citoquinas son moléculas de bajo peso molecular secretadas en respuesta a un estímulo inmune. Su secreción es un acontecimiento breve y autolimitado, presentándose en altos niveles ante ciertas agresiones. Estas proteínas inician cascadas de señalización intracelulares con dos objetivos, inducir la activación de genes en respuesta a agresiones y propagar la señal del estímulo a otras células. Lo hacen uniéndose a receptores de membrana que desencadenarán la señalización interna (Abbas y Lichtman, 2003). La síntesis de citoquinas, como el factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleuquina (IL)-6, también puede ser estimulada por el aumento de glucosa y de ácidos grasos circulantes, en distintos tejidos como el adiposo, hígado y músculo (Dandona y col., 2004; Gregor y Hotamisligil, 2011). La glucosa, los ácidos grasos y los metabolitos resultantes de su oxidación incompleta pueden inducir directamente, tanto la expresión de genes de respuesta como la síntesis de citoquinas proinflamatorias (Dandona y col., 2004). La respuesta por citoquinas es de carácter transitorio en caso de que el estímulo agresor sea resuelto.

En el caso de la desregulación inmunológica característica de la diabetes, la inflamación crónica, el estímulo no cede ya que la hiperglicemia sin controlar es sostenida y la respuesta por citoquinas se hace crónica (Hotamisligil, 2006).

### **1.2.2 Inflamación en Diabetes tipo 2**

La inflamación es una respuesta local protectora llevada a cabo por el sistema inmune en los tejidos dañados. A nivel microscópico esta respuesta deriva en vasodilatación, acumulación de leucocitos, aumento de la permeabilidad y aumento de la circulación de moléculas características de esta respuesta como la proteína C reactiva (Cone, 2001).

La inflamación aguda es de instalación inmediata y de corta duración, mientras que la inflamación crónica es de duración prolongada y está relacionada con la respuesta dada por los linfocitos y los macrófagos, por la proliferación de vasos sanguíneos y la disfunción del endotelio, así como por la fibrosis y la destrucción tisular (González-Chávez y col., 2011). La inflamación crónica es una característica de la diabetes (Hotamisligil, 2006) ya que existe un elevado nivel de marcadores inflamatorios circulantes, tales como: proteína C reactiva, IL-6, TNF- $\alpha$  y fibrinógeno (Maedler y col., 2002; Cho y col., 2011).

En el trabajo realizado por Pham y colaboradores (2011) observaron mayores concentraciones de citoquinas en sangre periférica en pacientes con DT2, mientras que los niveles de pacientes con LADA y la diabetes tipo 1 fueron similares. A su vez, los pacientes con diabetes tipo 2 mostraron una elevación de las concentraciones de citoquinas a nivel sistémico de forma independiente al valor de índice índice de masa corporal (IMC).

La inflamación en la diabetes tiene distintos orígenes. En el tejido adiposo es promovida por la secreción de citoquinas cuando la diabetes es acompañada por obesidad. El tejido adiposo tiene la función de almacenar eficientemente la energía, pero también funciona como un órgano endócrino, ya que de él se liberan distintas quimoquinas y citoquinas bio-activas, tales como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL1, entre otras, lo que se observa exacerbado cuando este tejido además está infiltrado por macrófagos (Berg y col., 2005; Hotamisligil, 2006; Shoelson y col., 2006). El tejido adiposo de individuos obesos tiene un contexto inflamatorio y altas cantidades de IL-6, IL-1 y TGF, macrófagos, células T citotóxicas y Th1, mientras que los niveles de células Treg han disminuido (Wellen y Hotamisligil, 2005). El aumento en la secreción de citoquinas proinflamatorias provoca un círculo vicioso en la obesidad, ya que en la medida que comienza a aumentar su concentración en la circulación, se produce la disfunción del tejido adiposo, se reduce la sensibilidad a la insulina del adipocito y con ello aumenta aún más la secreción de estas moléculas de señal inflamatoria (Dandona y col., 2004; Gregor y Hotamisligil 2011).

Estudios en ratones han mostrado que los ratones delgados tienen una mayor cantidad de Tregs, las cuales desaparecen en ratones obesos (Feuerer y col., 2009). Esto podría deberse a la infiltración de células Th1 en ratones obesos, lo cual disminuye las Tregs y favorece la infiltración por células T citotóxicas y macrófagos (Winer y col., 2009). Las células T citotóxicas infiltradas en el tejido adiposo favorecen un contexto infamatorio y el reclutamiento de macrófagos (Nishimura y col., 2009). Curiosamente, la inflamación inicial podría ser causada por los mastocitos, células del tejido conjuntivo que median procesos de inflamación y alergias, ya que la inhibición de la activación de éstos redujo el incremento de peso y la resistencia a la insulina en ratones (Liu y col., 2009). Estos estudios plantean la posibilidad que la DT2 tenga causas relacionadas con el sistema inmune en la constante inflamación del tejido adiposo. Es por esto que muchos de los trabajos se han enfocado al estudio de genes inmunológicos y de control de la inflamación en forma tejido específica, y particularmente en tejido adiposo. En revisiones como las realizadas por Ronn y colaboradores (2007) se constata que en la mayoría de los artículos citados son realizados para analizar genes inmunológicos en tejido adiposo o en islotes pancreáticos principalmente. Otros trabajos, como el de Liu y colaboradores (2008) refieren a proteínas de regulación de la inflamación asociados a complicaciones como la retinopatía donde también el enfoque es tejido específico. Sin embargo la inflamación crónica descrita para DT2 se observa también a nivel del endotelio y tejido conjuntivo (González Chávez, 2006).

Si las condiciones a las que son sometidas las células endoteliales se modifican, por hiperlipidemia, estrés oxidativo, hipertensión, hiperglicemia o tóxicos ambientales, estas células variarán su fenotipo hacia un estado proinflamatorio. Esto implica una menor disponibilidad local de óxido nítrico (NO), mayor síntesis de moléculas de adhesión que atraerán leucocitos y plaquetas, incremento de permeabilidad y síntesis de citoquinas, que favorecerán la proliferación y migración de células musculares lisas y fibroblastos. Este conjunto de cambios reciben el nombre de disfunción endotelial (Dalli Peydró, 2005).

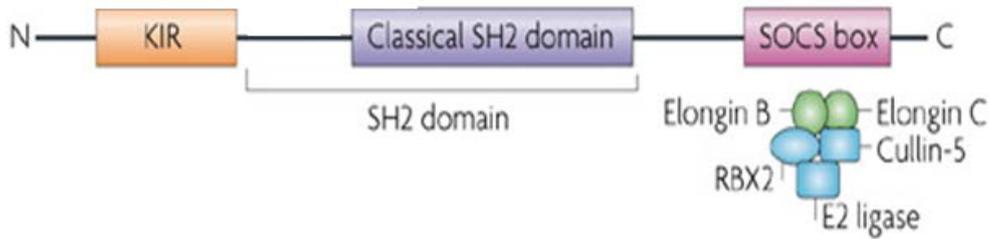
El estrés oxidativo modifica directamente el fenotipo en las células endoteliales incrementando la expresión génica de citoquinas proinflamatorias y moléculas de adhesión, introduciendo el concepto etiopatogénico de inflamación crónica de bajo grado, la cual también contribuye al mecanismo patogénico de resistencia a la insulina y aparición de la DT2 (Hu y Stampfer, 2003). La edad, marcadores inflamatorios de alta sensibilidad (proteína C-reactiva, TNF, IL-6), adiponectina, y ferritina también se han demostrado predictores del riesgo futuro para la diabetes (Knowler y col., 2002).

Tanto la hiperglicemia como la inflamación constituyen factores de riesgo para el desarrollo de complicaciones de la diabetes, tales como enfermedad cardiovascular y nefropatía (Kaiser y col., 2003; Kim y col., 2008). En el síndrome metabólico incluso se ha propuesto tener en cuenta, como parte de su definición, los valores séricos de marcadores inflamatorios como la proteína C reactiva, la interleucina-6 (IL-6) y al factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), entre otros (Devaraj y col., 2003; Soto González y col., 2006).

### **1.2.3 Marcador molecular de sistema inmune: Socs1**

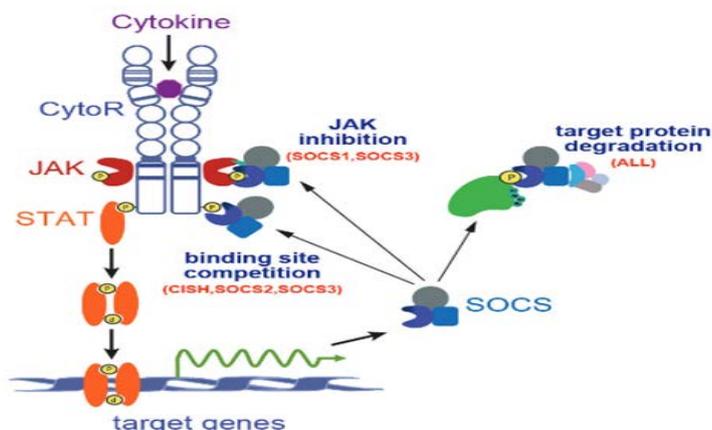
La familia SOCS comprende 7 miembros de proteínas intracelulares inducibles por citoquinas (CIS; SOCS1 a SOCS7), cada una tiene un dominio N-terminal variable, un dominio central SH2, y uno conservado C terminal llamado caja SOCS (Figura 4).

Las proteínas SOCS1 y SOCS3 están implicadas en la etiología de resistencia a la insulina, la obesidad y el síndrome metabólico (Emanuelli y col., 2001; Emanuelli y col., 2004). Todos los miembros de la familia pero particularmente SOCS1 y SOCS3 controlan la magnitud y la duración de las señales que utilizan la vía JAK/STAT por diversos mecanismos que incluyen la inhibición directa de la señal JAK, la unión a STAT, y el marcaje de proteínas del complejo receptor para su degradación en el proteosoma (Wormald y col., 2006; O'Sullivan y col., 2007; Yoshimura y col., 2007).



**Figura 4:** Estructura del supresor de la señalización de citoquinas 1 (SOCS1). La caja SOCS se conserva en todos los miembros de la familia pero solo los miembros CIS, SOCS1 y SOCS3, poseen el dominio SH2 inducible. La función de la caja SOCS es el reclutamiento del sistema ubiquitina-transferasa. (Yoshimura y col., 2007)

La expresión del gen *Socs1* es inducida por los factores de transcripción STAT6 y STAT1, cuando se unen moléculas como interferones e interleuquinas a los receptores de citoquinas. La unión de citoquinas a sus receptores transmembrana activa la vía de señalización JAK-STAT por la cual se fosforilan los factores STAT para entrar al núcleo a inducir la expresión de SOCS. Cuando existen proteínas SOCS intracelulares, estas se unen al dominio de fosforilación impidiendo la activación de la vía JAK-STAT. La mayoría de estas proteínas SOCS son inducidas por citoquinas de tal forma que sirven como loops de autoinhibición, o feedback negativo (Yoshimura y col., 2007). Al unirse la citoquina a su receptor en la membrana celular se activa una cascada de fosforilación intracelular en la vía JAK-STAT que promueve la expresión de genes inflamatorios y de SOCS. Una vez que las proteínas SOCS estén en el citoplasma inhibirán la cascada de fosforilación que señalice las citoquinas que lleguen posteriormente a los receptores, por lo que se inhibe su señal (Figura 5).



**Figura 5:** Mecanismo molecular mediante el cual las proteínas SOCS1 y SOCS3 regulan la señal de citoquinas (Trentham y Ward, 2013).

Las proteínas SOCS se inducen rápidamente en muchos tipos de células en respuesta a las citoquinas (IFN, IL-1, IL-6) o factores de crecimiento (factor neurotrófico ciliar, factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento de fibroblastos), y sus efectos son transitorios debido a su corta vida media (Egwuagu y col., 2002; Samardzija y col., 2006). En general, el nivel de expresión de los genes Socs en las células es bajo, pero es altamente inducible, a menudo de una manera transitoria, por la estimulación con citoquinas tanto *in vitro* como *in vivo* (Larsen y Ropke, 2002). Sin embargo, la expresión de Socs en forma constitutiva se produce en los tejidos donde la estimulación es constante, ya sea por inflamación crónica o estrés celular, lo que lleva a un silenciamiento de las vías celulares esenciales y la predisposición al desarrollo de la enfermedad órgano específica (Liu y col., 2008).

En el trabajo de Liu y colaboradores (2008) se establece una correlación entre la regulación positiva de SOCS1 y SOCS3 en la retina, como otro de los tejidos que sufren mayor daño por la hiperglicemia, para varios modelos animales y celulares, donde se observa que estas proteínas estimulan el metabolismo de la glucosa mitigando la inflamación. Para la proteína SOCS1 en particular, se ha demostrado su capacidad de suprimir totalmente la señalización de IFN- $\gamma$  en la célula  $\beta$  (Cottet y col., 2001; Flodstrom-Tullberg y col., 2003).

#### **1.2.4 Marcador molecular de sistema inmune: HLA-DQB1\***

La identidad de las variantes de ADN principalmente responsables de DT1 han sido establecidas en un superlocus que consiste en una combinación de polimorfismos de nucleótido único (SNP) en el exón 2 del antígeno leucocitario humano (HLA) clase II DQB1 y DRB1 (Cucca y Todd, 1996). La susceptibilidad está dominada, en poblaciones europeas o derivadas, por dos loci haplotipos DRB1\*0301 (DR3)-DQB1\* 0201 y DRB1 \* 04 (DR4) -DQB1\* 0302. En otras poblaciones, como afro-caribeños, aparecen otros haplotipos como DR7, donde el riesgo para DT1 se define mejor como una combinación de los tres haplotipos, éste y los dos citados anteriormente (Todd y col., 1987).

Está descrita la presencia de alelos de riesgo HLA-DQB1\* 0201 y 0302 en pacientes con DT2 en mayores porcentajes que en controles así como disminuida la presencia de alelos protectores como el 0602 en DT2 respecto de controles. Se observa también la detección de autoanticuerpos contra GAD y alta insulino-resistencia en estos pacientes (Tuomi y col., 1999). Más del 5-10% de los pacientes con diagnóstico de DT2 tiene marcadores de autoinmunidad contra células  $\beta$  y la presencia de alelos de riesgo HLA-DQB1 correlaciona fuertemente con la deficiencia de insulina (Maiolo y col., 2010). Los genotipos HLA-DQB1 de mayor riesgo se observan en 19.6 vs. 14.0% en LADA y DT2 respectivamente (Andersen y col., 2010).

Si bien los porcentajes de pacientes diabéticos tipo 2 que presentan estas variantes génicas, así como anticuerpos anti células  $\beta$ , es bajo es importante cubrir este aspecto en el análisis de cualquier otro componente del sistema inmune.

## **1.3 GENÉTICA Y EPIGENÉTICA DE LA DT2**

### **1.3.1 Genética de la DT2**

Además de la influencia medioambiental ya citada para la DT2, ésta presenta etiopatogenia también de carácter genético. Dado que la prevalencia de DT2 es mayor en ciertas poblaciones como se evidencia en estudios individuales y familiares, los factores genéticos juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad (Elbein, 2002). A partir de los análisis por agregación familiar sabemos que el riesgo de desarrollar DT2 es aproximadamente 4.3 veces mayor en la descendencia de las personas con DT2 que en la descendencia de individuos sin antecedentes familiares de diabetes. Incluso el riesgo de desarrollarla muestra diferentes relaciones entre los hijos de un solo parental diabético (40%) y de dos padres diabéticos (70%) (Groop y Tuomi, 1997; Barroso, 2005).

Hoy en día se han realizado estudios de ligamiento, de genes candidatos, y estudios de asociación de genoma completo (“genome-wide association Study”, GWAS) para varias poblaciones (Ahlgqvist y col., 2011) con el fin de identificar loci genéticos asociados con la DT2 pero en todos los casos se arriba a la conclusión de que muchos genes hacen pequeñas contribuciones y no existen marcadores genéticos de alta determinación.

En relación al gen *Socs1*, mencionado anteriormente, existen polimorfismos descritos en humanos en la región promotora del gen *Socs1*, como los rs33977706 (-20 G>T) y rs243330 (-1456 G>A), que han mostrado asociación con una mejor sensibilidad a la insulina (Gylvin y col., 2009). A su vez, para el SNP rs33977706, se ha descrito su influencia en la actividad transcripcional del gen (Harada y col., 2007). En este contexto también se ha demostrado que la supresión de *Socs1* a partir de células mieloides y linfoides crea aumentos en la inflamación (en ratones diabéticos) (Chong y col., 2005), apoyando la hipótesis que la inflamación sostenida puede conducir a la resistencia a la insulina (Sachithanandan y col., 2011).

