

FUNDACIÓN H. A.
BARCELÓ
FACULTAD DE MEDICINA



**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN Y LA REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE
MOLÉCULAS INFLAMATORIAS, EN PACIENTES CON OBESIDAD Y
DIABETES TIPO 2 TRATADOS MEDIANTE CIRUGÍA BARIÁTRICA.**

DIRECTOR: Cerrone, Gloria

CODIRECTOR: Frechtel, Gustavo

INVESTIGADORES COLABORADORES:

López, Ariel Pablo

Millán, Andrea

Díaz, Silvina

Laguarde, Natalia

Gutt, Susana

SEDE-LUGAR: Buenos Aires

PERIODO: 2018-2019

CONTACTO DEL AUTOR: glorycerrone@gmail.com

Índice

I. Resumen /Abstract

El presente proyecto de investigación propone el estudio de los aspectos moleculares que intervienen en la etiopatogenia de enfermedades metabólicas con alto impacto en Salud Pública como la Obesidad y la DM2.

La inflamación subclínica sistémica, a partir de monocitos circulantes activados en sangre periférica y macrófagos depositados en diferentes tejidos, cuya activación se ejerce por LPS y AGL sobre el receptor TLR4, es uno de los principales mecanismos que determina el desarrollo de DM2 y obesidad. La activación de los receptores de tipo Toll 4 (TLR4), presentes en monocitos circulantes inician la respuesta inflamatoria y determinarían el aumento de la expresión de IL-1 β . Dicha interleuquina es la citoquina inflamatoria que ha demostrado mayor acción en el deterioro de los mecanismos fisiopatológicos más frecuentes como son la resistencia a la insulina y la disfunción de la célula β , en la progresión a DM2. Además, la disminución de la inflamación de bajo grado dependería de modificaciones epigenéticas y del tamaño del telómero, inducidas por la intervención quirúrgica de individuos DM2 y obesos.

Se evaluaron los niveles de ARNm de leucocitos mononucleares y serológicos de Interleuquina 1-beta (IL-1 β), y el genotipo rs16944 (-511C/T) en el promotor del gen IL-1 β , en relación con la normalización hiperglucémica en pacientes con diabetes tipo 2 (DM2). Estudiamos 30 individuos recientemente diagnosticados de DM2 con hiperglucemia en el tiempo basal y después de 6 y 12 meses del tratamiento de normalización. En el tiempo basal, la presencia del alelo polimórfico T del rs16944 se asoció con una expresión de ARNm de IL-1 β más baja ($p = 0,006$); y un mayor nivel de glucosa fue correlacionado positivamente con los niveles de proteína IL-1 β ($p = 0.015$). Después del tratamiento, los individuos mostraron una disminución significativa en el nivel de glucosa ($p = 0.003$), pero no expresaron cambios significativos en los niveles séricos de IL-1 β . Sorprendentemente, observamos que las mayores disminuciones en el nivel de glucosa se asociaron con un aumento de los niveles séricos de IL-1 β ($p = 0.040$).

Este es el primer estudio de seguimiento que evalúa la expresión de ARNm de IL-1 β y los niveles séricos en individuos con DM2 hiperglucémica y luego del tratamiento de normalización glucémica. Los resultados actuales contribuyen al conocimiento de la relación entre la inflamación y el metabolismo de la glucosa en la DM2.

Por otra parte, se observó el impacto del estado de inflamación sobre la longitud de los telómeros. EL mayor aumento del tamaño de los telómeros se asoció a mayores descensos de los valores de PCR-us. El tratamiento quirúrgico de la obesidad mórbida ya sea a través de la manga gástrica o del BGYR, no solo redundaría en beneficios a nivel del estado metabólico, sino que también revierte el acortamiento telomérico al menos a corto plazo.

II. Introducción:

a. Planteamiento del Problema (pregunta problema) y su contextualización

La diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), la obesidad y el síndrome metabólico (SM) se inscriben dentro de las denominadas enfermedades complejas cuya etiopatogenia estriba en interacciones entre factores genéticos predisponentes y factores ambientales desencadenantes. Los estudios incipientes de epigenética en DM2, están demostrando la asociación de estos mecanismos epigenéticos con la enfermedad.

Uno de los principales mecanismos fisiopatológicos que determina el desarrollo y progresión de estas enfermedades metabólicas, es la inflamación crónica subclínica sistémica secundaria a la hiperactividad de la inmunidad innata. En este contexto se estudió la molécula pro-inflamatoria Interleuquina 1 beta (IL-1 β), una de las citoquinas que ha demostrado mayor acción en el deterioro de la función de la célula β pancreática y en la progresión a DM2. El aumento tanto de los niveles circulantes de IL-1 β como la expresión de ARNm de IL-1 β en monocitos de sangre periférica fue previamente comprobada en pacientes con DM2, e inclusive los niveles de IL-1 β se correlacionaron con la concentración de glucemia en ayunas.

La presentación del presente proyecto de investigación se basa en el conocimiento previo de la acción patológica que el estado de inflamación subclínico y específicamente ciertas citoquinas inflamatorias como IL-1 β , pueden presentar sobre la función de la célula β del páncreas, en pacientes con DM2 y otras alteraciones metabólicas asociadas como la obesidad.

Los telómeros son complejos nucleoproteicos ubicados en los extremos de los cromosomas, cuya función es prevenir el daño en el ADN e intervenir en procesos de reparación del mismo, y su longitud es utilizado como marcador de envejecimiento celular. Se ha encontrado una asociación entre la presencia de enfermedades metabólicas y una menor longitud telomérica (LT), relacionado con el estado de inflamación y el aumento del estrés oxidativo. Considerando que se han descrito efecto benéfico de la cirugía bariátrica (CB) sobre aspectos metabólicos generales de pacientes obesos, nuestro objetivo es determinar la longitud telomérica absoluta (LTa) en personas obesas sometidas a CB, en su relación con el metabolismo lipoproteico general, la resistencia insulínica (RI) y el estado inflamatorio.

El diseño que se propone corresponde a un análisis no familiar, por un lado, un estudio longitudinal de individuos diabéticos de reciente diagnóstico sometidos a un protocolo de compensación metabólica, y, por otra parte, pacientes obesos con y sin diabetes tipo 2 seleccionados para ser sometidos a cirugía bariátrica (CB).

Se reclutaron 30 personas con DM2 de reciente diagnóstico con descontrol metabólico, caracterizado por la determinación de HbA_{1c} mayor de 8%. Posteriormente estas 30 personas fueron compensadas metabólicamente, comprobado por la disminución de la HbA_{1c} a un valor menor a 7%. El tratamiento consistió en medidas higiénico-dietéticas y la utilización de drogas antidiabéticas orales, con un tiempo de tratamiento de 12 meses. Se tomaron una muestra inicial, y muestras a los 6 y 12 meses de tratamiento. De los 30 pacientes totales, 3 de ellos abandonaron el protocolo.

