



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

**EFFECTO DE LA HIPERGLUCEMIA CRÓNICA SOBRE LA ACTIVACIÓN CLÁSICA Y  
ALTERNATIVA DE MACRÓFAGOS HUMANOS *IN VITRO***

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**ISRAEL TORRES CASTRO**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:  
**DR. EUSTACIO GALILEO ESCOBEDO GONZÁLEZ**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR:  
**DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VÁLDES**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES DE IZTACALA, UNAM  
**DRA. CLAUDIA VERÓNICA ZAGA CLAVELLINA**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D.F. JUNIO, 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

**EFFECTO DE LA HIPERGLUCEMIA CRÓNICA SOBRE LA ACTIVACIÓN CLÁSICA Y  
ALTERNATIVA DE MACRÓFAGOS HUMANOS *IN VITRO***

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**ISRAEL TORRES CASTRO**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:  
DR. EUSTACIO GALILEO ESCOBEDO GONZÁLEZ  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR:  
DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VÁLDES  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES DE IZTACALA, UNAM  
DRA. CLAUDIA VERÓNICA ZAGA CLAVELLINA  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D.F. JUNIO, 2014

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 26 de mayo de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **TORRES CASTRO ISRAEL** con número de cuenta **407043934**, con la tesis titulada **"EFECTO DE LA HIPERGLUCEMIA CRÓNICA SOBRE LA ACTIVACIÓN CLÁSICA Y ALTERNATIVA DE MACRÓFAGOS HUMANOS *IN VITRO*"**, realizada bajo la dirección del **DR. EUSTACIO GALILEO ESCOBEDO GONZÁLEZ**:

Presidente: DRA. GLORIA EUGENIA QUEIPO GARCÍA  
Vocal: DR. ARTURO ZÁRATE TREVIÑO  
Secretario: DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS  
Suplente: DR. JOSÉ MANUEL FRAGOSO LONA  
Suplente: DRA. CLAUDIA VERÓNICA ZAGA CLAVELLINA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 16 de junio de 2014

*M. del Coro Arizmendi*

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme formarme como Maestro en Ciencias, así como también quiero agradecer la Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo recibido mediante el otorgamiento de la beca número 332937. Además, quiero agradecer enormemente a los miembros de mi comité tutor la Dra. Claudia Verónica Zaga Clavellina, el Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés y el Dr. Galileo Escobedo González, ya que sin su ayuda y guía a lo largo de esta etapa de formación académica no me hubiese sido posible culminar con esta meta.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

Quiero a mi familia que me apoyó en todo momento y que siempre me alienta a seguir adelante. En especial a mi madre Juana Luisa Castro Guillen, por ser un ejemplo de vida e incansable lucha, así como a mi hermana Mirna Torres por las invaluable lecciones de vida que me ha brindado.

A mis compañeros y amigos Lenin Mejía, Úrsula Arroyo, Luz Marina Porras, Itzel Azuceno y Blair Brown que siempre que me veían cansado o decaído encontraban la mejor manera de sacarme una sonrisa.

A todos mis compañeros del laboratorio de hígado, páncreas y motilidad de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM y el Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga". Incluyendo a mi amigo y colega Jaime Zamora.

A mi jefe Galileo Escobedo al que no me canso de agradecerle que no solo sea mi maestro del cual he aprendido sobre ciencia y de la vida, sino que además me haya brindado su amistad.

A mis compañeros y colegas César Noé Cortés y Mariana Díaz que me han servido de ejemplo, aunque ellos no lo crean así.

A mi amigo Jesús Caballero que más que amigo considero como mi hermano, por su apoyo y amistad que tanto valoro.

A mi familia política que siento el termino política está de más Rosa María Duran, Rogelio, Araceli, Aurora, Rodrigo, Karina, Samanta, Ricardo Daniel, Dulce, Rebeca, Dana y Ricardo Ruíz. Pero sobretodo quiero agradecer al amor de mi vida Roberto Ruíz por apoyarme en muchos de los momentos más difíciles de mi vida, sin ti mi vida no tendría sentido, Te amo.