### **1.3.2 Epigenética**

La expresión preferencial de genes es heredable, en parte, gracias a diversos mecanismos epigenéticos y de microARN, permitiendo que la identidad de la célula sea mantenida sin necesidad de factores externos. Los genes de las citoquinas INF, IL-4 e IL-17 tienen marcas epigenéticas permisivas y represivas. Como un ejemplo, los genes que codifican para las citoquinas INF e IL-4 muestran desmetilación CpG, asociada con expresión génica (O`Shea y Paul, 2010). En el genoma humano, las citosinas metiladas se encuentran en dinucleótidos CpG cuya naturaleza palindrómica permite el mantenimiento de los patrones de metilación por metiltransferasas de ADN después de la replicación de éste. Las regiones de ADN con un contenido relativamente alto de dinucleótidos CpG se conocen como islas CpG. Estas Islas CpG se distribuyen de una manera no aleatoria en todo el genoma humano y a menudo abarcan la región del promotor y el primer exón de los genes (Zuo y col., 2009).

La metilación del ADN cada vez se está estudiando más en enfermedades complejas humanas, más allá del cáncer y los trastornos específicos de la impronta. La metilación de citosinas permite la codificación de la información epigenética directamente sobre el ADN.

Para el gen *Socs1* específicamente contamos con estudios en los que se investiga la metilación del gen como determinante para su expresión en otras patologías como por ejemplo en el trabajo de Komazaki y colaboradores (2004), donde se documenta una reducción de la expresión *SOCS1* en los cánceres pancreáticos humanos primarios, a menudo acompañada por hipermetilación de la región promotora del gen; o la influencia en el mieloma múltiple de la regulación de la metilación de *Socs1* en su región promotora (Benetatos, 2013).

## 1.4 JUSTIFICACIÓN

La existencia de varios estudios acerca de las proteínas SOCS asociadas a la sensibilidad a la insulina, en distintos tejidos y modelos animales, así como en humanos, atrajo nuestro interés para el estudio del gen *Socs1* como el más ampliamente asociado a la sensibilidad a la insulina endógena. Existen polimorfismos descritos en humanos en la región promotora del gen *Socs1*, como los rs33977706 (-820 G>T) y rs243330 (-1456 G>A), que han mostrado asociación con una mejor sensibilidad a la insulina (Sachithanandan y col., 2011). A su vez, para el SNP rs33977706, se ha descrito su influencia en la actividad transcripcional del gen (Harada y col., 2007; Gylvin y col., 2009). En este contexto también han demostrado que la supresión de *Socs1* a partir de células mieloides y linfoides crea aumentos en la inflamación (en ratones) (Chong y col., 2005), perdiéndose la función de atenuación de la inflamación. Este mecanismo podría ser la explicación de la asociación entre el aumento de expresión de *Socs1* y la mejora en la sensibilidad a la insulina (Sachithanandan y col., 2011). La proteína *SOCS1* mostró proteger las células  $\beta$  *in vitro* en un estudio realizado en ratones NOD (Verdaguer y col., 1997), por lo que es sugestivo plantear la hipótesis de un efecto protector de la expresión de *Socs1* contra el desarrollo de la diabetes *in vivo* (Ronn y col., 2007).

La función biológica de SOCS1 es la atenuación de señales proinflamatorias. Estudios acerca de estos posibles mecanismos aportarían conceptos importantes en relación al desarrollo de la patología y su patogenia. La perpetuación de la respuesta inflamatoria es también dañina para los distintos sistemas cuando no cesa el estímulo agresor, en este caso la hiperglicemia sostenida. La asociación entre el aumento de la sensibilidad a la insulina y la expresión de genes Socs podrían deberse entonces a un mejor manejo del estado proinflamatorio y por ende un ambiente más favorable para la acción correcta de la insulina.

A esto se le suma que el fármaco más ampliamente utilizado para controlar la DT2 es la Metformina y tiene como objetivo principal acrecentar la sensibilidad a la insulina propia del individuo. La variabilidad de respuesta observada para la Metformina podría explicarse por las características propias del sistema inmune de cada individuo que podrían generar variabilidad en el manejo del estado inflamatorio asociado a la DT2.

Hoy por hoy no existen predictores de respuesta para la Metformina, sino que esta se evalúa *a posteriori*. La existencia de predictores genéticos/epigenéticos de respuesta confiables sería muy útil para mejorar el control del desajuste optando por otras conductas terapéuticas en caso de conocer que un paciente no tendrá buena respuesta a este tratamiento.

## 2-HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

2.2 Objetivo general

2.3 Objetivos específicos

## 2.1 Hipótesis

El aumento de la metilación del promotor, asociado a una menor expresión del gen Socs1, provoca un mal manejo del estado de inflamación crónica que impide la correcta acción del antihiperlipemizante Metformina.

## 2.2 Objetivo general

Explorar la metilación y la expresión del gen Socs1 en sangre periférica en relación a la respuesta a la droga Metformina en pacientes diabéticos tipo 2.

## 2.3 Objetivos específicos

- Clasificar a los pacientes con diagnóstico de diabetes tipo 2 en dos subpoblaciones, “Respondedores” y “No respondedores” a la Metformina en base a la variación en los valores de HbA1c.
- Analizar estado de metilación de islas CpG dentro del promotor del gen Socs1 en población leucocitaria de pacientes diabéticos tipo 2 contrastando ambas subpoblaciones de respuesta.
- Analizar niveles de expresión para el gen Socs1 entre los pacientes que presenten las diferencias más marcadas en la cantidad de citosinas metiladas en el promotor, “Respondedores” con respecto a “No respondedores” a la droga.

## **3-MATERIAL Y MÉTODO**

**3.1** Diseño clínico-metodológico

**3.2** Análisis de ARN y ADN

**3.3** Análisis estadístico

## 3.1 DISEÑO CLÍNICO-METODOLÓGICO

### 3.1.1 Diseño de la población

Todos los pacientes que participaron se atendieron en la policlínica de 3er. nivel de atención de Diabetes (UDA) del Hospital Pasteur, Montevideo, Uruguay. Cada individuo fue informado del estudio y firmó el consentimiento informado el cual fue previamente aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) y del Hospital Pasteur.

Al momento del estudio en dicha policlínica existía aproximadamente una población de 265 pacientes diabéticos protocolizados de los cuales se seleccionaron aquellos pacientes que estuvieran vírgenes de tratamiento. En base a dicha población se calculó el N necesario para contrastar dos poblaciones de respuesta a la droga. Se estableció un mínimo de 35 pacientes requeridos con un 5% de precisión y un intervalo de confianza de 95% (Software utilizado: Epidat 3.1).

Finalmente se analizaron 40 pacientes con diagnóstico de DT2 (ALAD, 2010) en un diseño de tipo transversal descriptivo que, luego de cumplidas las etapas de adecuación al plan nutricional y recomendaciones de actividad física de acuerdo a las pautas internacionales, se inició el tratamiento con antihiperlipemizante Metformina como única droga. En conjunto con médicos diabetólogos e internistas de la policlínica citada se consideraron los siguientes criterios de inclusión y exclusión de manera de conformar dos subpoblaciones, de 20 pacientes cada una, comparables para la respuesta al fármaco en estudio:

#### **Criterios de inclusión**

Diagnóstico de DT2 (según criterio ALAD, 2010).

Ajuste correcto a dieta, control y ejercicio físico indicados.

Indicación de Metformina como única droga.

### **Criterios de exclusión**

Recibir otros antihiperlipemiantes.

Presencia de procesos tumorales.

Presencia de enfermedades autoinmunes.

### **3.1.2 Marcador para el seguimiento del control metabólico**

Se determinó como marcador paraclínico más adecuado para el seguimiento de los pacientes los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA1c) ya que la misma refleja la glicemia media que precede a las 8-12 semanas de la toma de la muestra y es a su vez utilizada para estimar los niveles de glicemia crónica con un valor de 6.5% como punto de “cut off” diagnóstico para la diabetes (Sacks, 2005; ADA, 2011). Se tomaron valores de HbA1c antes del inicio del tratamiento y un segundo valor luego de 3 meses. Se consideró como buena respuesta al tratamiento el descenso de al menos 1% en la HbA1c en base al artículo de revisión de Bolen y colaboradores (2007) y al estudio sistematizado de Schernthaner y colaboradores (2010).

## **3.2 ANÁLISIS DE ARN Y ADN**

### **3.2.1 Extracción de ADN**

Se realizó extracción de ADN a partir de sangre periférica en tubo con EDTA utilizando el método Fenol-Cloroformo (anexo 1.1). Se verificó la integridad del ADN extraído mediante una electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con GoodView™ (Beijing SBS Genetech Co., Ltd) como agente intercalante. La corrida se realizó en buffer TBE1X a 150 mV durante 1 hora. Para la visualización de las bandas se utilizó Transiluminador UV. La concentración y calidad de ADN fue medida con el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). El ADN extraído se utilizó para la técnica de “Alelic Specific Oligonucleotide” (ASO) reverso en el análisis de HLA y para el protocolo de análisis de metilación.

### 3.2.2 Análisis de alelos HLA

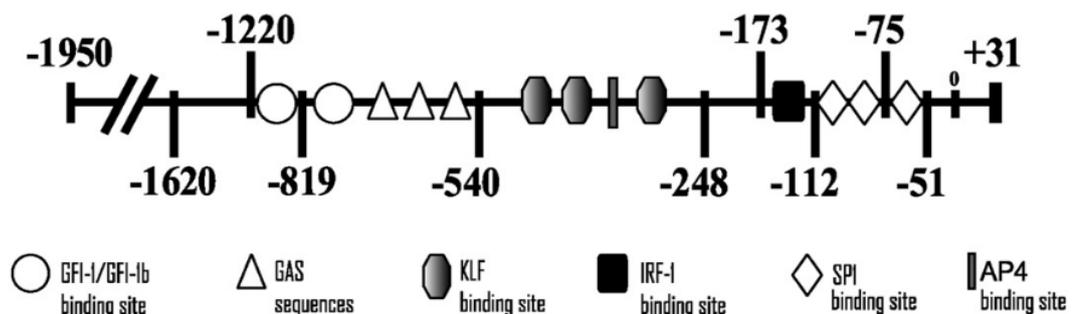
Con el ADN extraído y testeado se procedió a la amplificación (multiplex) de los exones 2 y 3 de locus DQB1\* del HLA utilizando el kit INNO-LiPA HLA-DQB1 Update (Innogenetics) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se realizó la hibridación sobre sondas inmovilizadas en una membrana mediante la técnica de ASO reverso y detección por Avidina-Estreptavidina. Los resultados obtenidos se leyeron utilizando el software Liras™ (Line Reader and Analysis Software) de INNO-Lipa HLA. Innogenetics, Ltda. Belgica

### 3.2.3 Análisis de metilación del promotor del gen Socs1

#### 3.2.3.1 Selección y diseño de secuencia

A partir de la secuencia del gen Socs1 en humanos (GenBank: DQ086801.1) se identificó, con el programa Artemis©, una secuencia de 2000 pb previa al sitio de inicio de la transcripción.

Esta secuencia de 2000 pb seleccionada abarca todos los sitios de unión conocidos para factores de transcripción siendo una secuencia de función regulatoria. En la figura 6 se esquematiza la estructura del promotor del gen Socs1 en queratinocitos humanos con los sitios de unión a factores de transcripción.



**Figura 6:** Estructura del promotor del gen Socs1 en queratinocitos humanos donde se señalan los sitios de unión a los distintos factores de transcripción (Madonna y col., 2010).

Con la secuencia de 2000 pb perteneciente al promotor (upstream al nucleótido +1) se aisló una secuencia de 498 pb con alto contenido en GC utilizando el programa EMBOSS CpGplot (figura 7).

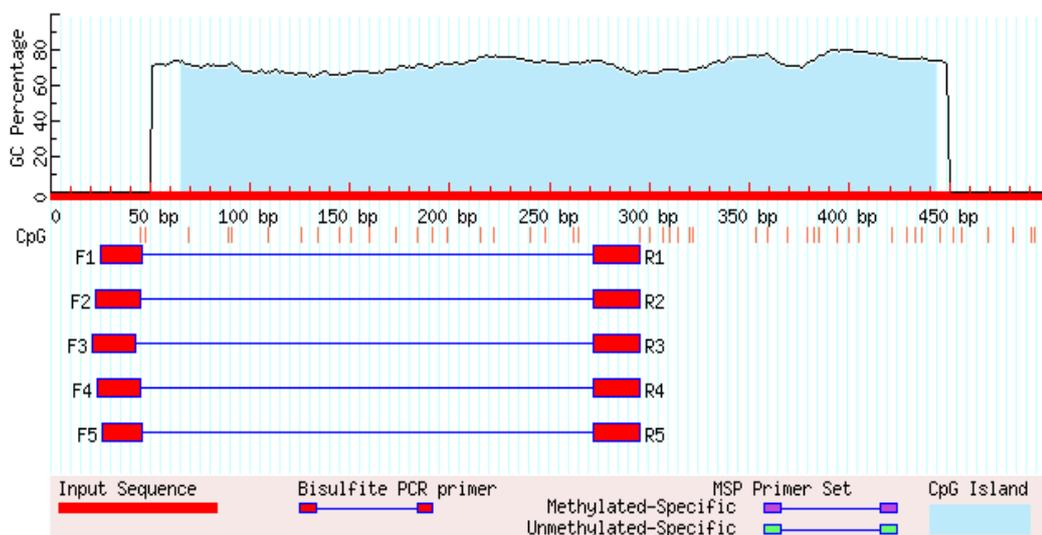
```

TAGGGGGATCTGGCTGCAGGGGAGGAGAGGACAGGGCTCTGCCCCGCGGGTGTGGA
GACAGCTGGGGCGGAGGAGGGTGTGTCAGGGCGCGTCCAAGAGGGCCTGGCGGCAGA
AAGTGGAAACCGAGGTAGCGGGGCAAATCGGGGTCGCCAAGTCCGAAGGAGGGGTCC
GAGAAAGTGGCCGAAGGCGCAGGGTCTGGGGCCAGAGCCCCTCGAGAGGCGGGTGTG
GGGCAGGTGCGAACAGGCGGGCAGAGGGCCCCGCGGGAGGGTCCAGAAGAGAGGGAA
ACAGGGCCGAAGCGGTCCTCGCCGACGCCACCGCGGAAAGAGAAACCAAAAGTGGAG
CTGGGGGCGGGGCGGCAGGGGGCGGGGCCTCCCGCCGTCGCCAGCCCCGCCTCCGAG
    
```

**Figura 7:** Secuencia (5'-3') con alto contenido GC resultado del análisis de 2000pb previos al nucleótido +1 con el programa EMBOSS CpGplot.

Esta secuencia fue analizada con el programa MethPrimer para identificar y diseñar la región con mayor cantidad de sitios plausibles de metilación. Los criterios del programa para la predicción de islas CpG fueron: tamaño de la isla > a 100, porcentaje GC >50, Obs/Esp > 0.6. En nuestra secuencia se identificó una sola isla CpG de 378 pb (66-443) que cumplía con los criterios señalados.

Para la realización de Bisulfite-Sequencing PCR (BSP) se diseñaron los primers con el mismo programa de forma de amplificar esta región independientemente de su estado de metilación (figura 8).



**Figura 8:** Predicción de islas CpG y primers resultado del programa MethPrimer junto a los primers sugeridos para amplificar la secuencia tratada con Bisulfito de Sodio.

Los primers seleccionados para amplificar esta región convertida con bisulfito fueron:

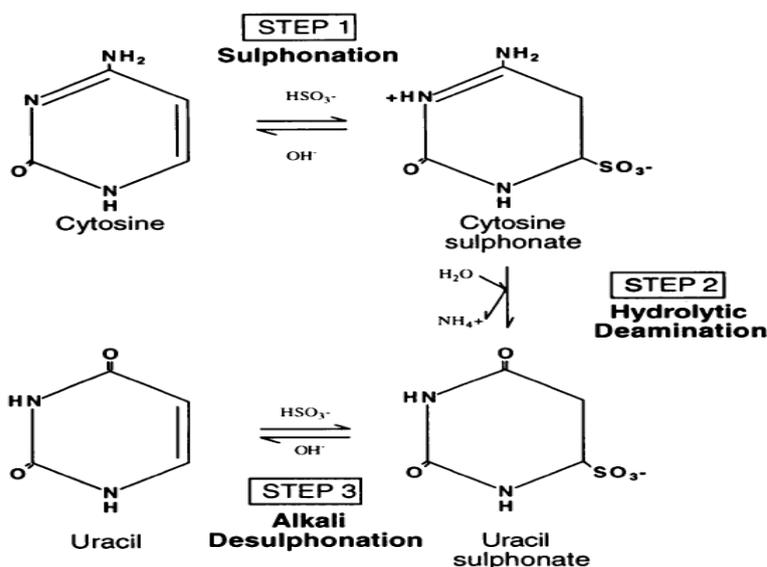
- Forward: Secuencia 5'AGGAGAGGATAGGGTTTTGTTTT3'
- Reverse: Secuencia 5'ACCCTATTTCCCTCTCTTCTAAAC3'

El tamaño del producto amplificado fue de 273 pb, Tm de 80.8°C y 21 CpGs en el producto.