Por otra parte, se reclutaron individuos obesos en el Servicio de Nutrición del Hospital Italiano de Buenos Aires (Dra. Susana Gutt, Jefa del Servicio) de acuerdo a criterios habituales de selección para ser tratados mediante cirugía bariátrica. Se incluyeron pacientes con obesidad con y sin DM 2, que aceptaron participar en el estudio. Estos pacientes se parearon por sexo y edad con individuos no obesos y no diabéticos, a los que se le realizó la medición de las mismas variables bioquímicas y antropométricas que a los pacientes que serán sometidos a CB. En la fase preoperatoria inmediata, a las 48hs y luego de 1 y 6 meses, a todos los pacientes se les realizó una extracción de sangre con 12 horas de ayuno para analizar variables bioquímicas y el estudio genético.

b. Justificación y Relevancia

El presente proyecto de investigación propone el estudio de los aspectos moleculares que intervienen en la etiopatogenia de enfermedades metabólicas con alto impacto en Salud Pública como la Obesidad y la DM2. Estas enfermedades presentan una alta prevalencia en la población general y se constituyen en un factor de riesgo significativo para el desarrollo de enfermedad cardiovascular.

Por lo tanto, cobran importancia todos los avances que se puedan realizar en el conocimiento de las mismas, orientado fundamentalmente a medidas preventivas destinadas a evitar su desarrollo o su progresión, en definitiva, la adopción de medidas de prevención primaria o secundaria.

Justamente, en el actual proyecto de investigación, se presenta el estudio de alteraciones moleculares que pueden establecer un enlace entre la susceptibilidad genética y los factores ambientales desencadenantes, característica fundamental de estas enfermedades metabólicas. Por otra parte, se estudiará la respuesta específica del individuo a los cambios ambientales realizados en un protocolo de intervención terapéutica.

La aplicación de este proyecto debería ser altamente favorable ya que propone el estudio de un área escasamente explorado como es la problemática de interés referida a la regulación de la expresión de moléculas de la inflamación y su respuesta a medidas de intervención consistentes en cambios en el estilo de vida.

c. Objetivos: General y Específico

-Generales

El objetivo principal de nuestro trabajo fue estudiar la expresión de ARNm de IL-1 β en leucocitos mononucleares y los niveles de IL-1 β , el genotipo rs16944 SNP (-511C / T) presente en el promotor del gen IL-1 β y el tamaño telomérico; a través de dos estudios prospectivos controlados: en personas con DM2 que recibieron un tratamiento de normalización glucémica y en individuos con obesidad sometidos a cirugía bariátrica.

-Específicos

Se propone analizar antes, y a los 1, 6 y 12 meses de realizada cada intervención, en células mononucleares (MN) circulantes de sangre periférica:

1) Cuantificación relativa de la expresión de ARNm de IL-1 β en leucocitos mononucleares

- 2) Dosaje de IL-1 β en suero
- 3) Genotipificación del SNP rs16944 (IL-1 β -511C/T)
- 4) Determinación de la longitud telomérica absoluta (LTa).
- 5) Evaluación de los niveles de ARNm de leucocitos mononucleares y serológicos de IL-1 β , y el genotipo rs16944 (-511C/T) en el promotor del gen IL-1 β , en relación con la normalización hiperglucémica en pacientes con diabetes tipo 2 (DM2).
- 6) Evaluación de los niveles de ARNm de leucocitos mononucleares y serológicos de IL-1 β , en relación con el tratamiento de cirugía bariátrica en pacientes con obesidad.
- 7) La asociación entre el tamaño del telómero con niveles circulantes de IL-1 β en sangre periférica.
- 8) La asociación entre el tamaño del telómero con la expresión (Proteína y ARNm) IL-1 β .
- 9) La asociación entre el tamaño del telómero con variables clínicas y bioquímicas (v.g. glucemia en ayunas, HOMA, nivel de lípidos circulantes, IMC, etc.)
- 10) Evaluar si la mejoría metabólica que presentan los pacientes DM2 después de la intervención normalizadora de la glucemia y de los pacientes obesos luego de la cirugía bariátrica, se correlaciona con modificaciones en la expresión de la molécula inflamatoria estudiada y/o el tamaño del telómero.

d. Marco conceptual

Nos planteamos como hipótesis que el aumento de los niveles de expresión de IL-1 β en DM2 y obesos están modulados por mecanismos epigenéticos y por polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) presentes en dicho gen. Por otro lado, que la LT es menor en personas con alteraciones metabólicas. Además, que la corrección de la hiperglucemia en pacientes con DM2, y el descenso de peso en pacientes obesos, influyen en la LT y en la expresión de IL-1 β . No hay estudios clínicos que hayan explorado esta hipótesis. Es inédita la correlación de estos aspectos funcionales de citoquinas proinflamatorias con estudios epigenéticos y polimorfismos de los genes de IL-1 β .

III. Metodología

a. Tipo de estudio

Estudio prospectivo controlado en personas con diabetes tipo 2 sometidas a tratamiento de normalización glucémica y en pacientes con obesidad sometidas a cirugía bariátrica.

b. Muestra

Para el protocolo de cirugía bariátrica se reclutaron 43 personas, de las cuales 37 fueron operadas y completaron el protocolo. El abordaje quirúrgico fue por Bypass gástrico en Y-Roux (BGYR) y

gastrectomía en manga, dependiendo de cada caso particular. Se tomaron muestras de sangre en un momento basal, y a los 6 y 12 meses postquirúrgicos.

c. Ámbito de estudio

El reclutamiento de pacientes y la cirugía bariátrica, así como los estudios bioquímicos se realizaron en el Hospital Italiano. Los estudios de expresión génica, de polimorfismos genéticos y del tamaño telomérico se realizaron en el Instituto INIGEM (Universidad de Buenos Aires- CONICET).

d. Fuentes e instrumento de recolección de datos

La base de datos personales, antropométricos, bioquímicos, genéticos, así como el análisis estadístico, se realizó con el paquete estadístico SPSS versión 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EE.UU.).

e. Procesamiento y Análisis de la información

El estudio de las variables bioquímico-clínicas en los pacientes en cada etapa del estudio se realizó por ANOVA de una vía para muestras pareadas y test post-hoc de Bonferroni. Las frecuencias alélicas y genotípicas se calcularon por conteo directo, y se evaluó si los SNPs estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg mediante la prueba de Chi cuadrado. El estudio de la expresión de ARNm y la expresión proteica también se realizó por ANOVA de una vía para muestras pareadas y test post-hoc de Bonferroni. El análisis de la expresión de ARNm se realizó comparando los valores de ΔC_t en cada momento del estudio, ya que esta variable mostró distribución normal. A través de regresión lineal, con edad y sexo como covariables, se evaluó la asociación entre los genotipos de los SNPs, la expresión de ARNm y la expresión proteica, y se evaluó la asociación entre las variables bioquímico-clínicas, y expresión de ARNm y proteína. Se consideró estadísticamente significativo un valor de p por debajo de 0,05.