# ÍNDICE

<b>Lista de Abreviaturas .....</b>	<b>1</b>
<b>I. RESUMEN .....</b>	<b>3</b>
<b>II. ABSTRACT.....</b>	<b>5</b>
<b>III. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1 La diabetes Mellitus tipo 2 como problema de salud pública global .....</b>	<b>7</b>
3.1.1 Fisiopatología de la DM2 .....	10
<b>3.2 La diversidad fenotípica de los macrófagos y su participación en procesos inflamatorios.....</b>	<b>12</b>
<b>3.3 Los macrófagos como agentes promotores de la inflamación asociada con la DM .....</b>	<b>17</b>
3.3.1 Alteraciones del metabolismo C20:4 en los macrófagos durante la DM ....	18
3.3.2 Alteraciones fenotípicas y funcionales de los macrófagos durante la DM .	20
<b>3.4 La hiperglucemia como factor promotor de la respuesta inflamatoria asociada con la DM.....</b>	<b>21</b>
3.4.1 Vía inflamatoria mediada por la formación de AGE .....	22
3.4.2 Vía inflamatoria mediada por el poliol y el incremento del flujo metabólico	26
<b>IV. ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>28</b>
<b>V. HIPÓTESIS .....</b>	<b>31</b>
<b>VI. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>32</b>
<b>VII. OBJETIVOS PARTICULARES .....</b>	<b>32</b>
<b>VIII. METODOLOGÍA .....</b>	<b>33</b>
<b>8.1 Obtención de las muestras biológicas.....</b>	<b>33</b>
8.1.1 Criterios de inclusión.....	33
8.1.2 Criterios de exclusión.....	34
8.1.3 Criterios de eliminación.....	34
<b>8.2 Purificación de monocitos/macrófagos .....</b>	<b>35</b>
<b>8.3 Cultivo y diferenciación de monocitos a macrófagos .....</b>	<b>35</b>
<b>8.4 Comparación morfológica de monocitos y macrófagos derivados de monocitos .....</b>	<b>36</b>
<b>8.5 Condiciones de estímulo de MDM .....</b>	<b>36</b>
<b>8.6 Expresión de marcadores fenotípicos .....</b>	<b>37</b>

8.7 Evaluación de la producción de citocinas por ELISA.....	38
8.8 Evaluación de la actividad transcripcional por RT-PCR.....	39
8.9 Análisis estadístico.....	41
<b>IX. RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
9.1 Características antropométricas y bioquímicas de los donadores incluidos en el estudio .....	43
9.2 Eficiencia de la purificación .....	44
9.3 Cambios morfológicos e inmunofenotípicos en la diferenciación .....	45
9.4 Marcadores inmunofenotípicos .....	48
9.5 Producción de citocinas.....	52
9.6 Perfil de expresión génica.....	53
<b>X. DISCUSIÓN .....</b>	<b>55</b>
<b>XI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>61</b>
<b>XII. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>62</b>
<b>XIII. REFERENCIAS .....</b>	<b>63</b>