### 3.2.3.2 Conversión con Bisulfito de Sodio

Se le realizó el tratamiento con Bisulfito de Sodio ( $\text{NaHSO}_3$ ) al ADN extraído. Este tratamiento convierte las citosinas no metiladas en uracilo, mientras que las citosinas metiladas quedan incambiadas por lo que se observa un cambio en la secuencia original respecto de la metilación (Zuo y col., 2009).

Luego en la reacción de PCR este uracilo será suplantado por timina, nucleótido disponible en la reacción, por lo que tendremos un par de bases AT donde antes había un par de bases GC sin metilar (Figura 9). Este protocolo fue cedido por la Dra. Capetta (anexo 1.2).



**Figura 9:** Principio químico de la conversión con Bisulfito de Sodio (Clark y col., 1994).

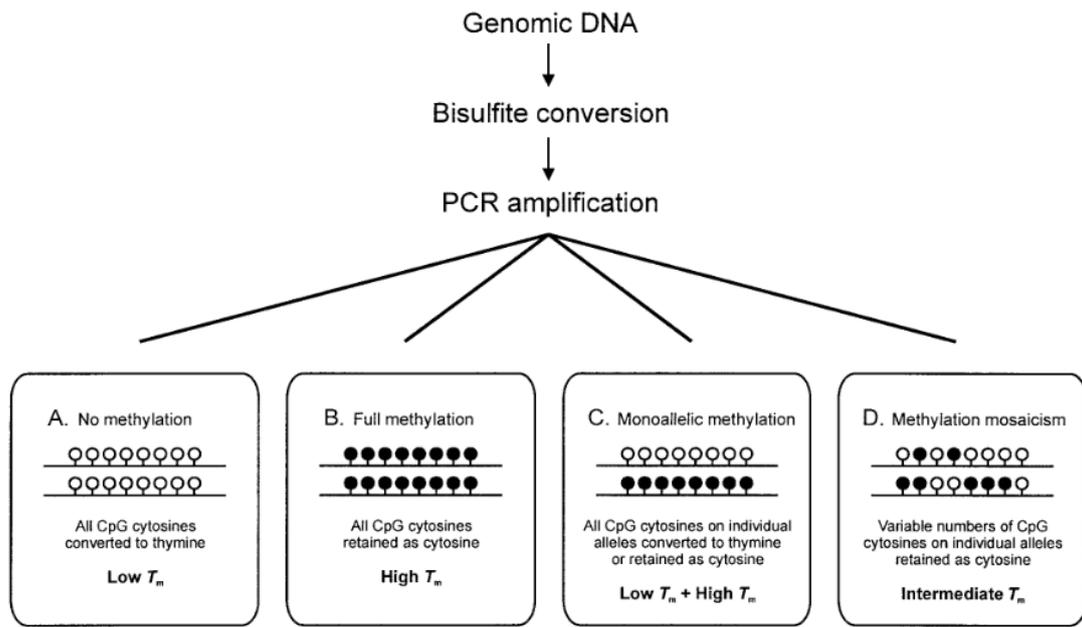
Se utilizó como control de la reacción de conversión con Bisulfito de Sodio el ADN no tratado con bisulfito de sodio como molde en la PCR para cada muestra. En estos controles se espera que no haya amplificación debido a que los primers diseñados con el programa MethPrimer hibridizan en regiones donde no hay CpG pero si existen citosinas (Cs). Las Cs que no se encuentran en CpG no mantienen la metilación y por tanto serán convertidas a uracilo en el tratamiento con Bisulfito de Sodio y a timina en la PCR. Estos primers ya asumen estos cambios en la secuencia blanco. Debido a que se realizó un análisis relativo a 2 estados de respuesta a un fármaco y no un análisis muestra a muestra no se realizó clonación y envío representativo de colonias.

### **3.2.3.3 Amplificación y análisis de curvas de melting**

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25µL conteniendo: 12.5 µl SensiMix™ Kit (Bioline®), 1µl de cada primers [10pmol], 1 µl de SYTO® 9 Green-Fluorescent Nucleic Acid Stains, 100 ng de ADN y c/n H<sub>2</sub>O DEPC. Se utilizó un termociclador Real Time de modelo RotorGene 6000 marca Corbett con el siguiente programa: una desnaturalización inicial de 10 minutos a 95° C y luego 40 ciclos de 20 segundos a 95 °C, 20 segundos a 57°C, 20 segundos a 72 °C, y un “hold” final de 1 minuto a 60 °C. Luego de la amplificación se agregó al protocolo de ciclado una rampa de temperatura que va desde 65 a 95 °C con la adquisición de fluorescencia en el canal Green (emite a 470nm y detecta a 510nm).

Cada muestra se realizó por duplicado para cada gen. A su vez se utilizó un control de reproducibilidad en el que se realizaron todos los pasos de la técnica a la misma muestra de ADN y se incluyó en todas las reacciones de PCR y posterior análisis de curvas de melting.

Ya realizada la conversión con bisulfito de sodio las variaciones de secuencia fueron reveladas por el análisis de las curvas de melting. A seguir, a mayor metilación se mantendrán mayor cantidad de pares GC intactos y ese fragmento tendrá mayor Tm (Figura 10).



**Figura 10:** Análisis de los patrones de metilación con el metodo conversión con Bisulfito de Sodio y análisis de curvas de melting (Worm y col., 2001).

El producto de PCR derivado de un molde metilado tendrá una temperatura de fusión más alta que a partir de un molde no metilado y las diferencias pueden resolverse por análisis de curvas de fusión. Para confirmar la identidad de los productos amplificados, los mismo fueron enviados a secuenciar (Macrogen Inc.).

### 3.2.4 Cuantificación relativa de la expresión del gen Socs1

#### 3.2.4.1 Extracción de ARN y RT-PCR

Se extrajo el ARN total con el método TRIzol® Reagent (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante, a partir de sangre periférica en tubo con EDTA. Las extracciones de ARN se realizaron el mismo día en que se extrajo la sangre de los pacientes. El ARN fue medido en NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) y se corrió en gel de agarosa al 1% teñido con GoodView™ (Beijing SBS Genetech Co., Ltd) en buffer TBE 1X para evaluar su integridad. Se midió la concentración y calidad del ARN con el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Todas las muestras fueron llevadas a 0.5µg/µl de concentración final. La reacción de síntesis de cDNA se realizó con enzima y buffer SuperScript®II (Invitrogen™) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se partió en todos los casos de 4µg de ARN y se siguieron las instrucciones del fabricante tanto para preparar reactivos como para el protocolo de temperaturas. Se utilizó agua DEPC para todos los propósitos.

En todos los pasos siguientes a la extracción de ARN (RT y PCR) se utilizó como control negativo el blanco (sin agregado de sangre) realizado en la extracción de ARN.

### 3.2.4.2 Diseño de cuantificación relativa utilizando el gen Abl como referencia

Se diseñó el set de primers para Socs1 utilizando el servicio online brindado por la marca IDT (<http://www.idtdna.com/site>) (Figura 11). La secuencia ingresada en el programa fue la correspondiente al transcripto maduro de Socs1 Humano (código de acceso: NM\_003745). De los dos set de primers recomendados por el programa se seleccionó el set 1 que incluye las secuencia forward: 5`GAGAACCTGGCTCGCATC 3` y la secuencia reverse: 5`CAAATAACACGGCATCCCAG 3`. Como se observa en la figura 11 los primers utilizados hibridizan en exones diferentes lo que asegura la amplificación de ADN copia exclusivamente y no ADN genómico.

Gene Entry > Target Locations > Results > Login > Report

PrimeTime Result NM\_003745 (SOCS1)

View: Transcript | Mature Transcript

Set 1 → ←

← → ← Set 2

Gene coded on '-' strand of genome  
(Move cursor over transcript to see sequence information)

Exon → Primer \_ Probe  
Intron → Selected Primer \_ Selected Probe  
— Untranscribed Genome

View Sequence | View Details | View Amplicon Details | View Parameters

⚠ Click to display warnings in the Details View.  
Warnings show parameters that differ from design specifications.  
Warnings are not an indication of functionality, they only show where design criteria were not met.  
Sets are ranked according to their overall scores.  
Overall scores are composites of several criteria, it is possible for high scoring sets to contain warnings.

Sequence Display  
(Select the tabs above to view additional information)

Set 1 (Recommended)

Forward	GAGAACCTGGCTCGCATC
Probe	CGACTACCTGAGCTCCTTCCCCT
Reverse	CAAATAACACGGCATCCCAG

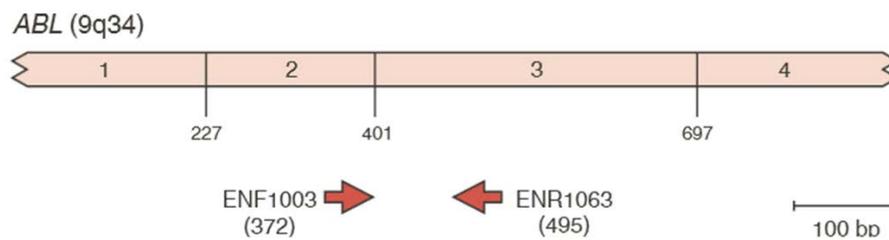
Set 2

Forward	TGGCCCTTCTGTAGGATG
⚠ Probe	TGTGGAGACTGCATTGTGGCT
Reverse	AGGAGGAAGAGGAGGAAGG

**Figura 11:** Recomendaciones para el diseño de la cuantificación de la expresión del gen Socs1 por el programa online Q-PCR, IDT. En el diagrama que se encuentra en la parte superior de la figura se observa los sitios donde hibridizan los primers recomendados respecto a los exones del gen.

Para el gen de referencia se utilizó el protocolo descrito en el trabajo de Beillard y colaboradores (2003) (figura 12) donde se ponen a prueba varios genes de referencia para la metodología de cuantificación relativa por real time PCR. Los primers utilizados hibridizan en los exones 2 y 3 lo que asegura la amplificación de ADN copia exclusivamente y no ADN genómico.

- ENF1003 (Forward): 5´TTGAGATAA CACTCTAAGCATAACTAAAGGT 3´
- ENR1063 (Reverse): 5´GATGTAGTTGCTTGGGACCCA 3´



**Figura 12:** Diseño del sistema de amplificación del gen ABL (Beillard y col., 2003).

En ambos casos (gen de interés y de referencia) los %GC fueron mayores a 50 y el par de cebadores abarcan, al menos parte, de más de un exón para evitar la amplificación de ADN genómico. Ambos amplicones son de 124pb.

Se utilizó el kit SensiFAST™ SYBR (Bioline®) según las indicaciones del fabricante con un protocolo de 40 ciclos, una temperatura de annealing de 57°C y una rampa de melting de 65 a 95°C. Esta técnica utiliza colorante SYBR Green, fluorescencia que se une, de forma inespecífica, en el surco menor del ADN doble cadena (Morrison y col., 1998).

Para la realización de la curva estándar se tomó cDNA sintetizado a partir de una muestra de sangre de un individuo control (no diabético). Se realizaron 3 puntos con diluciones de 1/10, 1/100 y 1/1000 para ambos genes. A esta muestra se le realizó extracción de ARN y RT PCR simultáneamente a las muestras problema. Las muestras problema se utilizaron en diluciones de 1/50.

Los niveles de expresión relativa del gen de interés se calcularon por el método comparativo de los ciclos umbral después de la normalización de la expresión respecto de la expresión del gen de referencia. El equipo Rotor Gene 6000 cuenta con el algoritmo basado en el método doble curva estándar (Livak y Schmittgen, 2001; Manual Rotor Gene 6000, © 2006 Corbett Research; Günthner y col., 2013).

### **3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para los análisis estadísticos y gráficos mostrados en la caracterización de la población, distribución de alelos HLA, además del análisis de metilación y cuantificación del gen se utilizó el paquete estadístico de uso libre G-Stat 2.0. Para el análisis del N necesario se utilizó el programa Epidat.

En todos los casos de contraste de medias de variables cuantitativas se realizó en primera instancia el test de Shapiro-Wilk para evaluar la normalidad en muestras de  $N < 50$ . Para los casos en que el test de normalidad dió positivo se realizó contraste de medias mediante el test paramétrico de t de Student. Para los casos que no presentaban distribución normal se realizó test no paramétrico de contraste de medias como el test de Mann-Whitney dado que es un test de comparación de muestras que ajusta a bajo N y no supone distribución normal. Para los análisis de variables categóricas se realizaron Chi cuadrado con corrección de Yates (para muestras pequeñas) por lo que los p valores son corregidos. En todos los casos se consideró un intervalo de confianza del 95% y un  $\alpha = 0.05$ . Para las variables categóricas se realizaron test de chi cuadrado con tablas de contingencia de doble entrada.

## 4-RESULTADOS

4.1 Análisis clínico y paraclínico

4.2 Análisis del contenido de alelos HLA

4.3 MIP (PCR metilación independiente) y cuantificación

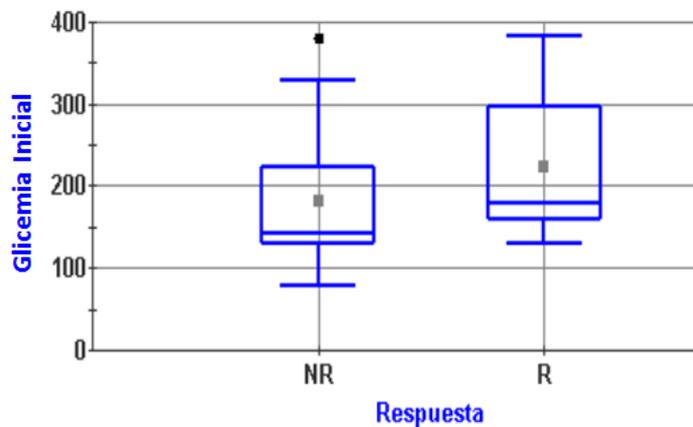
## 4.1 ANÁLISIS CLÍNICO Y PARACLÍNICO

### 4.1.1 Características de la población

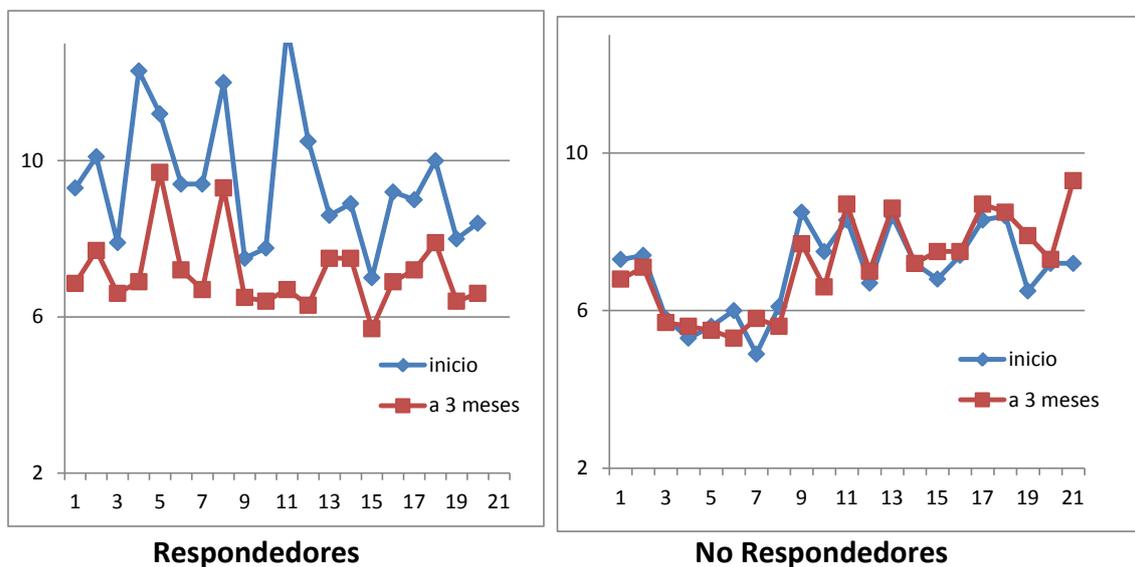
Se analizaron un total de 40 pacientes diabéticos tipo 2 clasificados en “Respondedores” (9 mujeres/11 hombres) y “No respondedores” (15 mujeres/5 hombres) a Metformina de acuerdo a los criterios establecidos. Las características clínicas y paraclínicas se detallan en la tabla 3. Se procedió a realizar el test estadístico de Shapiro-Wilk W para muestras de  $N < 50$ , para analizar la normalidad de las variables en estudio y por ende el tipo de análisis correcto a realizar (paramétrico o no paramétrico) (detalle en anexo 2). Se tomó como nivel de significancia  $p < 0,05$ ,  $\alpha = 5\%$ . Para las variables que presentaron distribución normal se realizó el test de t de Student y en aquellas que se rechazó la hipótesis de distribución normal se aplicó el test de Mann-Whitney (tabla 3). Se graficaron aquellas variables que dieron diferencias significativas (figura 13 y 14). Se realizó a su vez la comparación de la relación de sexos en ambas muestras por el método de Chi cuadrado no observándose diferencias significativas para este cálculo.