IV. Resultados

• Estudio prospectivo controlado en personas con DM2

Se reclutaron 30 personas con DM2 de reciente diagnóstico con descontrol metabólico, caracterizado por la determinación de HbA1c mayor de 8%. Posteriormente estas 30 personas fueron compensadas metabólicamente, comprobado por la disminución de la HbA1c a un valor menor a 7%. El tratamiento consistió en medidas higiénico-dietéticas y la utilización de drogas antidiabéticas orales, con un tiempo de tratamiento de 12 meses. Se tomaron una muestra inicial, y muestras a los 6 y 12 meses de tratamiento. De los 30 pacientes totales, 3 de ellos abandonaron el protocolo.

La población estudiada comprendió 7 mujeres (23,33%) y 23 hombres (76,67%), con una edad media de 48,17 años (DE = 12,37; rango: 23-69 años). En todos los tiempos se hicieron mediciones antropométricas, del metabolismo lipoproteico general, RI y estado inflamatorio. La Tabla I muestra el perfil bioquímico y clínico del grupo previo a la intervención, que coincide con el esperado para individuos con DM2.

La tabla I muestra el perfil bioquímico y clínico del grupo posterior a la intervención. Cuando se analizaron las características bioquímicas-clínicas, se observó una disminución significativa en el peso y el IMC después de 6 meses de tratamiento, seguido de un aumento significativo en HDL-C después de 12 meses de tratamiento. No hubo cambios significativos en ninguna de las otras variables metabólicas.

Tabla I: Características bioquímicas y clínicas de la población con DM2 en cada momento del estudio.

	Estudio Prospectivo controlado						
	Grupo Pre-intervención	(n = 27)					
	(n = 30)	Tiempo de intervención (meses)			Evaluación Estadística	Test <i>post-hoc</i>	
		0	6	12		0-6	0-12
	m (IQR)	m (RIQ)	m (RIQ)	m (RIQ)	P	p	p
Peso (kg)	91.75 (81.65 - 113.63)	87.00 (81.50 - 107.00)	86.00 (78.50 - 103.20)	88.40 (78.20 - 99.50)	0.033	0.035	NS
IMC (kg m ⁻²)	33.17 (30.82 - 38.64)	32.91 (30.12 - 37.92)	31.23 (29.21 - 37.74)	31.91 (28.88 - 36.93)	0.033	0.035	NS
Circunferencia de cintura (cm)	106.0 (100.0 - 116.5)	102.5 (99.5 - 114.5)	100.0 (96.5 - 120.0)	106.00 (100.00 - 117.5)	NS	NS	NS
PAS (mmHg)	133 (120 - 153)	135 (120 - 150)	120 (120 - 140)	120 (120 - 140)	NS	NS	NS
PAD (mmHg)	80 (65 - 90)	80 (65 - 90)	70 (70 - 80)	75 (70 - 84)	NS	NS	NS
HbA _{1c} (%)	9.13 (8.09 - 11.23)	9.03 (8.05 - 11.22)	6.34 (5.84 - 7.03)	6.13 (5.74 - 6.81)	< 0.001	< 0.001	< 0.001
GPA (mg dL ⁻¹)	153 (132 - 268)	147 (131 - 265)	108 (98 - 136)	114 (102 - 120)	< 0.001	< 0.001	< 0.001
TC (mg dL ⁻¹)	211 (181 - 235)	210 (180 - 232)	196 (171 - 232)	196 (162 - 218)	NS	NS	NS
HDL-C (mg dL ⁻¹)	40 (34 - 47)	39 (33 - 47)	41 (37 - 45)	43 (38 - 51)	0.026	NS	0.027
LDL-C (mg dL ⁻¹)	122 (105 - 143)	120 (104 - 140)	111 (94 - 141)	109 (94 - 131)	NS	NS	NS
TG (mg dL ⁻¹)	153 (115 - 143)	150 (115 - 247)	200 (133 - 259)	148 (94 - 239)	NS	NS	NS

IMC: índice de masa corporal; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; HbA_{1c}: hemoglobina glucosilada; GPA: glucosa plasmática en ayunas; TC: colesterol total; HDL-C: colesterol de lipoproteínas de alta densidad; LDL-C: colesterol de lipoproteínas de baja densidad; TG: triglicéridos; m: mediana; IQR: rango intercuartil; NS: no significativo. Evaluación estadística: prueba de Friedman

Los individuos alcanzaron el objetivo del control glucémico después de 6 meses de tratamiento y lo mantuvieron después de 12 meses, como lo demuestra la disminución significativa de GPA y HbA_{1c} en las etapas posteriores a la intervención. Se observó una disminución significativa de la glucemia (ANOVA de una vía para muestras pareadas. p=0,005; 0 vs 6 meses de tratamiento: p=0,003; 0 vs 12 meses de tratamiento: p=0,003) y la HbA_{1c} (ANOVA de una vía para muestras pareadas. p<0,001; 0 vs 6 meses de tratamiento: p<0,001; 0 vs 12 meses de tratamiento: p<0,001) en las etapas post-intervención.

- **Expresión de IL-1 β basal**

Se analizó la expresión de ARNm de IL-1 β y la concentración de proteína circulante en suero, y no encontramos ningún cambio significativo a los 6 o 12 meses después del tratamiento. No hubo asociación entre la expresión de ARNm de IL-1 β y los niveles de proteína sérica.

La mediana de la concentración sérica de IL-1 β al comienzo del estudio fue de 10.40pg/mL (rango intercuartil [RIQ]: 1.50 - 16.35 pg / mL). Trece individuos (43.33%) mostraron valores dentro del rango de referencia (<5 pg / mL) y 17 individuos (56.67%) mostraron valores superiores (\geq 5 pg / mL). En el momento basal del estudio, los niveles elevados de IL-1 β en suero se asociaron positivamente con los intervalos de mayor glucemia (Regresión lineal. $p=0,015$, $r=0,378$, IC 95% $r=0,078/0,678$), demostrando que esta relación se mantiene aún en estados de hiperglucemia. (Figura 1).

La expresión de ARNm de IL-1 β no se correlacionó con ninguna variable bioquímica-química analizada.