## Lista de Abreviaturas

- ADR.** Aldosa Reductasa. Enzima citosólica que cataliza la reducción de las hexosas, como la glucosa, a sorbitol.
- AGE.** Advanced Glycation End-product (siglas en inglés). Productos terminales de glicación avanzada.
- CD11c.** Cluster of differentiation 11c (siglas en inglés), Integrina implicada en la adhesión celular por medio de su unión con CD18.
- CD14.** Cluster of differentiation 14 (siglas en inglés), Coreceptor de TLR4 que participa en el reconocimiento de LPS.
- CD206.** Cluster of differentiation 206 (siglas en inglés). Receptor de manosa.
- CD45.** Cluster of differentiation 45 (siglas en inglés). Tirosin fosfatasa de membrana, presente en todos los leucocitos con diferentes isoformas producidas por splicing alternativo.
- CP.** Control of pressure (siglas ingles). Control de presión, condición experimental de presión osmótica similar a la condición HG, establecida con las concentraciones 5.5 mM de D-glucosa y 9.5 mM de D-manitol.
- DM.** Diabetes Mellitus. Trastornos metabólicos caracterizados por las altas concentraciones de glucosa en sangre.
- ELISA.** Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (siglas en inglés). Inmunoensayo enzimático ó Inmunoensayo ligado a enzimas, técnica utilizada para la detección y cuantificación de ligandos, por medio de anticuerpos.
- FSC.** Forward Scatter (siglas en inglés). Dispersión frontal, hace referencia a la dispersión de la luz frontal determinada por el tamaño de un objeto (célula) que pasa frente a un haz de luz (laser del citómetro).
- HG.** High Glucose (siglas en inglés). Alta concentración de glucosa, condición experimental *in vitro* establecida con la concentración 15 mM de D-glucosa.
- HOMA-IR.** Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance (siglas en inglés). Modelo homeostático de evaluación de la resistencia a la insulina, índice de utilidad clínica que evalúa la incidencia de resistencia a la insulina.
- IL-1 $\beta$ .** Inter 1 beta. Citocina con actividad pro-inflamatoria implicada en la proliferación y diferenciación celular durante la respuesta inflamatoria, induce la producción de ciclo-oxigenasa 2 a nivel de sistema nervioso central.
- IL-6.** Interleucina 6. Citocina con capacidad quimioatrayente de linfocitos CD4<sup>+</sup>.
- IL-10.** Interleucina 10. Citocina con actividad anti-inflamatoria que regula negativamente la activación de respuestas Th1 y la activación pro-inflamatoria de macrófagos.
- IL-12.** Interleucina 12. Citocina que favorece la activación de respuestas Th1 e induce la producción de INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ .
- IMF.** Intensidad Media de Fluorescencia. Índice determinado por la cantidad de anticuerpos acoplados a fluorocromos que se unen a las células y caracteriza la cantidad de antígeno presente en ésta.
- INF- $\gamma$ .** Interferon gamma. Citocina de grupo de interferones tipo II, importante activador de macrófagos y se incrementa en infecciones virales.
- LDL.** Low-Density Lipoprotein (siglas en inglés). Lipoproteína de baja densidad.

- LPS.** Lipopolisacárido. Componente de la membrana externa de bacterias Gram negativas que potencia la respuesta inflamatoria de células del sistema inmune.
- M1.** Macrófago con actividad pro-inflamatoria.
- M2.-** Macrófago con actividad anti-inflamatoria.
- M-CSF.** Macrophage Colony Stimulation Factor (siglas en inglés). Factor estimulador de la colonia de macrófagos.
- MDM.** Monocyte-Derived Macrophages (siglas en inglés). Macrófagos derivados de monocitos.
- NF $\kappa$ B.** Nuclear Factor kappa B (siglas en inglés). Factor nuclear kappa B.
- NG.** Normal Glucose (siglas en inglés). Concentración fisiológica de glucosa, condición experimental *in vitro* establecida con la concentración 5.5 mM de D-glucosa.
- PCR.** Reacción en Cadena de la Polimerasa.
- RAGE.** Receptor for Advanced Glycation End-product (siglas en inglés). Receptor para productos terminales de glicación avanzada
- RNA.** Ribonucleic Acid (siglas en inglés). Ácido ribonucleico.
- ROS.** Reactive Oxygen Species (siglas en inglés). Especies reactivas de oxígeno.
- SDH.** Sorbitol Deshidrogenasa. Enzima de la vía del poliol que utiliza como sustrato al sorbitol y que lo convierte a fructosa.
- SSC.** Side Scatter (siglas en inglés). Dispersión lateral, hace referencia a la dispersión de la luz lateral (90°) determinada por la complejidad o granularidad de un objeto (célula) que pasa frente a un haz de luz (laser del citómetro).
- TLR4.** Toll-Like Receptor 4 (siglas en inglés). Receptor de membrana característico del LPS.
- TNF- $\alpha$ .** Tumor Necrosis Factor alfa (siglas en inglés). Factor de necrosis tumoral, citocina pro-inflamatoria con funciones autocrinas y paracrinas que inducen la producción de citocinas pro-inflamatorias.