**Tabla 3:** Característica clínicas y paraclínicas para los grupos de “Respondedores” y “No respondedores”. Los valores se expresan en media  $\pm$  desvió estándar. Test estadísticos aplicados: a) t de student, b) Mann-Whitney. Siglas: NS = no significativo, IMC = índice de masa corporal, PA = presión arterial.

VARIABLE	RESPONDEDORES	NO RESPONDEDORES	P VALOR
EDAD DE DIAGNOSTICO(años)	53.25 $\pm$ 10.60	49.7 $\pm$ 12.07	NS <sup>(a)</sup>
PESO MÁXIMO (kg)	101.25 $\pm$ 19.01	91.25 $\pm$ 17.28	NS <sup>(a)</sup>
CINTURA (cm)	107.58 $\pm$ 16.12	108.39 $\pm$ 12.01	NS <sup>(a)</sup>
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	32.23 $\pm$ 5.19	31.63 $\pm$ 4.15	NS <sup>(b)</sup>
PA SISTÓLICA (mmHg)	130.20 $\pm$ 30.76	129.95 $\pm$ 22.85	NS <sup>(b)</sup>
PA DIASTÓLICA (mmHg)	78.20 $\pm$ 13.34	77.29 $\pm$ 11.08	NS <sup>(b)</sup>
COLESTEROL TOTAL (mg/dL)	207.94 $\pm$ 36.50	208.67 $\pm$ 63.65	NS <sup>(b)</sup>
HDL (mg/dL)	46.26 $\pm$ 14.13	50.28 $\pm$ 12.02	NS <sup>(a)</sup>
LDL (mg/dL)	116.40 $\pm$ 28.61	119.44 $\pm$ 49.46	NS <sup>(a)</sup>
TRIGLICÉRIDOS (mg/dL)	214.89 $\pm$ 139.19	173.56 $\pm$ 84.94	NS <sup>(b)</sup>
GLICEMIA INICIAL (mg/dL)	<b>223.25 <math>\pm</math> 86.48</b>	<b>182.80 <math>\pm</math> 83.32</b>	<b>0.0265<sup>(b)</sup></b>
HbA1c PREVIO (%)	<b>9.49 <math>\pm</math> 1.70</b>	<b>7.09 <math>\pm</math> 0.99</b>	<b>P&lt;0.0001<sup>(a)</sup></b>
HbA1c DIFERENCIA 3 MESES (%)	<b>2.36 <math>\pm</math> 1.47</b>	<b>0.06 <math>\pm</math> 0.73</b>	<b>P&lt;0.0001<sup>(b)</sup></b>



**Figura 13:** Gráfico para el resultado de la glicemia inicial en ambas subpoblaciones.



**Figura 14:** Variación individual de los valores de HbA1c antes del inicio de Metformina y 3 meses después de iniciado el tratamiento.

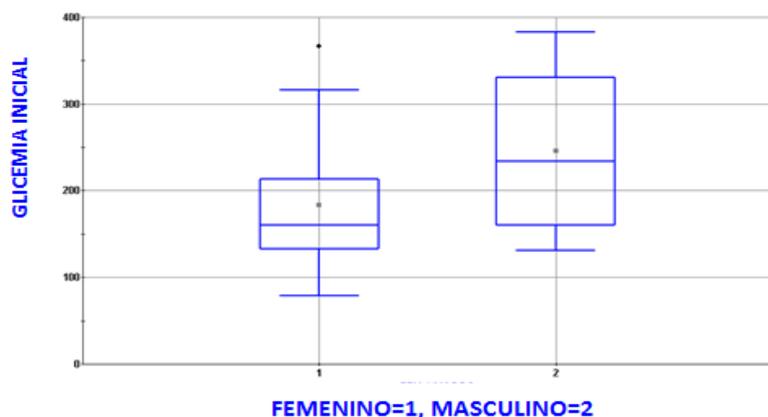
#### 4.1.2 Análisis por sexo

Si bien no existieron diferencias estadísticas en la variable sexo al aplicar el test de chi cuadrado entre ambos grupos, procedimos a comprobar que esta variable no estuviese actuando como variable confusora dado que esta puede afectar los resultados, más tomando en cuenta que existe un número dispar de hombres y mujeres entre “No respondedores” y “Respondedores”.

Se realizó primero un test de Man-Whitney (tabla 4, figura 15) y luego un control de diseño por muestras pareadas en forma aleatoria. Los análisis demostraron la no influencia de esta variable excepto para los niveles de glicemia.

**Tabla 4:** Análisis por sexo para evaluar esta variable como factor de confusión en las variables para las que se obtuvo significancia estadística en la población total. a) Chi cuadrado, b) Mann-Whitney, c) t de student.

VARIABLE	HOMBRES	MUJERES	P VALOR	BUENA RESPUESTA
<b>TOTAL</b>	17/40 (42.5%)	23/40 (57.5)%	<b>NS<sup>(a)</sup></b>	<b>11 hombres</b>
<b>GLICEMIA INICIAL (mg/dL)</b>	<b>Media: 245.6</b> <b>DE: 94.4</b>	<b>Media: 183.3</b> <b>DE: 73.01</b>	<b>0.02<sup>(b)</sup></b>	<b>9 mujeres</b>
<b>HbA1c PREVIO (%)</b>	Media: 8.86 DE: 1.74	Media: 7.75 DE: 1.87	<b>NS<sup>(c)</sup></b>	<b>MALA RESPUESTA</b>
<b>HbA1c DIFERENCIA 3 MESES (%)</b>	Media: 1.79 DE: 1.61	Media: 1.15 DE: 1.24	<b>NS<sup>(b)</sup></b>	<b>6 hombres</b> <b>14 mujeres</b>



**Figura 15:** Gráfico de cajas para la glucemia inicial tomando en cuenta la distribución de sexo.

## 4.2 TIPIFICACIÓN DE ALELOS HLA-DQB1\*

Se realizó la tipificación de las variantes génicas HLA y se analizó la presencia de los alelos de susceptibilidad asociados con autoinmunidad para la población con diabetes en Uruguay (DQB1\*0201 y/o \*0302) (Mimbacas y col., 2003).

Se realizó también un análisis adicionando otros alelos de susceptibilidad y protección descritos en la literatura para ampliar el estudio. En ningún caso se obtuvieron diferencias significativas para la distribución de alelos para este loci. Se hicieron análisis estadísticos para distribución de alelos y de genotipos entre las dos subpoblaciones de respuesta (tabla 5).

**Tabla 5:** Distribución de genotipos del loci HLA asociados a DT1. Susceptibles: DQB1\*0302, \*0201, \*0501, \*0604 (codifican para no aspártico). Protección: otros alelos que codifican para aspártico).

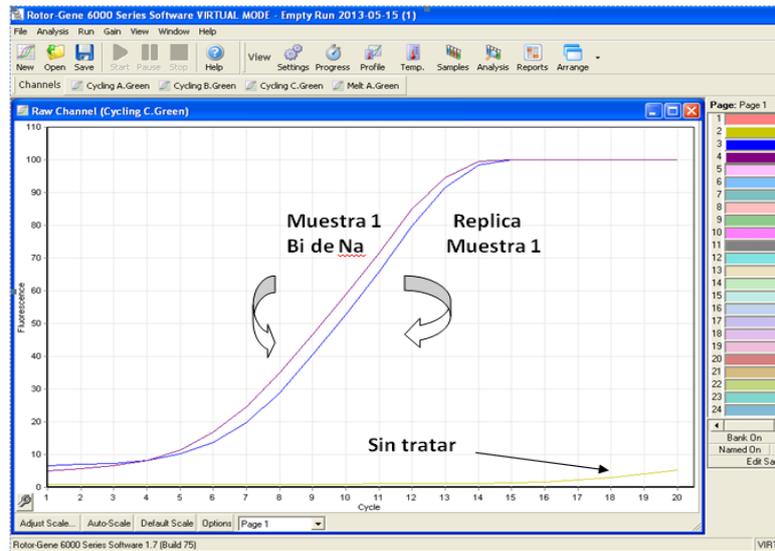
Genotipos	No respondedores	Respondedores
Susceptible/susceptible	7	4
Susceptible/protección	9	11
Protección/protección	4	5

## 4.3 MIP (PCR METILACIÓN INDEPENDIENTE) Y CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

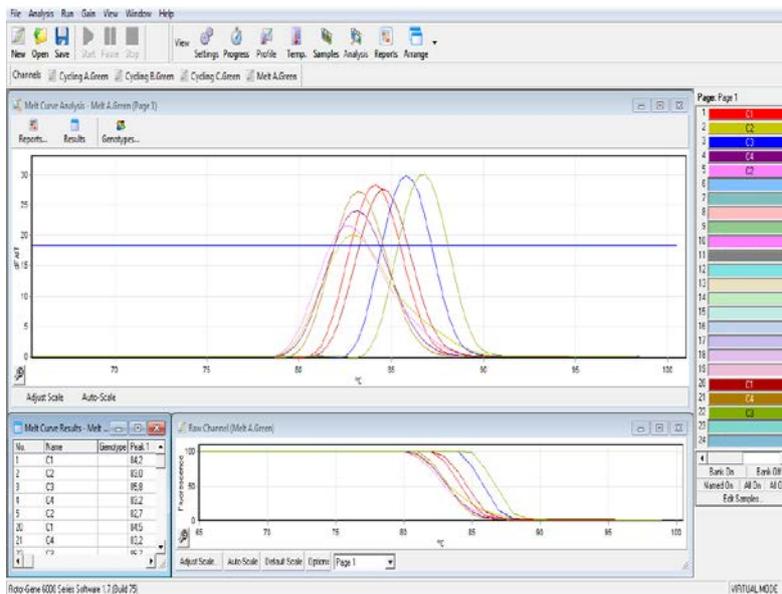
### 4.3.1 Resultados del análisis de metilación

Se realizaron reacciones de amplificación y posterior curva de melting para el ADN convertido de todas las muestras y controles correspondientes. Con el uso del equipo real time PCR obtuvimos un valor de Tm en grados Celsius correspondiente a la secuencia específica que presentara cada muestra luego del tratamiento con Bisulfito de Sodio. El tipo de análisis de este protocolo y la forma de visualizar los resultados se ejemplifican en la figura 16 y los valores de Tm para cada muestra en el análisis de curvas de melting de nuestros fragmentos se detallan en anexo 2.2. Con los resultados obtenidos de todas las muestras se realizaron los análisis estadísticos del tipo de comparación de medias contrastando ambos grupos de respuesta para esta variable, es decir, valor de media de Tm de “Respondedores” versus valor de media de Tm de “No respondedores”.

a.



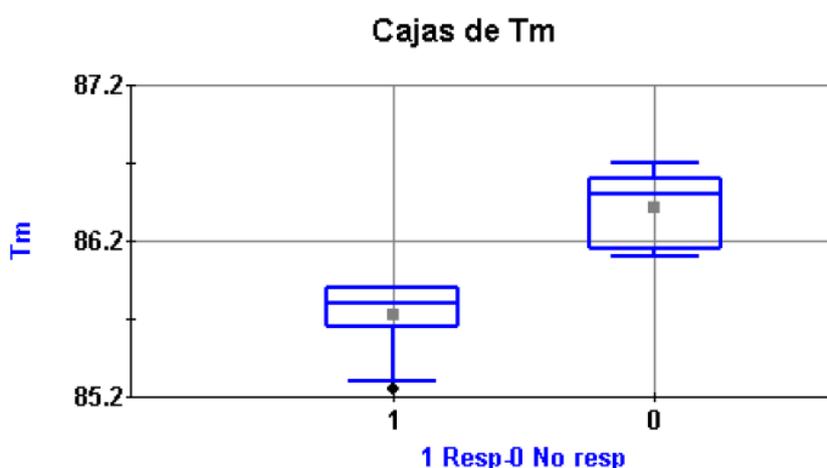
b.



**Figura 16:** a. Curvas de amplificación de una muestra y su réplica, tratadas con Bisulfito de Sodio y control sin tratamiento, graficando fluorescencia vs ciclos b. Curvas de melting para cuatro muestras y sus réplicas.

Se realizó un test de Student para el contraste de los valores de  $T_m$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) en el que se obtuvieron diferencias estadísticamente significativa con un  $p < 0.0001$  y un IC de  $(-0.8384, -0.5466)$  (figura 17). Es decir, estas dos subpoblaciones de respuesta son diferentes en cuanto a la media de los valores de  $T_m$  y esta diferencia no puede estar determinada por azar (intervalo de confianza válido).

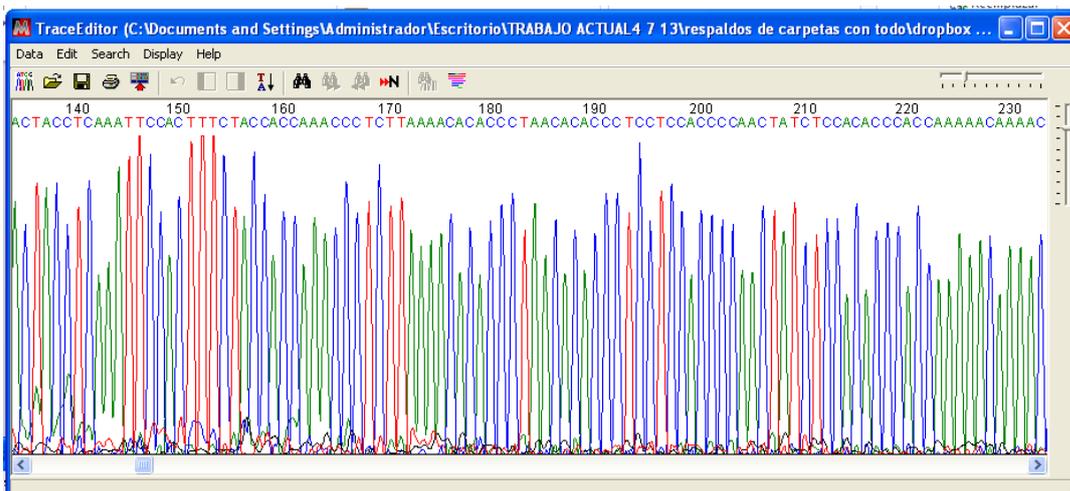
Para este cálculo se utilizó el programa G-Stat 2.0 para comparación de muestras contrastando las medias de Tm (°C) obtenidas para cada subpoblación de respuesta. Los valores de media y desvío estándar obtenidos fueron  $85.75 \pm 0.22$  para “Respondedores” y  $86.42 \pm 0.24$  para “No respondedores”. Como puede observarse a partir los resultados citados anteriormente la media de Tm (°C) fue menor para el grupo de “Respondedores”. Esto refleja que el amplicón (promedio) presentó mayor cantidad de pares AT en el grupo de “Respondedores”, de lo que se deduce que más citosinas en dinucleótidos GC estaban sin metilar y por ende fueron convertidas (Bisulfito de Sodio-PCR) a pares AT. Los “Respondedores” presentaban menor nivel de metilación que los “No respondedores”.



**Figura 17:** Gráfico de cajas para el contraste de las medias de Tm entre ambas subpoblaciones de respuesta.

#### 4.3.2 Análisis de productos de PCR metilación mediante secuenciación directa

Los productos de amplificación obtenidos en los protocolos de conversión con Bisulfito de Sodio y posterior PCR real time se purificaron y se enviaron a secuenciación directa (Macrogen Inc). En todos los casos la secuencia obtenida coincide con la secuencia blanco. A partir del análisis de las secuencias y sus cromatogramas (ejemplo figura 18) se realizó en primera instancia un análisis punto a punto de los sitios metilables encontrándose metilación (conversión de un par GC a un par AT) característica de cada amplicón secuenciado.



**Figura 18:** Porción de cromatograma obtenido para cada muestra luego de la secuenciación de los productos de PCR del análisis de metilación del gen Socs 1.