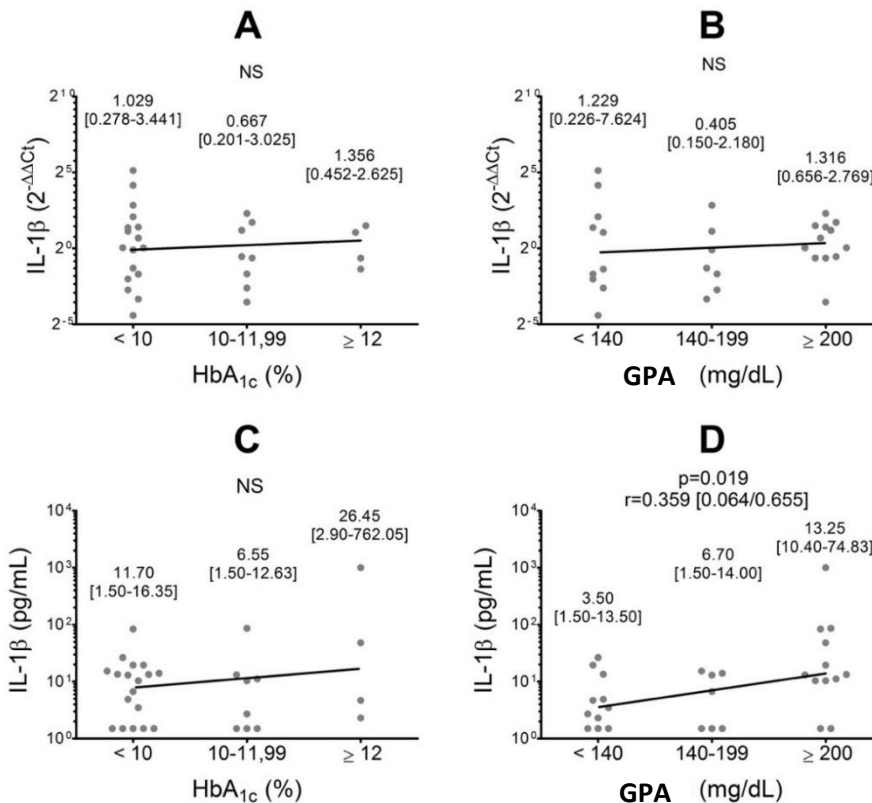


Figura 1: Expresión de ARNm de IL-1 β (A-B) y niveles de proteína sérica (C-D) en el momento basal del estudio (grupo previo a la intervención), según HbA_{1c} y niveles de glucosa en plasma en ayunas. Para cada conjunto de datos se informa la mediana y el rango intercuartil (RIQ). HbA_{1c}: hemoglobina glucosilada; GPA: glucosa plasmática en ayunas; r: coeficiente de regresión; NS: no significativo. Evaluación estadística: regresión lineal múltiple. Covariables: edad, género y peso.

- **Genotipo de rs16944 en el gen IL-1 β**

Las frecuencias genotípicas de rs16944 en el gen IL-1 β fueron las siguientes: 8 individuos fueron CC (26.7%), 15 individuos CT (50.0%) y 7 individuos TT (23.3%). El SNP tuvo una distribución de genotipo de acuerdo con las esperadas por el cálculo según la ley de Hardy-Weinberg ($p = 0.995$).

Encontramos una asociación significativa entre la presencia del alelo polimórfico T del rs16944 en el gen IL-1 β y la menor expresión de ARNm de IL-1 β (Regresión lineal. $p=0,006$; $r=2,76$; IC95% $r=0,86/4,67$) (Figura 2). No hubo asociación entre el genotipo rs16944 y la concentración sérica de IL-1 β .

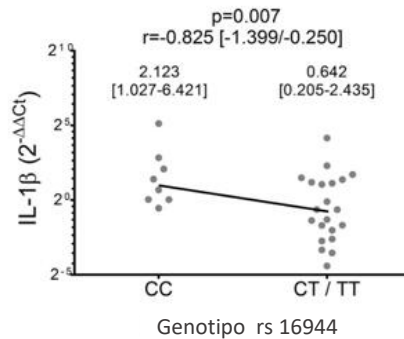


Figura 2: Expresión de ARNm de IL-1 β en el momento basal del estudio (grupo de pre-intervención), según el genotipo rs16944. Para cada conjunto de datos se informa la mediana y el rango intercuartil (RIQ). r: coeficiente de regresión. Evaluación estadística: regresión lineal múltiple. Covariables: edad, género y peso.

- **Expresión de IL-1 β en función del tratamiento de compensación metabólica**

Es de destacar que, la expresión de ARNm de IL-1 β (Figura 3 A y B) y los niveles de proteína sérica (Figura 3 C y D) no presentaron diferencias significativas con respecto al tiempo previo a la intervención.

La disminución más pronunciada de HbA1c (Figura 4 A y B) y GPA (Figura 4 C y D) después del tratamiento se asociaron con mayores reducciones en los niveles de proteína IL-1 β .

Encontramos que las mayores disminuciones en la glucemia y la HbA1c después del tratamiento se asociaron con aumentos en los niveles circulantes de IL-1 β , lo que podría ser una de las razones por las cuales no hubo cambios significativos en los niveles séricos de IL-1 β después de 6 y 12 meses de tratamiento, a pesar de que encontramos una asociación positiva entre los niveles de IL-1 β en suero y la glucemia, y que todas las personas mostraron una disminución significativa en la glucemia y la HbA1c después del tratamiento. Esto podría estar relacionado con una mejora en la eficiencia de traducción luego de la corrección del estado de hiperglucemia.

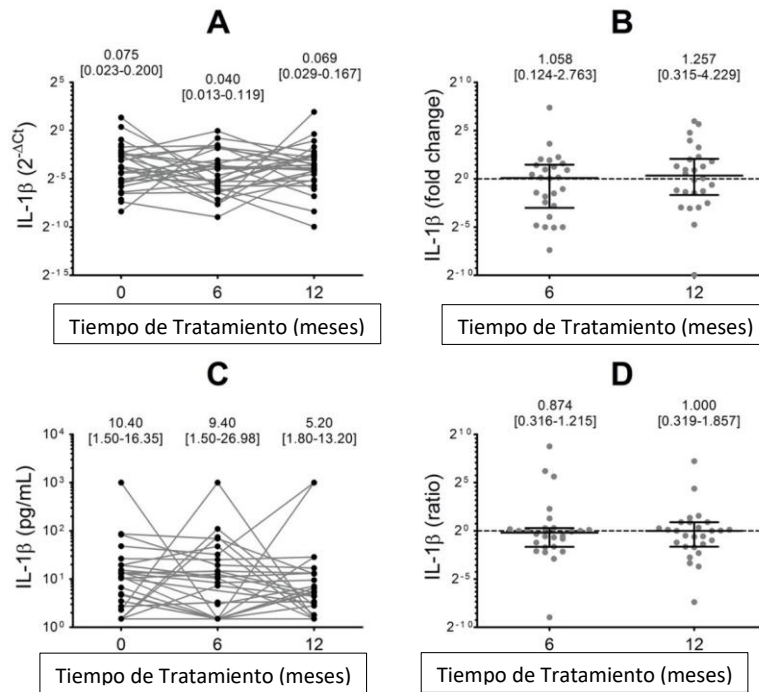


Figura 3: expresión de ARNm de IL-1 β y niveles séricos en cada momento del estudio y variación después de 6 y 12 meses de tratamiento. (A) Los niveles de expresión de ARNm de IL-1 β y (B) cambian el pliegue después del tratamiento. (C) Niveles de proteína sérica IL-1 β y (D) relación de variación después del tratamiento: nivel de proteína sérica después del tratamiento dividido por el nivel inicial de proteína sérica (0 meses). Para cada conjunto de datos se informa la mediana y el rango intercuartil. Evaluación estadística: prueba de Friedman. Todas las comparaciones no fueron significativas.