## I. RESUMEN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica no transmisible caracterizada por la presencia del estado de hiperglucemia crónica. En el paciente diabético, las concentraciones altas de glucosa en sangre afectan al tejido nervioso y vascular, lo cual se traduce en complicaciones como la insuficiencia renal crónica, los accidentes cerebrovasculares y el infarto al miocardio, mismas que constituyen las primeras causas de muerte en nuestro país desde el año 2005. El mecanismo sugerido a través del cual la hiperglucemia induce daño en los tejidos antes mencionados implica la formación de productos terminales de glicación avanzada (AGE, por sus siglas en Inglés), los cuales al ser reconocidos por su receptor en células endoteliales y nerviosas, inician una cascada inflamatoria mediada por la liberación local de radicales libres y el reclutamiento de macrófagos. En esta línea de pensamiento, el papel del macrófago en el daño a nervios y vasos sanguíneos observado durante la hiperglucemia ha sido descrito en términos de su capacidad de infiltrar el tejido y reclutar nuevas células inflamatorias al sitio de la lesión. Sin embargo, todavía no se ha explorado si las altas concentraciones de glucosa poseen *per se* efecto directo sobre el fenotipo de activación del macrófago, polarizándolo hacia el fenotipo pro-inflamatorio o restringiendo la capacidad inmunoreguladora de esta célula. Por esta razón, el objetivo de este proyecto fue establecer el efecto que poseen las altas concentraciones de glucosa sobre el perfil de activación de macrófagos humanos *in vitro*. Previa firma de la carta de consentimiento informado, se obtuvieron monocitos humanos a partir de extractos leucocitarios de donadores de sangre, sanos, sin evidencia clínica de infecciones, desordenes autoinmunes,

neoplasias, y otros padecimientos crónicos no transmisibles, y sin ningún tratamiento inmunomodulador durante el mes previo a la donación. Los monocitos fueron diferenciados a macrófagos en presencia de factor estimulante de la colonia de macrófagos e interleucina (IL) 3 *in vitro*. Después de seis días de diferenciación, los macrófagos fueron cultivados en presencia de concentraciones normales (5.5 mM) y elevadas (15 mM) de glucosa durante tres días. Como control de presión osmótica, un grupo de macrófagos fue cultivado en presencia de 5.5 mM de glucosa y 9.5 mM de manitol. Comparado con las condiciones control, los macrófagos expuestos a concentraciones elevadas de glucosa mostraron aumento en la síntesis de la integrina CD11c, la producción disminuida de IL-10 y mayor expresión del receptor tipo Toll 4 y el factor nuclear kappa B, así como de las enzimas aldosa reductasa y sorbitol deshidrogenasa. Estos resultados muestran que las altas concentraciones de glucosa son capaces de restringir la capacidad anti-inflamatoria de macrófagos humanos *in vitro*, posiblemente a través de la polarización de esta célula hacia el perfil pro-inflamatorio. Este hallazgo sugiere un mecanismo fisiopatológico adicional a través del cual el macrófago podría participar en el daño tisular observado durante la hiperglucemia.