En segunda instancia se realizó un análisis de alineamiento, utilizando el programa MEGA 5.05. En la figura 19 se muestra la secuencia del amplicón marcando las citosinas dentro de dinucleótidos GC potencialmente metilables (en celeste) cambiados a pares AT, suponiendo toda la secuencia sin metilar. Es de destacar que encontramos un fragmento de 47 pb con igual secuencia para las 40 muestras analizadas (resaltado en azul en la figura 19). La igualdad de la secuencia refleja que tiene el mismo nivel de metilación para todas las muestras. Esa secuencia presenta cuatro dinucleótidos CpG potencialmente metilables en los que la secuencia obtenida nos devuelve un par AT donde antes teníamos uno GC por lo que se deduce que hubo conversión porque no había metilación en estos sitios. Este fragmento presentó metilación conservada en toda nuestra población (Figura 19).

```

AGGAGAGGATAGGGTTTTGTTTTGGTGGGTGTGGAGATAGTTGGGGTGGAGGAGGTT
GTGTTAGGGTGTGTTTTAAGAGGGTTTGGTGGTAGAAAGTGAATTTGAGGTAGTGGGG
TAAAATTGGGGTTGTTAAGTTGAAGGAGGGGTTTGAGAAGTGTTGGAAGGTGTAGGG
TTGGGGTTAGAGTTTTTTGAGAGGTGGGTGTTGGGGTAGGTGTGAATAGGTGGGTAGAG
GGTTTTGTGGGAGGGTTTAGAAGAGAGGGAAATAGGGT

```

**Figura 19:** Secuencia (5´-3´) analizada con el programa MethPrimer para el diseño del estudio de la metilación. Resaltado en color azul se muestra la secuencia conservada en todos los pacientes.

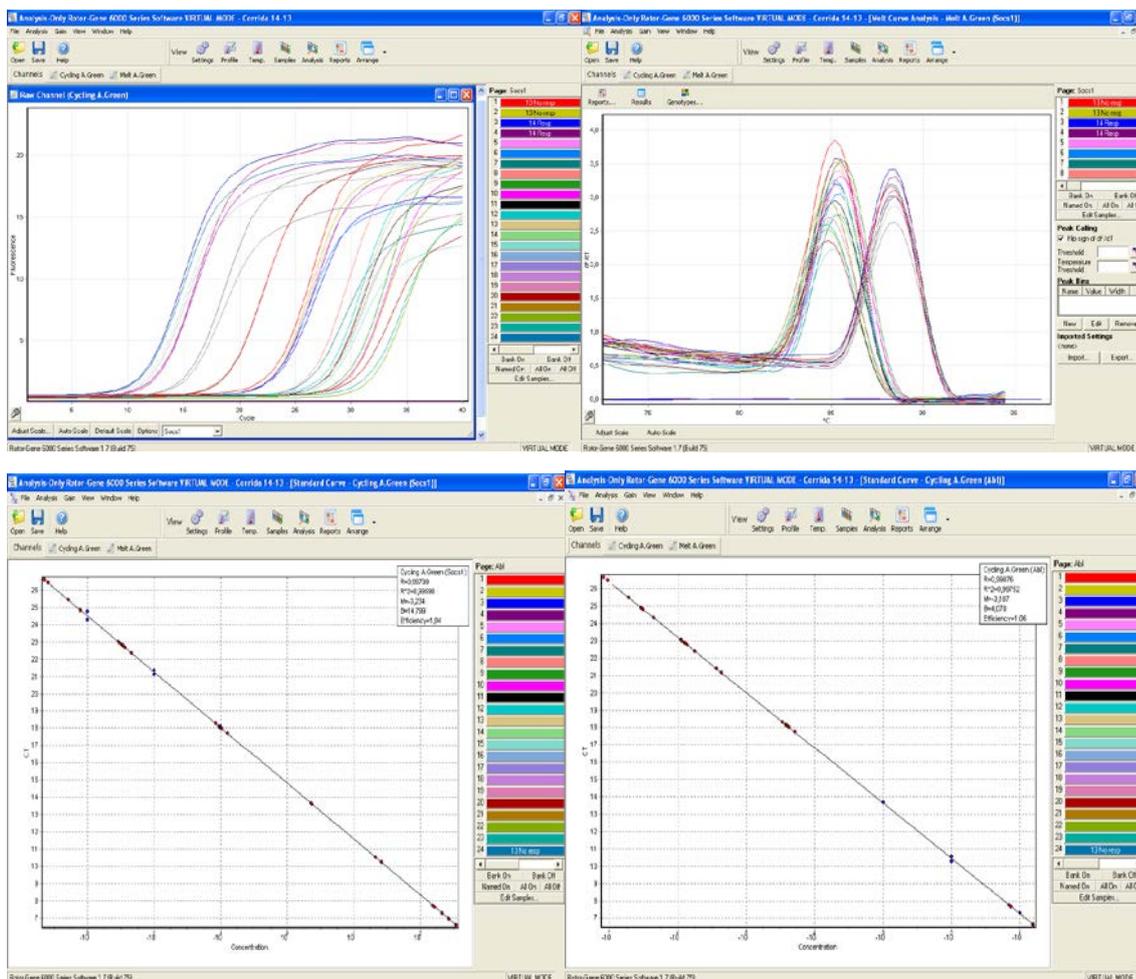
### 4.3.3 Análisis de cuantificación de la expresión génica

Del total de pacientes se seleccionaron las dos muestras de valores de Tm más extremos para cada subgrupo de respuesta (“Respondedores” y “No respondedores”) (tabla 6). Se espera que la mayor metilación del promotor de un gen funcione como silenciador o regulador negativo de su expresión, por lo que se tomaron los valores más bajos de Tm en el grupo de los “Respondedores” a la droga (menor metilación, mayor expresión de Socs1) y los valores más altos de Tm en los “No respondedores” a la droga (mayor metilación, menor expresión de Socs1).

**Tabla 6:** Valores y subgrupo de las muestras para las que se realizó la cuantificación de la expresión del gen.

MUESTRA	SUBGRUPO	TM (°C)
11	“Respondedor”	85.25
14	“Respondedor”	85.25
9	“No respondedor”	86.7
13	“No respondedor”	86.7

Se tomaron de a pares, muestras 11-9 y muestras 14-13, “Respondedores” y “No respondedor” respectivamente, con Tm separadas en 1.45 °C, para contrastar la expresión relativa entre ambos subgrupos. A su vez se observó la correlación entre los niveles de metilación y la expresión del gen en estas muestras. Para esto se realizaron corridas de real time PCR para cuantificación relativa utilizando el gen Abl como referencia. En la figura 20 se observan los resultados para las curvas de amplificación de cada gen (interés y referencia), las curvas de melting nos aseguran la especificidad de nuestros fragmentos amplificados así como la ausencia de dímeros de primers e inespecificidades y las curvas estándar con la eficiencia para cada gen.



Replicate Name	GOI Conc.	GOI Count	Norm. Conc.	Norm. Count	Relative Con
13 No resp	0,126760850166505	1	0,158722856124209	1	0,80
13 No resp 2	0,103282987963593	1	0,157059843571423	1	0,66
14 Resp	,41357269899139E-02	1	6,99332211534972E-02	1	1,20
14 Resp 2	,49126174138379E-02	1	7,39370338516024E-02	1	1,28

**Figura 20:** Curvas de amplificación, melting y curvas estándar con valores de eficiencia para cada gen en corrida ejemplo de cuantificación de la expresión relativa. En la parte inferior de la figura se observa como se ven los resultados en valores relativos para cada muestra.

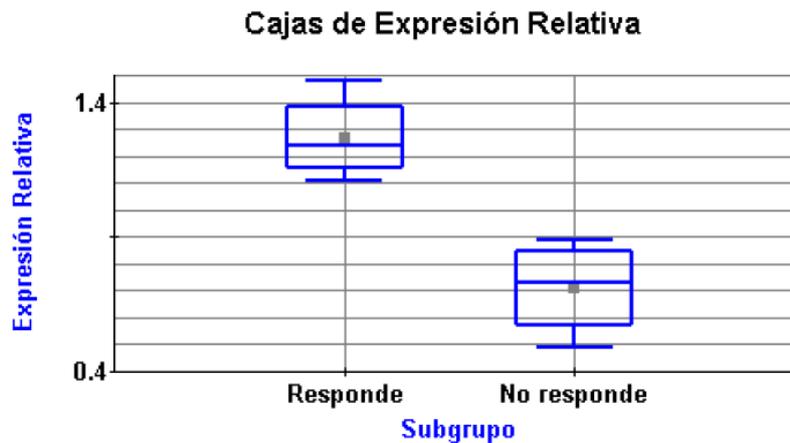
Se obtuvieron buenas eficiencias para ambos genes (interés y referencia). En todos los casos los valores fueron cercanos a 1. En la siguiente tabla se muestran todos los valores de expresión relativa obtenidos para cada muestra y los promedios resultantes para cada subgrupo.

**Tabla 7:** Valores de expresión relativa según el software del equipo Rotor Gene 6000.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN RELATIVA	SUBGRUPO	PROMEDIOS
<b>11</b>	1.48	“Respondedor”	1.295
<b>Réplica</b>	1.11		
<b>9</b>	0.49	“No respondedor”	0.69
<b>Réplica</b>	0.89		

MUESTRA	CONCENTRACIÓN RELATIVA	SUBGRUPO	PROMEDIOS
<b>14</b>	1.20	“Respondedor”	1.24
<b>Réplica</b>	1.28		
<b>13</b>	0.80	“No respondedor”	0.73
<b>Réplica</b>	0.66		

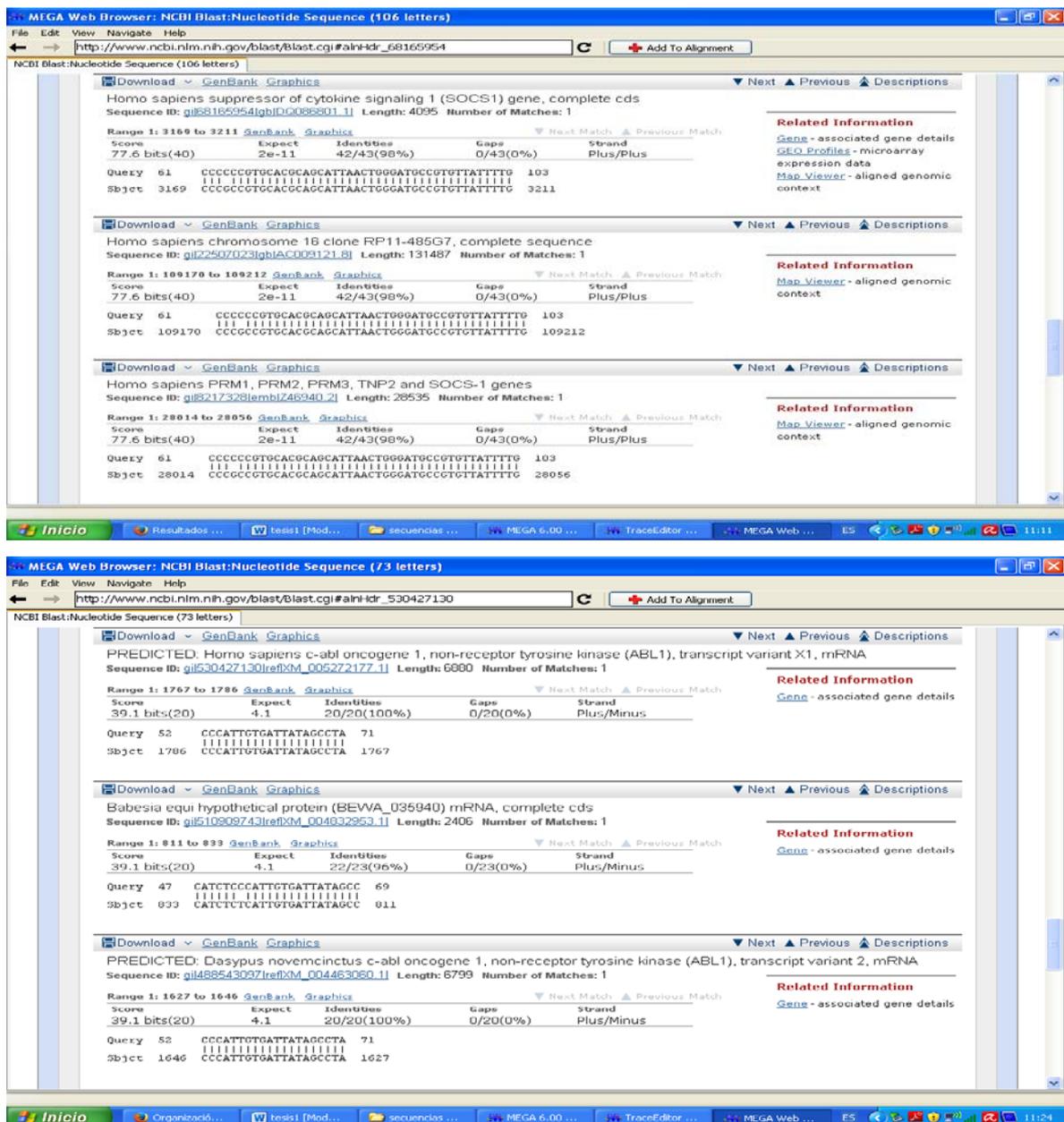
Con los valores de las medias de concentración relativa que nos brindó el software de real time PCR (Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7) (columna 4 de la tabla 7) se realizó el análisis estadístico mediante un test de Mann-Whitney (Wilcoxon) de expresión relativa por subgrupo. Se obtuvo un p valor de W: 0.0209 (<0.05). Esto último significa que se obtuvo diferencia significativa en la comparación de la expresión entre ambos grupos de respuesta, encontrándose mayor expresión en los individuos clasificados como “Respondedores”.



**Figura 21:** Gráfico de cajas con SD para la cuantificación relativa en cada subgrupo realizado con el programa G-Stat 2.0.

#### 4.3.4 Secuenciación confirmatoria de productos de cuantificación

Se secuenciaron los productos obtenidos por PCR real time para el sistema de cuantificación (Macrogen Inc.) a modo de confirmar la presencia de las secuencias blanco de la cuantificación. Tanto para el gen de interés (Socs1) como para el gen de referencia (Abl) se realizaron análisis de BLAST en la base de datos de ADN de humanos perteneciente al GenBank obteniéndose 100% de score de alineamiento con los genes buscados en Homo sapiens, RefSeqGene (figura 22).



**Figura 22:** Resultados de muestra del análisis de BLAST, NCBI (GenBank) para los productos de cuantificación.

## 5-DISCUSION

5.1 Diseño del estudio

5.2 Alelos HLA-DQB1\*

5.3 Metilación y cuantificación relativa de la expresión de Socs1

Este trabajo representa un tipo de estudio innovador para nuestro país donde se testea la respuesta a un fármaco respecto a marcadores moleculares. Dada la ambición del proyecto y la falta de bibliografía que crucen genes Socs con la respuesta a la Metformina nos gratificó ampliamente la obtención de resultados estadísticamente significativos. A esto se le suma que son resultados importantes también para la práctica clínica debido a que se abre un camino de posible incorporación de marcadores que revelen anticipadamente para qué paciente sería adecuada la indicación del fármaco más ampliamente utilizado en una etapa de desregulación metabólica que es clave para el futuro desarrollo de la enfermedad.

## 5.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Se partió de un N superior al mínimo necesario calculado para la prueba de contraste donde se tuvo en cuenta el número de pacientes que en ese momento habían ingresado a protocolo en la policlínica de la UDA del Hospital. Se debe tener en cuenta también que esta policlínica es de tercer nivel por lo que la población que se atiende allí es una población compleja donde pocos pacientes se encuentran en etapa inicial de objetivos de control e inicio de Metformina.

Es también un abordaje novedoso el haber trabajado a partir de sangre periférica para el estudio de la inflamación crónica descrita en DT2. En general los trabajos que analizan la problemática planteada en esta tesis utilizan modelos animales, en quienes resulta más sencillo hacer estudios tejido específico. Estos modelos son dificultosos debido a que implicarían hacer al animal de experimentación diabético tipo 2 además de administrar y poder medir la acción del fármaco, siendo aún más difícil en líneas celulares. Por otro lado, la realización de estudios tejido específico en humanos es muy dificultoso por ser necesaria la realización de técnicas invasivas (biopsia de páncreas) y la obligación de tomar en cuenta las implicancias éticas de este tipo de intervenciones. Los resultados obtenidos a partir de sangre periférica nos acercan a la aplicabilidad real en el sistema de salud de los marcadores estudiados.