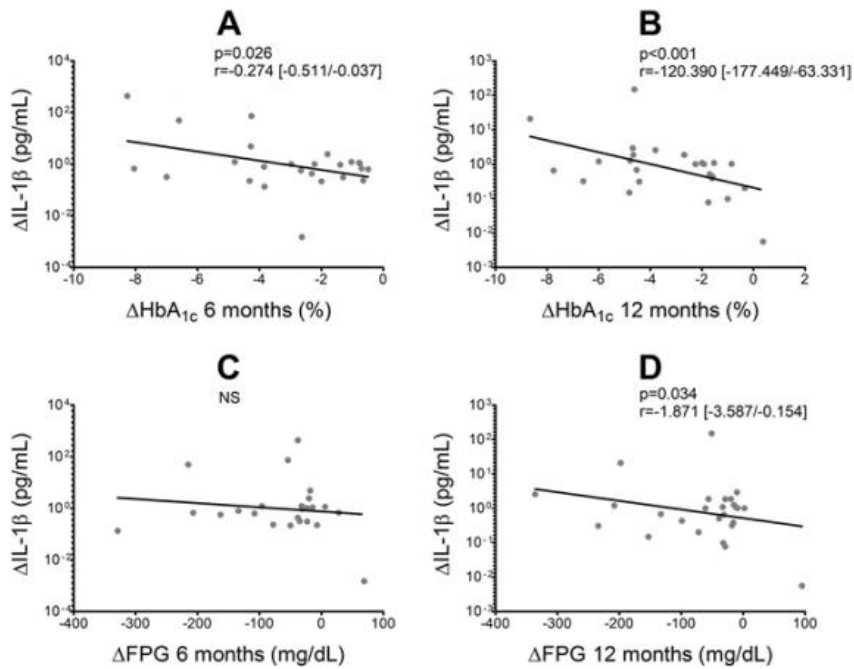


Figura 4: Variaciones en los niveles séricos de IL-1 β en función de las variaciones en los niveles de HbA_{1c} (A-B) y glucosa plasmática en ayunas (C-D), después de 6 y 12 meses de tratamiento. Para fines gráficos, las variaciones en los niveles séricos de IL-1 β se muestran como las diferencias de los logaritmos. Covariables: edad, género y peso. HbA_{1c}: hemoglobina glucosilada; GPA: glucosa en plasma en ayunas; r: coeficiente de regresión; NS: no significativo. Evaluación estadística: regresión lineal múltiple.

Se determinó la LTa en estas personas, y no se observaron cambios significativos con el tiempo de tratamiento. Sin embargo, se halló una correlación positiva significativa entre la dosis de metformina administrada (principal droga antidiabética utilizada en estos pacientes) y la variación de la LTa a los 6 meses de tratamiento (Regresión lineal. $p=0,007$, $r=0,508$, IC 95% $r=$), en donde las personas que recibieron las mayores dosis de metformina presentaron un aumento en la LTa.

- **Estudio prospectivo controlado en pacientes con obesidad**

Se reclutaron 43 individuos, de las cuales 37 fueron operadas y completaron el protocolo. El abordaje quirúrgico fue por Bypass gástrico en Y-Roux (BGYR) y gastrectomía en manga, dependiendo de cada caso particular. Se tomaron muestras de sangre en un momento basal, y a las 48 hs, 30 días y 6 meses postquirúrgicos.

Tabla II: Características bioquímicas y clínicas de la población con obesidad en cada momento del estudio.

	T0	T30	T6	T0 vs T30	T30 vs T6	T0 vs T6
	M ± DE	M ± DE	M ± DE	p	p	p
Peso (kg)	116,7 ± 23,1	100,5 ± 17,1	86,75±15,06	<0,001	<0,001	<0,001
Indice de masa corporal (kg/m ²)	41,6 ± 4,8	35,97 ± 3,80	31,02 ± 3,08	<0,001	<0,001	<0,001
Circunferencia de cintura (cm)	124,5 ± 16,7	117,0 ± 17,9	100,77 ± 14,55	<0,001	<0,001	<0,001
Nivel de grasa visceral	23 ± 2	21 ± 4	14,95 ± 3,97	0,017	<0,001	<0,001
Contenido de grasa (kg)	54,7 ± 5,4	44,9 ± 10,9	36,50 ± 7,16	<0,001	<0,001	<0,001
Masa libre de grasa (kg)	61,9 ± 14,7	56,3 ± 12,2	55,33 ± 12,07	<0,001	0,008	<0,001
Masa musculo esquelético (Kg)	34,7 ± 8,7	31,1 ± 7,3	30,23 ± 7,02	<0,001	0,001	<0,001
Triglicéridos (mg/dl)	182 ± 81	136 ± 39	115,60 ± 44,52	0,003	0,039	<0,001
Colesterol total (mg/dl)	177 ± 35	171 ± 36	189,68 ± 45,02	NS	0,018	0,020
Glucemia (mg/dl)	119 ± 40	97 ± 17	98,18 ± 23,16	0,006	NS	0,005
Hemoglobina Glicosilada (%)	6,68 ± 1,55	5,89 ± 0,61	5,68 ± 0,61	0,005	0,011	0,005
C-HDL (mg/dl)	46 ± 10	40 ± 9	49,43 ± 10,78	<0,001	<0,001	0,034
C-LDL (mg/dl)	91 ± 32	105 ± 28	117,33 ± 37,77	NS	NS	0,020
Insulina (U/dl)	29,9 ± 36,9	8,2 ± 3,1	7,36 ± 4,02	0,023	NS	0,037
HOMA	8,84 ± 8,68	1,97 ± 0,73	1,81 ± 1,33	0,017	NS	0,025
Proteína C reactiva (mg/l)	5,95 ± 4,50	3,51 ± 2,32	1,95 ± 2,48	0,015	0,035	0,001

Prueba T para muestras relacionadas. M: Media; DE: Desvío Estándar; NS: no significativo. $p<0,05$ significativo

Luego de la cirugía bariátrica se observó una disminución de todos los parámetros relacionados con la masa corporal (IMC, nivel de grasa visceral, circunferencia de cintura, contenido de grasa, masa libre de grasa y masa de músculo esquelético) que se evidencia después del primer mes y se mantiene a los 6 meses. Además, se observó una mejora en los parámetros metabólicos, con una disminución en la PAS, aumento en el c-HDL, disminución en los TG, disminución en la glucemia y disminución en la HbA1c. Se observó un aumento en la insulino-sensibilidad demostrado por un descenso del HOMA. El nivel de inflamación, medido por la PCR-us, evidenció una disminución significativa a los 6 meses postquirúrgicos.