Nuestros resultados mostraron mayores niveles de metilación de la región promotora correlacionada con menores niveles de expresión del gen en individuos catalogados como “No respondedores”. Esto último nos hace pensar en dos cosas. En primer lugar que la metilación del promotor funciona, para este gen, como un sistema de regulación de la transcripción, dado que a mayor metilación se observó menor presencia de ARN mensajero. En segundo lugar que un aumento de la expresión del gen *Socs1* con el objetivo de atenuar la respuesta inflamatoria se asocia con una mejor respuesta a la Metformina. Nuestros resultados van en línea con lo obtenido en el trabajo de Sachithanandan y colaboradores (2011) quienes plantearon un diseño similar al aquí realizado pero en ratones. El grupo investigó el papel fisiológico del producto del gen *Socs1*, en células mieloides y linfoides, en la regulación de la inflamación y la sensibilidad a la insulina. Observaron que ratones con el gen *Socs1* deletado, en macrófagos y linfocitos específicamente, tenían aumentada la expresión de receptores de adhesión en macrófagos, lo que muestra mayor capacidad de infiltración asociado a un aumento de la reacción inflamatoria, aumento de la sensibilidad a lipopolisacáridos (LPS) y ácido palmítico y también aumentadas las concentraciones séricas de TNF, IL-6, y la proteína MCP-1. Aquí también el aumento de la inflamación se asoció con alteración de la tolerancia a la glucosa y la hiperinsulinemia.

En cuanto a la elección del marcador para medir control metabólico y el criterio de respuesta (HbA1c) podemos decir también que permitió contrastar las respuestas a este fármaco. Es interesante observar la revisión realizada por Bennett y colaboradores (2007) donde se analiza la HbA1c para el diagnóstico así como para el seguimiento del control en pacientes DT2. Ellos encontraron amplia robustez en la medición de HbA1c, sobre todo en seguimiento de estos pacientes, y la correlación de este marcador con las complicaciones crónicas de la DT2. En el trabajo realizado por Weykamp y colaboradores (2008) donde contrastan 12 estudios de diferentes poblaciones del mundo para el uso de los marcadores de evaluación del control de la glicemia más ampliamente utilizados, señalan a la medición de la HbA1c como el método “gold standard” para el monitoreo glicémico.

La HbA1c ha demostrado ser el marcador más utilizado para el seguimiento de estos pacientes y por ende el más útil en la evaluación de tratamientos.

Otro aspecto importante a discutir es el observado al protocolizar a los pacientes en cuanto al valor de HbA1c al cual se le indicó el inicio de Metformina. Al clasificar a los 40 pacientes diabéticos tipo 2 que iniciaban Metformina en monoterapia en “Respondedores” y “No respondedores”, según el descenso de la HbA1c logrado, observamos que los pacientes que se agruparon como “Respondedores” presentaban valores de HbA1c de inicio más altos que los pacientes que quedaron en el grupo de los “No respondedores”. Esto podría ser un indicador importante a la hora de decidir la conducta terapéutica. Los estudios realizados por UKPDS han demostrado la estabilidad a largo plazo de la Metformina frente a otras drogas antihiperlipémicas, mostrando sus beneficios particularmente en no inducir el aumento de peso y reducir los episodios de hipoglicemia (Turner y col., 1998: UKPDS 34). Por otro lado, varios de los trabajos de intervención donde se ha utilizado Metformina fueron reunidos en un meta-análisis por Hirst y colaboradores (2012) quienes arribaron a la conclusión que existen evidencias que apoyan la eficacia de la terapia con Metformina brindando una importante reducción de la HbA1c cuando se usa como monoterapia o en combinación con otros agentes terapéuticos. Sin embargo, si bien esto es avalado también por el algoritmo presentado por la ADA y la EASD sobre el enfoque de tratamiento de la hiperglicemia en diabetes tipo 2 donde se destaca la intervención en el momento del diagnóstico con Metformina en combinación con los cambios de estilo de vida (terapia nutricional y ejercicio), debe también tenerse en cuenta que no siempre se logran los objetivos (ADA, 2011). Proponen incluso aumentar la dosis o adicionar otros agentes (incluyendo el inicio temprano de la terapia con insulina) como un medio para alcanzar y mantener los niveles recomendados de control de la glicemia (es decir, de HbA1c  $\leq$ 6.5 %). En toda la bibliografía analizada, se establece un “cut off” para la HbA1c en base a estudios de comparación con placebos u otras drogas antihiperlipémicas, sin embargo, ninguno hace el enfoque que realizamos en este trabajo donde analizamos cual fue el punto de partida de los niveles de HbA1c en ambas subpoblaciones.

El hallazgo que los clasificados como “Respondedores” tenían una característica en común: habían partido de valores más altos de inicio del tratamiento, podría estar indicando que a valores más bajos de HbA1c, la Metformina no es tan efectiva como se espera. Esto puede ayudar a responder las interrogantes del médico clínico a la hora de iniciar un tratamiento farmacológico. Esto último daría respaldo basado en evidencia para reafirmar un criterio clínico con un enfoque personalizado y no con un criterio epidemiológico de manejo de fármacos.

A su vez obtuvimos, en la caracterización de las subpoblaciones diferencias significativas para los valores de glicemia inicial, pero al hacer el mismo análisis separando grupos según la distribución de sexos en cada grupo esta diferencia se mantuvo por lo que la presencia del sexo puede estar funcionando como una variable confusora para la glicemia inicial. Esto último podría deberse a que, en nuestra población, se observan diferentes conductas sociales y laborales entre ambos sexos. Las mujeres suelen realizar más controles ya que el Sistema Nacional Integrado de Salud obliga a realizar ciertos controles en forma obligatoria, lo que indirectamente ayuda al acercamiento con el médico tratante. Ellas también pueden seguir mejor los planes alimenticios indicados antes del inicio del tratamiento porque, en la población hospitalaria, son quienes tienen trabajo estable mientras que los hombres en su mayoría tienen horarios zafrales. Por lo tanto pensamos que la acción como variable confusora de la glicemia inicial no debería ser tomada en cuenta para los objetivos planteados. Si se tuvo en cuenta que el paciente mostrara adherencia al tratamiento luego del ingreso a nuestro protocolo.

## **5.2 ALELOS HLA-DQB1\***

Más del 5-10% de los pacientes con diagnóstico de DT2 tienen marcadores de autoinmunidad contra células  $\beta$  y la presencia de alelos de riesgo HLA-DQB1 correlaciona fuertemente con la deficiencia de insulina (Maiolo y col., 2010). La población analizada no escapa a esta realidad donde observamos un 3% de genotipos susceptibles.

Al comparar las poblaciones para la presencia de alelos de riesgo y protección no encontramos diferencias estadísticamente significativas ni alélicas ni genotípicas entre ambas subpoblaciones.

Este resultado aporta robustez a la comparación entre las subpoblaciones de respuesta donde se analiza la participación del sistema inmune debido a que el principal marcador de susceptibilidad para diabetes autoinmune innata no presentó diferencias permitiendo dejar por fuera variables que puedan estar influenciando la acción del sistema inmune y por ende alterar las posibles conclusiones de nuestro marcador en estudio. Debe recordarse que desde el diseño de la población y los criterios de exclusión se retiraron los pacientes con procesos que alteran el funcionamiento del sistema inmune o autoinmunidad de forma de mantener la independencia del marcador en estudio. Al no encontrarse diferencias entre ambas subpoblaciones acerca de la distribución de variantes génicas HLA asociadas a patología autoinmune también nos refuerza la correcta elección de los pacientes y clasificación en grupos de respuesta.

## **5.3 METILACIÓN Y CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE SOCS1**

SOCS1 y SOCS3 han sido implicados en la patogénesis de DT2, la obesidad (Howard y Flier, 2006), esteatosis hepática (Ueki y col., 2005), y síndrome metabólico (Ueki y col., 2004). En cuanto a nuestro estudio del gen Socs1 en estos pacientes también se obtuvieron resultados importantes tanto en la metilación del promotor como en la cuantificación relativa de su expresión. Si bien las diferencias en los niveles de expresión hallados fueron pequeñas existieron diferencias significativas y la metilación mostró ser variable y con asociación positiva de mayor metilación-menor expresión. Esto permite pensar que la metilación funciona como un sistema de regulación de la expresión para este marcador. A esto se le suma lo obtenido en el análisis de nuestras secuencias para las muestras ya tratadas con Bisulfito de Sodio donde se observó una secuencia de 47 pb conservada para todos los pacientes en cuanto a su estado de metilación. El amplicón con el que trabajamos fue diseñado

dentro de una isla CpG de 378 pb ubicada inmediatamente upstream al nucleótido +1. En el trabajo de Madonna y colaboradores (2010) (figura 6) esta región del promotor se muestra reservada para la unión de factores de transcripción del tipo KLF, AP4, SPI y un único sitio de unión para IRF-1, todos factores relacionados con la proliferación y la diferenciación celular. La identificación de qué factores realmente se unen a esta región en sangre permitiría entender la importancia de su estado de conservación. A partir de nuestros resultados sólo podemos inferir la importancia del mantenimiento de la metilación de esta región, en sangre periférica, dentro del contexto fisiopatológico de la DT2.

La proteína SOCS1 es uno de los miembros principales del sistema inmune en la “lucha” contra la inflamación. Sin embargo, los mecanismos moleculares que afectan a las células inmunes y sus funciones en la diabetes no están claros (Chen y col., 2013). Se sugiere que una inmunodeficiencia clínicamente sutil puede resultar en respuestas reguladoras conservadas evolucionando para combatir factores de estrés biológicos, por ejemplo, la hiperglicemia y la inflamación crónica. En efecto, la respuesta inmune y la regulación metabólica son interdependientes en el mantenimiento del equilibrio homeostático (Hotamisligil, 2006). Si bien puede ser eficaz para ayudar a extinguir la inflamación, esta estrategia no está exenta de costos para el sistema inmune del paciente, como muestran las infecciones bacterianas recurrentes en estos pacientes (Chen y col., 2013).

En otros estudios como el realizado por Liu y colaboradores (2008) se establece una correlación inversa, es decir, entre la regulación positiva de Socs1 y Socs3 en la retina durante la uveítis y la disminución de las respuestas biológicas a la insulina en la retina. En este trabajo se citan gran cantidad de estudios que reportan el aumento del mensajero de Socs1 y Socs3 asociado con una disminución de la sensibilidad a la insulina. Sin embargo el hecho que las proteínas SOCS pueden proteger las células  $\beta$  *in vitro*, abre la idea de plantear la hipótesis de un efecto protector de expresión Socs contra el desarrollo de la diabetes *in vivo*, y Socs1 ha emergido como una excelente opción de estudio en este contexto particular (Ronn y col., 2007).

En este sentido, nuestros resultados estarían de acuerdo con la hipótesis que a mayor metilación menos proteína SOCS y por ende más inflamación, lo que resultaría en una peor respuesta a la medicación.

Existen varios trabajos donde se estudia la metilación y expresión de genes Socs, pero en general tienen un enfoque tejido específico (Ronn y col., 2007; Liu y col., 2008). La búsqueda de SOCS a nivel periférico se justifica porque la inflamación crónica descrita para DT2 se observa también a nivel del endotelio. El estrés oxidativo modifica directamente el fenotipo en las células endoteliales incrementando la expresión génica de citoquinas proinflamatorias y moléculas de adhesión, introduciendo el concepto etiopatogénico de inflamación crónica de bajo grado (Roebuck, 1999), la cual también contribuye al mecanismo patogénico de resistencia a la insulina y aparición de la DT2 (Hu y Stampfer, 2003).

En uno de los trabajos más recientes para este modelo, realizado por Sachithanandan y colaboradores (2011), encontraron que la expresión de Socs1 en las células hematopoyéticas protege a los ratones contra la inflamación sistémica y resistencia a la insulina hepática potencialmente por inhibición de la señalización de la vía TLR4 (respuesta a citoquinas) en los macrófagos.

La metilación del ADN cada vez se está estudiando más en enfermedades complejas humanas más allá del cáncer y los trastornos específicos de la impronta (Zuo y col., 2009). En el trabajo de Wojdacz y Dobrovic (2007) se realizó el análisis por High Resolution Melt (HRM) para la discriminación entre secuencias metiladas y no metiladas después de la modificación con Bisulfito de Sodio del ADN diana. Este método, al igual que el aplicado en nuestro trabajo, consta de PCR y posterior análisis de curvas de melting. Ellos demostraron que el HRM es muy sensible para la detección de la metilación. A esto se le suman otros reportes basados en el análisis de curvas de melting de los productos de PCR para evaluar metilación (Worm y col., 2001; Guldborg y col., 2002).

A su vez varios estudios han cuantificado la expresión del gen Socs1 en relación a varias patologías asociadas a la inflamación (Komazaki y col., 2004; Günthner y col., 2013). La técnica Real-time PCR es muy sensible y permite la cuantificación de los transcritos raros detectando pequeños cambios en la expresión génica. Además de esto, es fácil de llevar a cabo, proporciona la precisión necesaria y produce resultados en forma rápida y fiable. La técnica más simple de detección de productos de PCR sintetizados en PCR en tiempo real utiliza colorante SYBR Green (Morrison y col., 1998). En nuestro estudio esta metodología nos permitió detectar esos pequeños cambios en la expresión sin la existencia de problemas asociados al uso de intercalantes inespecíficos como son los dímeros de primers o productos inespecíficos.

En conclusión, el estado fisiológico del paciente y sus características propias para manejar las agresiones, tales como la hiperglicemia sostenida y la inflamación resultante, influyen en la correcta acción de la Metformina. Estas características genéticas pueden orientar de forma más certera al clínico a la hora de iniciar la conducta terapéutica en una etapa del desarrollo de la enfermedad en que no debería perderse tiempo.

## 6-PERSPECTIVAS

Para futuros trabajos será interesante ampliar el número de muestras de pacientes abarcando policlínicas de diabetes de primer nivel donde se cuenta con mayor número de pacientes vírgenes de tratamiento. A su vez sería importante contar con grupos más homogéneos en cuanto a la distribución por sexo para mejorar la robustez de los análisis estadísticos.

El abordaje de respuesta a fármacos reflejó ser útil en el contraste de hipótesis para marcadores moleculares por lo que podrían diseñarse protocolos de respuesta para otros fármacos o para las combinaciones más comúnmente utilizadas. A esto le sumamos que sería muy interesante, y a modo de profundizar en la idea de este trabajo, testear la expresión relativa de la máxima cantidad de genes del sistema inmune encargados del control del estado fisiopatológico de inflamación crónica en pacientes con DT2, más en particular hacerlo para Socs3 de forma de abarcar a los dos miembros más importantes de la familia SOCS encargados del manejo de la inflamación. También es importante hacer la cuantificación de la expresión para la totalidad de pacientes de manera de aumentar la fuerza de la relación entre la respuesta a la Metformina y la expresión del gen. Otro abordaje que también sería interesante es hacer secuenciación post tratamiento con Bisulfito de Sodio en estos pacientes para analizar en profundidad el estado de metilación general en forma más absoluta. De esta manera quedaría cubierto para un amplio número de pacientes la metilación y la expresión de todos los genes encargados de la modulación de citoquinas proinflamatorias.

Un aspecto que resultaría también muy aportativo es conocer el estado inflamatorio real en estos pacientes con diferente respuesta a la Metformina. En este caso podría realizarse midiendo por la técnica ELISA la IL6, principal citoquina proinflamatoria modulada por SOCS1.

Creemos que este trabajo arrojó resultados interesantes que imponen la realización de trabajos que complementen la información tanto para el uso de fármacos como para el entendimiento de esta patología de tanta incidencia a nivel mundial.

## 7-BIBLIOGRAFIA

- **Abbas AK, Lichtman AH. (2003)** "Cellular and Molecular Immunology". 5<sup>th</sup>edn. Saunders, Philadelphia USA. P 562.
- **Abdul-Ghani MA, Jenkinson CP, Richardson DK, Tripathy D, DeFronzo RA. (2006a)** Insulin secretion and action in subjects with impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance. Results from the Veterans Administration Genetic Epidemiology Study. *Diabetes*. 55: 1430-1435.
- **Abdul-Ghani MA, Tripathy D, DeFronzo RA. (2006b)** Contributions of  $\beta$ -Cell Dysfunction and Insulin Resistance to the Pathogenesis of Impaired Glucose Tolerance and Impaired Fasting Glucose. *Diabetes Care*. 29: 1130–1139.
- **Ahlqvist E, Ahluwalia TS, Groop L. (2011)** Genetics of Type 2 Diabetes. *Clin Chem*. 57: 241–254.
- **American Diabetes Association, ADA. (2011a)** Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 34: 562-569.
- **American Diabetes Association, ADA. (2011b)** Position statement, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.
- **Andersen MK, Lundgren V, Turunen JA, Forsblom C, Isomaa B, Groop PH, Groop L, Tuomi T. (2010)** Latent Autoimmune Diabetes in Adults Differs Genetically From Classical Type 1 Diabetes Diagnosed After the Age of 35 Years. *Diabetes Care*. 33: 2062–2064.
- **Andreasen AS, Pedersen-Skovsgaard T, Berg RMG, Svendsen KD, Feldt-Rasmussen B. (2010)** Type 2 diabetes mellitus is associated with impaired cytokine response and adhesion molecule expression in human endotoxemia. *Intensive Care Medicine*. 36: 1548–1555.
- **Asociación Latinoamericana de Diabetes, ALAD. (2010)** Documento de posición de ALAD con aval de Sociedades de Diabetes y Endocrinología Latinoamericanas para el tratamiento de la Diabetes Tipo 2.
- **Asociación Latinoamericana de Diabetes, ALAD. (2013)** Guías sobre el Diagnóstico, Control y Tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2 con Medicina Basada en Evidencia.
- **Barroso I. (2005)** Genetics of Type 2 diabetes. *Diabetic Med*. 22: 517–535.
- **Beillard E, Pallisgaard N, Van Der Velden VHJ, Bi W, Dee R, Van Der Schoot E, Delabesse E, Macintyre E, Gottardi E, Saglio G, Watzinger F, Lion T, Van Dongen JJM, Hokland P, Gabert J. (2003)** Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) – a Europe against cancer program. *Leukemia*. 17: 2474–2486.
- **Benetatos L. (2013)** miR-29b: A new demethylator in multiple myeloma. *Cell Cycle*. 12: 1–2.
- **Bennett CM, Guo M, Dharmage SC. (2007)** HbA1c as a screening tool for detection of Type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetic Med*. 24: 333–343.
- **Berg AH, Scherer PE. (2005)** Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res*. 96: 939-949.
- **Bolen S, Feldman L, Vassy J, Wilson L, Yeh HC, Marinopoulos S, Wiley C, Selvin E, Wilson R, Bass EB, Brancati FL. (2007)** Systematic review: comparative effectiveness and safety of oral medications for type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med*. 147: 386-99.
- **Buchanan TA, Xiang AH, Peters RK, Kjos SL, Marroquin A, Goico J, Ochoa C, Tan S, Berkowitz K, Hodis HN, Azen SP. (2002)** Preservation of pancreatic cell function and prevention of type 2 Diabetes by pharmacological treatment of insulin resistance in high-risk Hispanic women. *Diabetes*. 51: 2796–2803.
- **Canadian Diabetes Association. (2008)** Clinical Practice Guidelines for the Prevention and Management of Diabetes in Canada.
- **Cañas CA. (2011)** Autoinmunidad y autoinflamación. *Acta Médica Colombiana*. 36: 78-84.
- **Chen NKF, Chong TW, Loh HL, Lim KH, Gan VHL, Wang M, Kon OL. (2013)** Negative regulatory responses to metabolically triggered inflammation impair renal epithelial immunity in diabetes mellitus. *J Mol Med*. 91: 587–598.
- **Cho JH, Kim JW, Shin JA, Shin J, Yoon KH. (2011)** Beta-cell mass in people with type 2 diabetes. *J Diabetes Invest*. 2: 6-17.
- **Chong MMW, Metcalf D, Jamieson E, Alexander WS, Kay TWH. (2005)** Suppressor of cytokine signaling-1 in T cells and macrophages is critical for preventing lethal inflammation. *Blood*. 106: 1668–1675.
- **Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. (1994)** High sensitivity mapping of methylated cytokines. *Nucleic Acids Res*. 22: 2990-2997.
- **Cone JB. (2001)** Inflammation. *The American Journal of Surgery*. 182: 558-562.
- **Conget I. (2002)** Diagnóstico, clasificación y patogenia de la diabetes mellitus. *Rev Esp Cardiol*. 55: 528-535.

- **Cottet S, Dupraz P, Hamburger F, Dolci W, Jaquet M, Thorens B. (2001)** SOCS-1 protein prevents Janus kinase/STAT-dependent inhibition of beta cell insulin gene transcription and secretion in response to interferon-gamma. *J Biol Chem.* 276: 25862–25870.
- **Cucca F, Todd JA. (1996)** HLA susceptibility to type 1 diabetes: methods and mechanisms. In: Browning M, McMichael AJ (eds) *HLA/MHC: genes, molecules and function.* BIOS Scientific, Oxford, UK, 383–406.
- **Dalli Peydró E. (2005)** Evaluación de la disfunción endotelial en pacientes con diabetes. *Avances en Diabetología.* 21: 292-301.
- **Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. (2004)** Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends in Immunol.* 25: 4-7.
- **DeFronzo RA, Diebert D, Hendler R, Felig P. (1979)** Insulin sensitivity and insulin binding to monocytes in maturity onset diabetes. *J Clin Invest.* 63: 939–946.
- **DeFronzo RA, Gunnarsson R, Bjorkman O, Olsson M, Wahren J. (1985)** Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in non-insulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 76: 149–155.
- **DeFronzo RA. (1988)** Lilly Lecture: The triumvirate:  $\beta$ -cell, muscle, liver: a collusion responsible for NIDDM. *Diabetes.* 37: 667–687.
- **DeFronzo RA, Ferrannini E. (1991)** Insulin Resistance A Multifaceted Syndrome Responsible for NIDDM, Obesity, Hypertension, Dyslipidemia, and Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Diabetes Care.* 14: 173-194.
- **DeFronzo RA. (1997)** Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Rev.* 5: 177–269.
- **DeFronzo RA. (1999)** Pharmacologic therapy for type 2 diabetes. *Ann Internal Med.* 131: 281–303.
- **DeFronzo RA. (2009)** From the Triumvirate to the Ominous Octet: A New Paradigm for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes.* 58: 773-795.
- **DeFronzo RA, Tripathy D. (2009)** Skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 32: 157-163.
- **Devaraj S, Rosenson R, Jialal I. (2004)** Metabolic syndrome: an appraisal of the pro-inflammatory and procoagulant status. *Endocrinol Metabol Clin.* 33:431-453.
- **Devaraj S, Xu DY, Jialal I. (2003)** C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells: implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis. *Circulation.* 107: 398–404.
- **Egwuagu CE, Yu CR, Zhang M, Mahdi RM, Kim SJ, Gery I. (2002)** Suppressors of cytokine signaling proteins are differentially expressed in Th1 and Th2 cells: implications for Th cell lineage commitment and maintenance. *J Immunol.* 168: 3181–3187.
- **Elbein SC. (2002)** Perspective: the search for genes for type 2 diabetes in the postgenome era. *Endocrinology.* 143: 2012–2018.
- **Emanuelli B, Glondou M, Filloux C, Peraldi P, Van Obberghen E. (2004)** The potential role of SOCS-3 in the interleukin-1 beta-induced desensitization of insulin signaling in pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes.* 53: 97–103.
- **Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Chavey C, Freidinger K, Hilton DJ, Hotamisligil GS, Van Obberghen E. (2001)** SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor-alpha in the adipose tissue of obese mice. *Journal of Biological Chemistry.* 276: 47944–47949.
- **Eriksson J, Franssila-Kallunki A, Ekstrand A, Saloranta C, Widen E, Schalin C, Groop L. (1989)** Early metabolic defects in persons at increased risk for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *New Engl J Med.* 321: 337–343.
- **Ferrannini E, Simonson DC, Katz LD, Reichard G, Bevilacqua S, Barrett EJ, Olsson M, DeFronzo RA. (1988)** The disposal of an oral glucose load in patients with non-insulin dependent diabetes. *Metabolism.* 37: 79–85.
- **Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, Lee J, Goldne AB, Benoist C, Shoelson S, Mathis D. (2009)** Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med.* 15: 930-939.
- **Flodstrom-Tullberg M, Yadav D, Hagerkvist R, Tsai D, Secret P, Stotland A, Sarvetnick N. (2003)** Target cell expression of suppressor of cytokine signaling-1 prevents diabetes in the NOD mouse. *Diabetes.* 52: 2696–2700.
- **Geerlings SE, Hoepelman AI. (1999)** Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunol Med Microbiol.* 26: 259–265.

- **González Chávez A, Malanco HL, Sánchez ZM, Elizondo AS, Navarro ZJ, Rosillo RS. (2006)** Inflamación y resistencia a la insulina: mecanismos para el desarrollo de la disfunción endotelial y aterosclerosis. *Rev Mex Cardiol.* 17: 71-82.
- **González-Chávez A, Elizondo-Argueta S, Gutiérrez-Reyes G, León-Pedroza JI. (2011)** Implicaciones fisiopatológicas entre inflamación crónica y el desarrollo de diabetes y obesidad. *Cirugía y Cirujanos.* 79: 209-216.
- **Gregor M, Hotamisligil G. (2011)** Inflammatory mechanisms in obesity. *Ann Rev Immunol.* 29: 415-445.
- **Groop L, Lyssenko V. (2008)** Genes and type 2 diabetes mellitus. *Curr Diabetes Rep.* 8: 192-197.
- **Groop LC, Bonadonna RC, Del Prato S, Ratheiser K, Zyck K, DeFronzo RA. (1989)** Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus: evidence for multiple sites of insulin resistance. *J Clin Invest.* 84:205-213.
- **Groop LC, Tuomi T. (1997)** Non-insulin-dependent diabetes mellitus—a collision between thrifty genes and an affluent society. *Ann Med.* 29: 37-53.
- **Guldborg P, Worm J, Gronbaek K. (2002)** Profiling DNA methylation by melting analysis. *Methods.* 27: 121-127.
- **Gulli G, Ferrannini E, Stern M, Haffner S, DeFronzo RA. (1992)** The metabolic profile of NIDDM is fully established in glucose tolerant offspring of two Mexican-American NIDDM parents. *Diabetes.* 41: 1575-1586.
- **Günthner R, Kumar VRS, Lorenz G, Anders HJ, Lech M. (2013)** Pattern-Recognition Receptor Signaling Regulator mRNA Expression in Humans and Mice, and in Transient Inflammation or Progressive Fibrosis. *Int J Mol Sci.* 14: 18124-18147.
- **Gylvin T, Ek J, Nolsøe R, Albrechtsen A, Andersen G, Bergholdt R, Brorsson C, Bang-Berthelsen CH, Hansen T, Karlsten AE, Billestrup N, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Pedersen O, Mandrup-Poulsen T, Nerup J, Pociot F. (2009)** Functional SOCS1 polymorphisms are associated with variation in obesity in whites. *Diabetes, Obesity and Metabolism.* 11: 196-203.
- **Harada M, Nakashima K, Hirota T, Shimizu M, Doi S, Fujita K, Shirakawa T, Enomoto T, Yoshikawa M, Moriyama H, Matsumoto K, Saito H, Suzuki Y, Nakamura Y, Tamari M. (2007)** Functional polymorphism in the suppressor of cytokine signaling 1 gene associated with adult asthma. *Am J Resp Cell and Mol Biol.* 36: 491-496.
- **Hirst JA, Farmer AJ, Ali R, Roberts NW, Stevens RJ. (2012)** Quantifying the effect of metformin treatment and dose on glycemic control. *Diabetes Care.* 35: 446-454.
- **Home P. (2006)** Global guideline for type 2 diabetes: recommendations for standard, comprehensive, and minimal care. *Diabetic Med.* 23: 579-593.
- **Hotamisligil GS. (2006)** Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 444: 860-886.
- **Howard JK, Flier JS. (2006)** Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. *Trends in Endocrin Met.* 17:365-371.
- **Hu FB, Stampfer MJ. (2003)** Is type 2 diabetes mellitus a vascular condition? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 23: 1715-1716.
- **IDF - PLAN MUNDIAL CONTRA LA DIABETES 2011-2021.**
- **James WP. (2008)** The fundamental drivers of the obesity epidemic. *Obesity Rev.* 9: 6-13.
- **Kaiser N, Leibowitz G, Nesher R. (2003)** Glucotoxicity and beta-cell failure in type 2 diabetes mellitus. *Jf Pediat Endocr Met.* 16: 5-22.
- **Kashyap S, Belfort R, Gastaldelli A, Pratipanawatr T, Berria R, Pratipanawatr W, Bajaj M, Mandarino L, DeFronzo RA, Cusi K. (2003)** A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes. *Diabetes.* 52: 2461-2474.
- **Kim JW, Ko SH, Cho JH, Sun C, Hong OK, Lee SH, Kim JH, Lee KW, Kwon HS, Lee JM, Song KH, Son HY, Yoon KH. (2008)** Loss of beta-cells with fibrotic islet destruction in type 2 diabetes mellitus. *Front Biosci.* 13: 6022-6033.
- **Knowler WC, M.D, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM. (2002)** Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *New Engl J Med.* 346: 393-403.
- **Kolb H, Mandrup-Poulsen T. (2005)** An immune origin of type 2 diabetes? *Diabetologia.* 48: 1038-1050.
- **Komazaki T, Nagai H, Emi M, Terada Y, Yabe A, Jin E, Kawanami O, Konishi N, Moriyama Y, Naka T, Kishimoto T. (2004)** Hypermethylation-associated inactivation of the SOCS-1 Gene, a JAK/STAT Inhibitor, in Human Pancreatic Cancers. *Jpn J Clin Oncol.* 34: 191-194.
- **Krentz AJ, Bailey CJ. (2005)** Oral antidiabetic agents. Current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs.* 65: 385-411.

- **Larsen L, Ropke C. (2002)** Suppressors of cytokine signaling: SOCS. *Acta Patyologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica*. 110: 833–844.
- **Leahy JL. (2003)** What is the role for insulin therapy in type 2 diabetes?. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*. 10: 99-103.
- **Lebovitz H E. (2001)** Oral therapies for diabetic hyperglycemia. *Endocrin Metab Clin*. 30: 909-933.
- **Liu J, Divoux A, Sun J, Zhang J, Clément K, Glickman JN, Sukhova GK, Wolters PJ, Du J, Gorgun CZ, Doria A, Libby P, Blumberg RS, Kahn BB, Hotamisligil GS, Shi GP. (2009)** Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat Med*. 15: 940-945.
- **Liu X, Mameza MG, Lee YS, Eseonu CI, Yu CR, Kang Derwent JJ, Egwuagu CE. (2008)** Suppressors of cytokine-signaling proteins induce insulin resistance in the retina and promote survival of retinal cells. *Diabetes*. 57:1651–1658.
- **Livak KJ, Schmittgen TD. (2001)** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> Method. *Methods*. 25: 402-408.
- **Madonna S, Scarponi C, Sestito R, Pallotta S, Cavani A, Albanesi C. (2010)** The IFN-γ-Dependent Suppressor of Cytokine Signaling 1 Promoter Activity Is Positively Regulated by IFN Regulatory Factor-1 and Sp1 but Repressed by Growth Factor Independence-1b and Krüppel-Like Factor-4, and It Is Dysregulated in Psoriatic Keratinocytes. *The Journal of Immunology*. 185: 2467-2481.
- **Maedler K, Sergeev P, Ris F, Berholzer J, Joller-Jemelka HI, Spinass GA, Kaiser N, Halban PA, Donath MY. (2002)** Glucose-induced beta cell production of IL-1β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest*. 110: 851-860.
- **Mahmoud AA, Rodman HM, Mandel MA, Warren KS. (1976)** Induced and spontaneous diabetes mellitus and suppression of cell-mediated immunologic responses. Granuloma formation, delayed dermal reactivity and allograft rejection. *J Clin Invest*. 57: 362–367.
- **Maioli M, Pes GM, Delitala G, Puddu L, Falorni A, Tolu F, Lampis R, Orru V, Secchi G, Cicalo AM, Floris R, Madau GF, Pilosu RM, Whalen M, Cucca F. (2010)** Number of autoantibodies and HLA genotype, more than high titers of glutamic acid decarboxylase autoantibodies, predict insulin dependence in latent autoimmune diabetes of adults. *Eur J Endocrinol*. 163: 541–549.
- **Mata Cases M, Franch Nadal J, Goday Arno A. (2004)** Tratamiento oral con Metformina en la diabetes mellitus tipo 2: monoterapia y tratamiento oral combinado. *Med Clín*. 5: 14-28.
- **Menéndez E, Lafita J, Artola S, Millán J, Alonso Á, Puig M, García J.R, Álvarez F, García J, Mediavilla J, Miranda C, Romero Gonzalez R. (2010)** Recomendaciones para el tratamiento farmacológico de la hiperglucemia en la diabetes tipo 2. Documento consenso. *Avances en Diabetología*. 26: 331-338.
- **Mimbacas A, Pérez-Bravo F, Hidalgo PC, Javiel G, Pisciotto C, Grignola R, Jorge AM, Gallino JP, Gasagoite J, Cardozo H. (2003)** Association between diabetes type 1 and DQB1\* alleles in case-control study conducted in Montevideo, Uruguay. *Genet Mol Research*. 2: 29-35.
- **Morino K, Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Frattini J, Shatzkes N, Neschen S, White MF, Bilz S, Sono S, Pypaert M, Shulman GI. (2005)** Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J Clin Invest*. 115: 3587–3593.
- **Morrison T, Weis JJ, Wittwer CT. (1998)** Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*. 24: 954–962.
- **Nathan D, Buse J, Davidson M, Heine R, Colman R, Sherwin R, Zinman B. (2006)** Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy. *Diabetes care*. 29: 1963-1972.
- **Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki Y, Nagai R. (2009)** CD8<sup>+</sup> effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nature Medicine*. 15: 914-920.
- **OMS. (2011)** Centro de Prensa, Diabetes, Nota descriptiva N°312, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>.
- **O'Shea JJ, Paul WE. (2010)** Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4<sup>+</sup> T cells. *Science*. 327: 1098-1102.
- **O'Sullivan LA, Liongue C, Lewis RS, Stephenson SE, Ward AC. (2007)** Cytokine receptor signaling through the JAK-STAT-SOCS pathway in disease. *Mol Immunol*. 44: 2497–2506.
- **Pendergrass M, Bertoldo A, Bonadonna R, Nucci G, Mandarino L, Cobelli C, DeFronzo RA. (2007)** Muscle glucose transport and phosphorylation in type 2 diabetic, obese non-diabetic, and genetically predisposed individuals. *American Journal of Physiology- Endocrinology and Metabolism*. 292: 92–100.