- **Estudio de la longitud telomérica**

La determinación de la LTa se llevó a cabo por PCR cuantitativa en tiempo real, en muestras de ADN genómico obtenido a partir de leucocitos de sangre periférica. Se determinó la relación entre los Kpb de secuencias teloméricas y el número de copias del gen de copia única RPLPO (radio T/S). El análisis estadístico se llevó en SPSS v20.0 con un nivel de significación de 0,05.

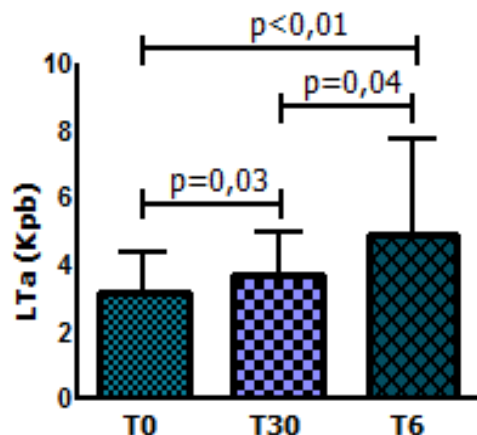


Figura 5: LTa (media + DE) a T0, T30 y T6 de la Cirugía bariátrica.
Prueba T para muestras relacionadas, diferencias significativas con valores de $p < 0,05$

Se observó una LTa media significativamente aumentada al mes de la cirugía en comparación con los niveles basales pre-quirúrgicos (T0: $3,15 \pm 1,20$ Kpb; T30: $3,68 \pm 1,28$ Kpb; T6: $4,77 \pm 2,70$ Kpb; $P=0,027$) lo cual se debe probablemente al mejoramiento del estado metabólico y la disminución del estado de inflamación (T0: $5,95 \pm 4,51$ mg/l; T30: $3,51 \pm 2,32$ mg/l; T6: $1,95 \pm 2,48$ mg/l, $P=0,01$). (Figura 5).

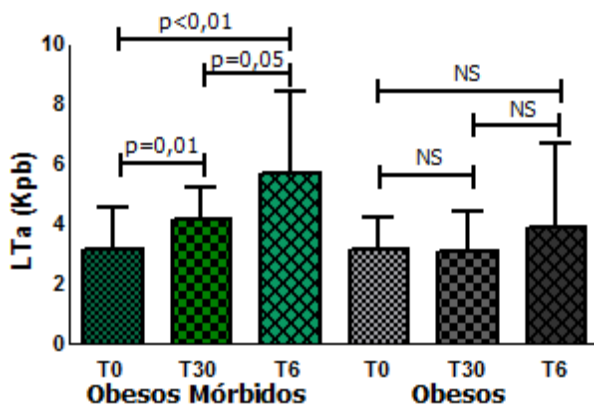


Figura 6: LTa T0, T30 y T6 de la Cirugía en pacientes obesos y obesos mórbidos.
Prueba T para muestras relacionadas, diferencias significativas con valores de $p < 0,05$

Por otro lado al subdividir a los participantes en obesos y obesos mórbidos, post-cirugía los pacientes con obesidad mórbida presentaron un aumento significativo de la LTa (T0: $3,17 \pm 1,36$ Kpb, T30: $4,17 \pm 1,06$ Kpb; T6: $5,67 \pm 2,71$ Kpb; $P=0,012$) y una disminución significativa de los niveles de inflamación (T0: $5,95 \pm 4,51$ mg/l y T30: $3,51 \pm 2,32$ mg/l; T6: $2,00 \pm 1,94$ mg/l; $P=0,026$), mientras que los pacientes obesos no presentaron cambios significativos ni en la LTa (T0: $3,13 \pm 1,06$ Kpb; T30: $3,09 \pm 1,31$ Kpb; T6: $3,86 \pm 2,84$ Kpb; $P=0,766$) ni en los niveles de inflamación (T0: $3,46 \pm 2,39$ mg/l; T30: $2,49 \pm 2,10$ mg/l; T6: $1,90 \pm 3,07$ mg/l; $P=0,329$). (Figuras 6 y 7)

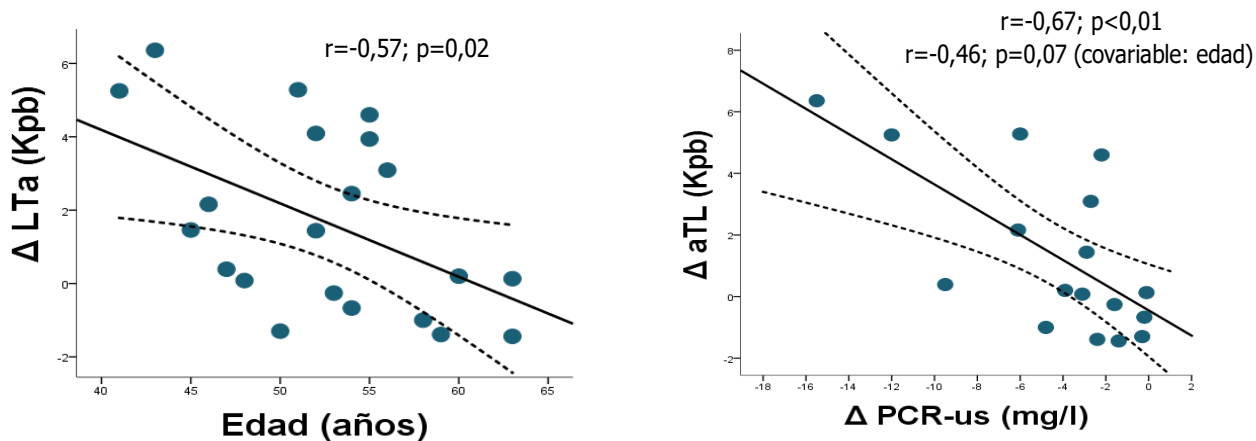


Figura 7: Correlación entre la variación de la LTa y edad (A), variación de proteína C reactiva y con edad como covariable (B). Coeficiente r de correlación de Pearson y significancia con valores de estadístico $p < 0,05$. — media --- IC95% de la media

V. Discusión y Conclusión

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio de seguimiento que evalúa la expresión de ARNm de IL-1 β y los niveles séricos en individuos con DM2 hiperglucémica y después del tratamiento de normalización glucémica.

Hemos observado una asociación del nivel de expresión de ARNm de IL-1 β con el genotipo del SNP rs16944 presente en el promotor del gen IL-1 β , una asociación positiva entre los niveles de proteína IL-1 β y GPA y una asociación negativa entre las variaciones en IL-1 β niveles de proteína y variaciones en GPA y HbA1c.

Los resultados actuales contribuyen al conocimiento de la relación entre la inflamación y los cambios en el metabolismo de la glucosa en la DM2. Las personas con DM2 constituyen un grupo heterogéneo, para el cual los objetivos del tratamiento deben ser individualizados. En este contexto, es crucial encontrar nuevos objetivos moleculares para el desarrollo de nuevos fármacos, guiando la estrategia terapéutica de forma personalizada (farmacogenética).

Por otra parte, vimos que el tratamiento quirúrgico de la obesidad mórbida ya sea a través de la manga gástrica o del BGYR, no solo redundaría en beneficios a nivel del estado metabólico, sino que también revierte el acortamiento telomérico al menos a corto plazo.

Luego de la cirugía se observó una mejora metabólica tanto a los 30 días que se mantuvo hasta los 6 meses analizados.

- Observamos un aumento en la LTa en pacientes con obesidad mórbida y en individuos más jóvenes.
- Las personas que evidenciaron los mayores descensos en la glucemia, la HbA1c y el IMC, fueron las que mostraron descensos en la expresión de estas moléculas proinflamatorias.
- Mostramos el impacto del estado de inflamación sobre la longitud de los telómeros. EL mayor aumento de la Lta se asoció a mayores descensos de los valores de PCR-us.
- El tratamiento quirúrgico de la obesidad mórbida ya sea a través de la manga gástrica o del BGYR, no solo redundaría en beneficios a nivel del estado metabólico, sino que también revierte el acortamiento telomérico al menos a corto plazo

Los individuos con DM2 y enfermedades metabólicas asociadas como la obesidad constituyen un grupo heterogéneo, por lo cual los objetivos del tratamiento deben ser individualizados. De esta manera, los resultados que surgen de estos estudios permitirán el reconocimiento de nuevos blancos moleculares para el desarrollo de nuevas drogas que evitarán los frecuentes fracasos, orientando la estrategia terapéutica en forma personalizada (Farmacogenética). Por otro lado, se favorecerá la identificación precoz de individuos con alto riesgo para estas entidades, lo cual permitirá el desarrollo de estrategias de prevención individualizadas.

VI. Bibliografía

1. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetic epidemic. *Nature* 414: 782-7, 2001.
2. Abelson P, Kennedy D. The obesity epidemic. *Science* 304: 1413, 2004
3. Schargrofsky H, Hernández-Hernández R, Champagne BM, Silva H, Vinueza R, Silva Aycaquer LC, Touboul PJ, Boissonnet CP, Escobedo J, Pellegrini F, Macchia A, Wilson E; CARMELA Study Investigators. CARMELA: assessment of cardiovascular risk in seven Latin American. *Am J Med* 121: 58-65, 2008.
4. Vilariño J, González C, Granceli H, Damiano M, Frechtel G, Costa Gil J, Ranalli C, Fox A, Tesone C, Sereyday M. Increased prevalence of type 2 diabetes and obesity in central Argentina (1997-2010): A systematic multistage population based study. Venado Tuerto 2 study (VT 2). *Revista ALAD*, 140-147, 2015.
5. Golay A, Ybarra J. Link between obesity and type 2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19: 649-63, 2005.
6. Diabetes: a 21st century challenge. Paul Z Zimmet, Dianna J Magliano, William H Herman, Jonathan E Shaw . *Lancet Diabetes Endocrinol*; 2: 56-64, 2014.
7. Gallagher EJ, LeRoith D, Karnieli E. The metabolic syndrome-from insulin resistance to obesity and diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 37: 559-79, 2008
8. Sjöholm A, Nyström T: Endothelial inflammation in insulin resistance. *The Lancet* 365:610-612, 2005.
9. Winer DA, et al. B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nat Med* 17(5):610-617, 2011
10. Weisberg S, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel R, and Ferrante W. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, vol. 112, no. 12, pp. 1796-1808, 2003.

11. Altintas M, Azad A, Nayer B et al. Mast cells, macrophages, and crown-like structures distinguish subcutaneous from visceral fat in mice," *Journal of Lipid Research*, vol. 52, 480–488, 2011.
12. Kosteli A, Sugaru E, Haemmerle G et al. Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 120, 3466–3479, 2010.
13. Inoui A. Cytokines and sickness behavior: implications from knockout animal models. *Trends Immunol*;22:469–73. 2001
14. Maedler K, Schumann DM, Sauter N, Ellingsgaard H, Bosco D, Baertschiger R, Iwakura Y, Oberholzer J, Wollheim CB, Gauthier BR, Donath MY Low concentration of interleukin-1 β induces FLICE-inhibitory protein-mediated beta cell proliferation in human pancreatic islets. *Diabetes* 55:2713–2722, 2006.
15. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Volund A, Eshes JA, Seifert B, Mandrup-Poulsen T, Donath MY Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 356:1517–1526, 2007.
16. Rhodes CJ. Type 2 diabetes: a matter of β -cell life and death? *Science*;307:380–4. 2005
17. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, et al. Sustained effects of interleukin-1 receptor antagonist treatment in type 2 diabetes. *Diabetes Care*;32: 1663–8. 2009
18. Sauter NS, Schulthess FT, Galasso R, Castellani LW, Maedler K. The anti-inflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist protects from high-fat diet-induced hyperglycemia. *Endocrinology*149:2208-2218, 2008.
19. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Eshes JA, Donath MY, Mandrup-Poulsen T. Sustained effects of interleukin-1-receptor antagonist treatment in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Care* 32:1663-1668, 2009.
20. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 27:519-50, 2009
21. M.-F. Leticia, M.-B. Luis Enrique. Impaired expression of Toll-like receptors in peripheral blood monocytes and granulocytes in type 2 diabetic subjects, *J Immunol* 178 (52): 15.2007
22. R. Patino, J. Ibarra, A. Rodriguez, M.R. Yague, E. Pintor, A. Fernandez-Cruz, et al., Circulating monocytes in patients with diabetes mellitus, arterial disease, and increased CD14 expression, *Am J Cardio* 85: 1288–1291. 2000
23. Sara E. Pinney and Rebecca A. Simmons. Epigenetic Mechanisms in the Development of Type 2 Diabetes. *Trends Endocrinol Metab.*; 21(4): 223–229. 2010 April
24. Ling C., Groop L. Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. *Diabetes* 58 :2718-2725, 2009
25. Hashimoto K, Oreffo RO, Gibson MB, Goldring MB, Roach HI. DNA demethylation at specific CpG sites in the IL1B promoter in response to inflammatory cytokines in human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 60(11):3303-13. 2009
26. Kyoko Takahashi, Yutaka Sugi, Akira Hosono, and Shuichi Kaminogawa. Epigenetic Regulation of TLR4 Gene Expression in Intestinal. Epithelial Cells for the Maintenance of Intestinal Homeostasis. *J Immunol.* 15;183(10):6522-9. Oct 21. 2009
27. Epel ES, Lin J, Wilhelm FH, Wolkowitz OM, Cawthon R, Adler NE, et al. Cell aging in relation to stress arousal and cardiovascular disease risk factors. *Psychoneuroendocrinology*;31:277-87. 2006
28. Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet*;361:393-51. 2003
29. Blackburn EH. Telomere states and cell fates. *Nature*;408:53-6. 2000
30. Armanios M. Syndromes of telomere shortening. *Annu Rev Genom Hum Genet*;10:45-61. 2009