- **Pham MN, Hawa MI, C Pflieger, Roden M, Schernthaner G, Pozzilli P, Buzzetti R, Scherbaum W, Seissler J, Kolb H, Hunter S, Leslie RDG, Schloot NC, Action LADA Study Group. (2011)** Pro- and anti-inflammatory cytokines in latent autoimmune diabetes in adults, type 1 and type 2 diabetes patients: Action LADA 4. *Diabetologia*. 54: 1630–1638.
- **Plouffe JF, Silva J Jr, Fekety R, Allen JL. (1978)** Cell-mediated immunity in diabetes mellitus. *Infection and Immunity*. 21: 425–429.
- **Pozzilli P, Buzzetti R. (2007)** A new expression of diabetes: double diabetes. *Trends Endocrin Metabol*. 18 (2): 52-57.
- **Pozzilli P, Di Mario U. (2001)** Autoimmune diabetes not requiring insulin at diagnosis (latent autoimmune diabetes of the adult) definition, characterization, and potential prevention. *Diabetes Care*. 24: 1460-1467.
- **Pratipanawatr W, Pratipanawatr T, Cusi K, Berria R, Adams JM, Jenkinson CP, Maezono K, DeFronzo RA, Mandarino LJ. (2001)** Skeletal muscle insulin resistance in normoglycemic subjects with a strong family history of type 2 diabetes is associated with decreased insulin-stimulated IRS-1 tyrosine phosphorylation. *Diabetes*. 50: 2572–2578.
- **Repine JE, Clawson CC, Goetz FC (1980)** Bactericidal function of neutrophils from patients with acute bacterial infections and from diabetes. *J Infect Dis*. 142: 869-875.
- **Robertson HD, Polk HC Jr. (1974)** The mechanism of infection in patients with diabetes mellitus: a review of leukocyte malfunction. *Surgery*. 75: 123–128.
- **Roebuck KA. (1999)** Oxidant stress regulation of IL-8 and ICAM-1 gene expression: differential activation and binding of the transcription factors AP-1 and NF-kappaB. *Int J Mol Med*. 4: 223-230.
- **Ronn SG, Billestrup N, Mandrup-Poulsen T. (2007)** Perspectives in diabetes and suppressors of cytokine signaling proteins. *Diabetes*. 56: 541-548.
- **Rothman DL, Magnusson I, Cline G, Gerard D, Kahn CR, Shulman RG, Shulman GI. (1995)** Decreased muscle glucose transport/phosphorylation is an early defect in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *PNAS USA*. 92: 983–987.
- **Saad MF, Knowler WC, Pettitt DJ, Nelson RG, Charles MA, Bennett PH. (1991)** A two-step model for development of non-insulindependent diabetes. *Am J Med*. 90: 229–235.
- **Sachithanandan N, Graham KL, Galic S, Honeyman JE, Fynch SL, Hewitt KA, Steinberg GR, Kay TW. (2011)** Macrophage deletion of SOCS1 increases sensitivity to LPS and palmitic acid and results in systemic inflammation and hepatic insulin resistance. *Diabetes*. 60: 2023–2031.
- **Sacks D. (2005)** Global Harmonization of HbA1c. *Clinical Chemistry*. 51: 681-683.
- **Saenz Calvo A, Fernández Esteban I, Mataix Sanjuan A, Ausejo Segura M, Roque M, Moher D.** Metformina para la diabetes mellitus tipo 2. Revisión sistemática y metaanálisis. *Aten Primaria*. 2005; 36: 183-91.
- **Samardzija M, Wenzel A, Aufenberg S, Thiersch M, Reme C, Grimm C. (2006)** Differential role of Jak-STAT signaling in retinal degenerations. *FASEB Journal*. 20: 2411–2413.
- **Schellhase KG, Koepsell TD, Weiss NS. (2005)** Glycemic control and the risk of multiple microvascular diabetic complications. *Clin Res Met Family Medicine*. 37: 125-130.
- **Schernthaner G, Barnett AH, Betteridge DJ, Carmena R, Ceriello A, Charbonnel B, Hanefeld M, Lehmann R, Malecki MT, Nesto R, Pirags V, Scheen A, Seufert J, Sjöholm A, Tsatsoulis A, DeFronzo R. (2010)** Is the ADA/EASD algorithm for the management of type 2 diabetes (January 2009) based on evidence or opinion? A critical analysis. *Diabetologia*. 53: 1258–1269.
- **Seacrest AM, Becker DJ, Kelsey SF, LaPorte RE, Orchard TJ. (2010)** Cause-specific mortality trends in a large population based cohort with long-standing childhood-onset type 1 diabetes. *Diabetes* 59: 3216–3222.
- **Shoelson S, Lee J, Goldfine A. (2006)** Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 116: 1793-1801.
- **Sjöholm A, Nystrom T. (2005)** Endothelial inflammation in insulin resistance. *Lancet*. 365: 610-612.
- **Soto González A, Bellido Guerrero D, Buño Soto M, Pertega Diaz S, Martínez-Olmos M, Vidal O. (2006)** Metabolic syndrome, insulin resistance and the inflammation markers C-reactive protein and ferritin. *Eur J Clin Nutr*. 60: 802–809.
- **Summers KL, Marleau AM, Mahon JL, McManus R, Hramiak I, Singh B (2006)** Reduced IFN- $\alpha$  secretion by blood dendritic cells in human diabetes. *Clin Immunol*. 121: 81–89.
- **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.
- **Trengove MC y Ward AC. (2013)** SOCS proteins in development and disease. *American journal of clinical and experimental immunology*. 2: 1-29.

- **Tuomi T, Carlsson A, Li H, Isomaa B, Miettinen A, Nilsson A, Nissén M, Ehrnström B, Forsén B, Snickars B, Lahti K, Forsblom C, Saloranta C, Taskinen M, Groop L. (1999)** Clinical and Genetic Characteristics of Type 2 Diabetes With and Without GAD Antibodies. *Diabetes*. 48: 150–157.
- **Turner RC, Holman RR, Stratton IM, Cull CA, Matthews DR, Manley SE, Frighi V, Wright D, Neil A, Kohner E, McElroy H, Foz C, Hadden D. (1998)** Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet*. 352: 854-865.
- **Ueki K, Kadowaki T, Kahn CR. (2005)** Role of suppressors of cytokine signaling SOCS-1 and SOCS-3 in hepatic steatosis and the metabolic syndrome. *Hepat Res*. 33: 185–192.
- **Ueki K, Kondo T, Tseng YH, Kahn CR. (2004)** Central role of suppressors of cytokine signaling proteins in hepatic steatosis, insulin resistance, and the metabolic syndrome in the mouse. *PNAS*. 101: 10422–10427.
- **Verdaguer J, Schmidt D, Amrani A, Anderson B, Averill N, Santamaria P. (1997)** Spontaneous autoimmune diabetes in monoclonal T cell nonobese diabetic mice. *The Journal of experimental medicine*. 186: 1663-1676.
- **Wellen KE, Hotamisligil GS. (2005)** Inflammation, stress and diabetes. *J Clin Invest*. 115: 1111-1119.
- **Weyer C, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE. (2001)** Insulin resistance and insulin secretory dysfunction are independent predictors of worsening of glucose tolerance during each stage of type 2 diabetes development. *Diabetes Care*. 24: 89-94.
- **Weykamp C, John WG, Mosca A, Hoshino T, Little R, Jeppsson JO, Goodall I, Miedema K, Myers G, Reinauer H, Sacks DB, Slingerland R, Siebelder C. (2008)** The IFCC Reference Measurement System for HbA1c: A 6-Year Progress Report. *Clinical Chemistry*. 54: 240–248.
- **Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, Dorfman R, Wang Y, Zielenski J, Mastronardi F, Maezawa Y, Drucker DJ, Engleman E, Winer D, Dosch HM. (2009)** Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med*. 15: 921-929.
- **Wojdacz TK, Dobrovic A. (2007)** Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucl Acids Res*. 35: 1-7.
- **Worm J, Aggerholm A, Guldborg P. (2001)** In-Tube DNA Methylation Profiling by Fluorescence Melting Curve Analysis. *Clin Chem*. 47: 1183–1189.
- **Wormald S, Zhang JG, Krebs DL, Mielke LA, Silver J, Alexander WS, Speed TP, Nicola NA, Hilton DJ. (2006)** The comparative roles of suppressor of cytokine signaling-1 and -3 in the inhibition and desensitization of cytokine signaling. *Biol Chem*. 281: 11135–11143.
- **Yoshimura A, Naka T, Kubo M. (2007)** SOCS proteins, cytokine signaling and immune regulation. *Nat Rev Immunol*. 7: 454-465.
- **Zhang P, Zhang X, Brown J, Vistisen D, Sicree R, Shaw J, Nichols G. (2010)** Global healthcare expenditure on diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pr*. 87: 293–301.
- **Zuo T, Tycko B, Liu TM, HJL Lin, Huang THM. (2009)** Methods in DNA methylation profiling. *Epigenomics*. 1: 331–345.

## 8-ANEXOS

Anexo 1 Aspectos técnicos

Anexo 2 Tablas

## **ANEXO 1:**

# **ASPECTOS TÉCNICOS**

## **1.1 Extracción de ADN por el método Fenol-Cloroformo**

### Lisado de glóbulos blancos

- Colocar 10 ml de sangre periférica extraídos mediante una jeringa con EDTA en tubos de rosca estériles de 50 ml.
- Agregar 3 volúmenes de buffer de lisis: NH<sub>4</sub>Cl 155 mM, KHCO<sub>3</sub> 10 mM (pH 7.4), EDTA mM (pH 8) , SSC 1X a partir de 20X (NaCl 3M, Citrato de Sodio 0.3M)
- Dejar 15 minutos en hielo, agitar esporádicamente
- Centrifugar 10 minutos a 1000rpm
- Eliminar el sobrenadante
- Lavar el pellet con SSC 1X
- Resuspender el pellet en buffer SE: NaCl 75 mM, EDTA 24 mM (pH 8)
- Agregar 500 microlitros de SDS 10% y 100 microlitros de proteinasa K (10 mg/ml)
- Colocar en baño con agitación a 50 rpm a 50° C over night

### Extracción con Fenol-Cloroformo

- Agregar un volumen de fenol
- Mezclar 15 minutos hasta obtener una emulsión completa
- Centrifugar 10 minutos a 2000 rpm
- Transferir la fase acuosa a otro tubo de polipropileno de 15 ml con tapa
- Agregar 1 volumen de cloroformo alcohol isoamílico (24:1)
- Agitar durante 10 minutos
- Centrifugar durante 5 minutos a 2000 rpm
- Extraer la fase acuosa

### Precipitación

- Agregar 0.3 volúmenes de acetato de sodio 2M (pH 5.5)
- Agregar 2 volúmenes de etanol 100%
- Mezclar por inversión hasta que se forme el precipitado
- Recuperar el ADN precipitado en un tubo estéril de eppendorf de 2 ml
- Lavar el ADN 3 veces con 1 ml de etanol 70%
- Secar el precipitado al aire
- Resuspender en 0.1 a 1 ml de buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1mM)
- Dejar en baño con agitación a 50° C over night

## 1.2 Caracterización del epigenoma. Modificación del ADN con Bisulfito de Na

### Modificación

- Poner baño a 50°C.
- Medir concentración de ADN
- Poner 1 µgr de ADN + 50 µl de H<sub>2</sub>O + 5,7 µl NaOH 3M (hacer control sin ADN) Incubar 10-15 min a 37°C
- Adicionar 33 ul de Hidroquinona 20 mM (antioxidante) + 530 ul de bisulfito de Na 4,3M pH5
- Mezclar e incubar 16 hrs a 50°C tapado con aluminio.

### Purificación del ADN

- Realizar la purificación del ADN preferiblemente por kit de purificación con columnas.
- Eluir en 50 µl de H<sub>2</sub>O

### Precipitación del ADN

- Anadir 5,7 µl de NaOH 3M e incubar 15-20 min a 37°C.
- Hacer mix: 1 µl de glicógeno 10 mg/ml + 17 µl de AcNH<sub>4</sub> 10M por muestra.
- Añadir 18 µl del mix anterior a cada muestra.
- Añadir 450 µl de EtOH absoluto frio.
- Incubar a -80°C 3 hrs u overnigth.
- Centrifugar 20 min a 12.000 rpm a 4°C.
- Tirar sobrenadante con pipeta.
- Añadir 1 ml de EtOH 70% y centrifugar 10 min a 12.000 rpm.
- Sacar sobrenadante con micropipeta y dejar secar el pellet.
- Resuspender el pellet en 30 µl de H<sub>2</sub>O.

### PCR de metilación

- Se realiza la reacción de PCR de acuerdo a la región a analizar.
- Se utilizan primers diseñados por programas específicos de metilación.
- Con controles de ADN no convertido con Bisulfito de Sodio.

## **ANEXO 2:**

# **TABLAS**

### **2.1 Test de Shapiro-Wilk W para normalidad en muestras de N<50**

<b>VARIABLE</b>	<b>ESTADÍSTICO W</b>	<b>P VALOR</b>	<b>RECHAZO O ACEPTACIÓN DE H NULA</b>
EDAD DE DIAGNÓSTICO	0,972587	0,432927	Sigue distribución normal
PESO	0,970231	0,350848	Sigue distribución normal
CINTURA	0,971717	0,423317	Sigue distribución normal
IMC	0,927295	0,011757	Rechazamos H <sub>0</sub>
PA SISTÓLICA	0,871799	0,00027	Rechazamos H <sub>0</sub>
PA DIASTÓLICA	0,931634	0,016368	Rechazamos H <sub>0</sub>
COLESTEROL	0,899324	0,002823	Rechazamos H <sub>0</sub>
HDL	0,986153	0,917361	Sigue distribución normal
LDL	0,973742	0,518835	Sigue distribución normal
TRIGLICERIDOS	0,859706	0,000267	Rechazamos H <sub>0</sub>
GLUCEMIA	0,865589	0,000262	Rechazamos H <sub>0</sub>
HbA1c PREVIO A TTO	0,960970	0,170068	Sigue distribución normal
HbA1c POSTERIOR AL TTO	0,961565	0,178386	Sigue distribución normal
DIFERENCIAS ENTRE VALORES DE HbA1c	0,919959	0,006801	Rechazamos H <sub>0</sub>

### **2.2 Valores de Tm en °C para cada muestra**

<b>Muestra</b>	<b>Cumple con criterio de respuesta a la droga</b>	<b>Promedio de Tm (°C) entre replicas</b>
1	NO	86.7
2	NO	86.3
3	NO	86.2
4	NO	86.2
5	NO	86.7
6	NO	86.5
7	NO	86.6
8	NO	86.5
9	NO	86.1
10	NO	86.1
11	NO	86.7
12	NO	86.5
13	NO	86.1
14	NO	86.7
15	NO	86.1
16	NO	86.1
17	NO	86.5
18	NO	86.6
19	NO	86.5
20	NO	86.6
Promedio total de Tm de "No respondedores"		86.4150

Muestra	Cumple con criterio de respuesta a la droga	Promedio de Tm (°C) entre replicas
1	SI	85.65
2	SI	85.65
3	SI	85.8
4	SI	85.75
5	SI	85.9
6	SI	85.8
7	SI	85.9
8	SI	85.9
9	SI	85.25
10	SI	85.6
11	SI	85.9
12	SI	85.3
13	SI	85.25
14	SI	85.9
15	SI	85.9
16	SI	85.8
17	SI	85.85
18	SI	85.7
19	SI	85.75
20	SI	85.9
Promedio total de Tm de "Respondedores"		85.7225