31. Gardner JP, Li S, Srinivasan SR, Chen W, Kimura M, Lu X, et al. Rise in insulin resistance is associated with escalated telomere attrition. *Circulation*;111:2171-73. 2005
32. Satoh M, Ishikawa Y, Takahashi Y, Itoh T, Minami Y, Nakamura M. Association between oxidative DNA damage and telomere shortening in circulating endothelial progenitor cells obtained from metabolic syndrome patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*;198:347-53. 2008
33. Révész D, Milaneschi Y, Verhoeven J, Penninx B. Telomere length as a marker of cellular ageing is associated with prevalence and progression of metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*;99:1-10. 2014
34. Huzen J, Wong L, van Veldhuisen D, Samani N, Zwinderman A, Codd V, et al. Telomere length loss due to smoking and metabolic traits. *J Int Med*;275:155-63. 2014
35. Svenson U, Nordfjall K, Baird D, et al. Blood cell telomere length is a dynamic feature. *PLoS ONE*;6:e21485. 2011
36. O'Donovan A, Pantell MS, Puterman E, et al. Cumulative inflammatory load is associated with short leukocyte telomere length in the Health, Aging and Body Composition Study. *PLoS ONE*;6:e19687. 2011
37. Hatoum I, Greenawald D, Cotsapas C, Reitman M, Daly M, Kaplan L, et al. Heritability of the weight loss response to gastric bypass surgery. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, E1630–E1633, 2011.
38. Rubino F, Gagner F, Gentileschi P, Kini S, Fukuyama S, Feng J, Diamond E. The early effect of the Roux-en-Y gastric bypass on hormones involved in body weight regulation and glucose metabolism. *Ann. Surg.* 240, 236–242, 2004.
39. Thaler J, Cummings D. Hormonal and metabolic mechanisms of diabetes remission after gastrointestinal surgery. *Endocrinology* 150, 2518–2525, 2009.
40. Nestoridi E, S. Kvas, J. Kucharczyk, N. Stylopoulos, Resting energy expenditure and energetic cost of feeding are augmented after Roux-en-Y gastric bypass in obese mice. *Endocrinology* 153, 2234–2244, 2012.
41. Greenblum F, Turnbaugh P, Borenstein E. Metagenomic systems biology of the human gut microbiome reveals topological shifts associated with obesity and inflammatory bowel disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 594–599, 2012.
42. Turnbaugh P, Bäckhed F, L. Fulton, J. I. Gordon, Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* 3, 213–223 2008.
43. Vijay-Kumar M, Aitken J, Carvalho F, Cullender T, Mwangi S, Srinivasan S, Sitaraman S, Knight R, Ley R, Gewirtz A. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science* 328, 228–231, 2010.
44. Monte S, Caruana J, Ghanim H, Ling Sia C, Korzeniewski K, Schentag J, and Dandona P. Reduction in endotoxemia, oxidative and inflammatory stress, and insulin resistance after Roux-en-Y gastric bypass surgery in patients with morbid obesity and type 2 diabetes mellitus. *Surgery*, 587-593, 2012.
45. Gardner JP, Li S, Srinivasan SR, Chen W, Kimura M, Lu X, Berenson GS, Aviv A. Rise in insulin resistance is associated with escalated telomere attrition. *Circulation* 2005;111:2171-73.

VII. Anexos

1. Análisis de la longitud telomérica en pacientes obesos sometidos a cirugía bariátrica. Millán, AL; Pautasso, MC; Iglesias Molli, AE; Cerrato García, M; Rojo, M; Gutt, S; Frechtel, GD; Cerrone, G. Jornada Instituto INFIBIOC. 27 de noviembre de 2019. Lugar de Realización: Buenos Aires, Argentina

2. Cambios en la Longitud Telomérica de pacientes con Obesidad Mórbida luego de la Cirugía Bariátrica. Millán, AL; Pautasso, MC; Iglesias Molli, AE; Cerrato García, M; Rojo, M; Gutt, S; Frechtel, GD; Cerrone, GE. Congreso de la Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo. 22-24 de octubre de 2019. Lugar de Realización: Buenos Aires, Argentina

3. Estudio de la longitud telomérica en pacientes obesos y diabéticos sometidos a cirugía bariátrica. Millán, AL; Pautasso, MC; Iglesias Molli, AE; Cerrato García, M; Rojo, M; Gutt, S; Frechtel, GD; Cerrone, GE. XXI Jornada Científica Universitaria de Secretaría de Ciencia y Técnica de Fundación Barceló. 18 de Octubre del 2019. Lugar de Realización: Buenos Aires, Argentina

4. Longitud absoluta del telómero en pacientes con obesidad y diabetes sometidos a diferentes tratamientos. Millán, AL; Pautasso, MC; Iglesias Molli, AE; Rojo, M; Cerrato García, M; Gutt, S; Frechtel, GD; Cerrone, GE. XVII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Diabetes. 29 octubre-2 noviembre de 2019

5. Estudio de la longitud telomérica en pacientes obesos sometidos a cirugía bariátrica. Millán, AL; Pautasso, MC; Iglesias Molli, AE; Cerrato García, M; Rojo, M; Gutt, S; Frechtel, GD; Cerrone, GE. 73 Congreso de la Asociación Bioquímica Argentina. Agosto de 2019. Lugar de Realización: Buenos Aires, Argentina

6. Evaluation of telomere length in women with Polycystic Ovary Syndrome and its association to metabolic syndrome, obesity and hyperandrogenism. Millán, Andrea Liliana; Velazquez, Mariela Edith; Mailén, Rojo; Abruzzese, Giselle Adriana; Cocucci, Silvina; Iglesias Molli, Andrea Elena; Frechtel, Gustavo Daniel; Motta, Alicia Beatriz; Cerrone, Gloria Edith. II Simposio Internacional de Medicina Traslacional, Universidad Nacional de Cuyo. 7 al 8 de marzo de 2019.

Trabajo publicado:

Relationship between the IL-1 β serum concentration, mRNA levels and rs16944 genotype in the hyperglycemic normalization of T2D patients. Iglesias Molli AE, Bergonzi MF, Spalvieri MP, Linari MA, Frechtel GD, Cerrone GE. Sci Rep. 2020 Jun 19;10(1):9985. doi: 10.1038/s41598-020-66751-x.