## II. ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a non-communicable chronic disease characterized by a chronic hyperglycemia condition. In diabetic patients, nervous and vascular tissues are affected by high blood glucose levels, which promotes complications such as chronic renal failure, cerebrovascular accident and myocardial infarction that are considered the leading causes of death in our country since 2005. Formation of advanced glycation end-products is a mechanism suggested to induce the tissue damage due to hyperglycemia. Those products are recognized by their receptor on endothelial and nerve cells, initiating an inflammatory signal mediated by local release of free radicals and macrophages recruitment. In addition to this, the role of macrophage in nerve and blood vessels damage during hyperglycemia has been described in terms of its ability to infiltrate and recruit other inflammatory cells to lesion focus. However, it has not been explored whether high glucose levels has *per se* a direct effect on the phenotype of macrophages activation, which might polarize them to pro-inflammatory phenotypes or restricting their immunoregulatory capability. Therefore, the aim of this research was to establish the direct effect of high glucose levels on the activation of human macrophages, *in vitro*. Human monocytes were obtained from buffy coat bags of healthy blood donors (without infections, autoimmune disorders, malignancies, other non-communicable chronic diseases and immunomodulatory treatment). Monocytes were differentiated into macrophages with macrophage colony-stimulating factor and interleukin (IL) 3 *in vitro*. After 6-days differentiation, macrophages were cultured with normal (5.5 mM) and high (15 mM) glucose conditions, while a control of pressure was performed cultivating

macrophages in 5.5 and 9.5 mM of glucose and mannitol, respectively. Macrophages exposed to elevated glucose concentrations showed increased synthesis of the integrin CD11c, decreased production of IL-10 and increased expression of TLR4, nuclear factor kappa B, aldose reductase and sorbitol dehydrogenase, comparing with macrophages cultured in normal in glucose concentrations. These results have shown that high glucose levels are able to restrict anti-inflammatory activity of human macrophages *in vitro*, possibly through cell polarization toward a pro-inflammatory profile. This finding suggests an additional pathophysiological mechanism through which macrophages could participate in tissue observed damage during hyperglycemia.

### **III. INTRODUCCIÓN**

La diabetes mellitus (DM) es el conjunto de desórdenes metabólicos que constituye uno de los mayores problemas de salud pública, tanto en países industrializados como en países con economías en desarrollo (Organización Mundial de la Salud, 2000). La DM se asocia con la deficiencia relativa o absoluta en la secreción de insulina, o bien con la resistencia al efecto de esta hormona en tejidos como el hepático, muscular y adipocitario (Organización Mundial de la Salud, 2000). El resultado de esta alteración en la función de la insulina es la presencia del estado crónico de hiperglucemia, mismo que afecta el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas en todo el organismo (Maritim et al., 2003).

La organización mundial de la salud (OMS) reconoce tres tipos de DM: la DM tipo 1, tradicionalmente denominada insulino-dependiente, la DM tipo 2 o no insulino-dependiente y la DM gestacional (OMS, 2012). La DM2 constituye al menos el 90% de los casos de DM y por lo tanto representa la forma predominante de estos trastornos metabólicos (Jonnalagadda et al., 2014; González et al., 2009). Hasta ahora, diversos tipos de tratamientos se utilizan en el tratamiento de la DM basados en diferentes tipos de acción farmacológica, no obstante estas drogas no son capaces de mitigar el progreso de la enfermedad (Jonnalagadda et al., 2014).

#### **3.1 La diabetes Mellitus tipo 2 como problema de salud pública global**

En el año 2010, diversos estudios mostraron que la DM2 afectaba a más de 220 millones de personas alrededor del mundo, con tasa de mortalidad del 1.8%, cifra que representaba entonces el 6.8% del total de muertes en el orbe (Roglic et al.,

2010). Sin embargo, las últimas estimaciones de la *International Diabetes Federation* (IDF, por sus siglas en inglés) consideran la prevalencia global de DM2 del 8.4% en la población adulta. En otras palabras, actualmente existen más de 382 millones de personas alrededor del mundo que padecen esta grave enfermedad (IDF, 2013; Brunetti et al., 2014). Entre los aspectos determinantes de este rápido incremento en la prevalencia de DM2 se encuentran la combinación de factores genéticos y ambientales responsables tanto de la acumulación de grasa visceral y del aumento del peso corporal, como de la reducción del gasto energético derivado de la disminución de la actividad física y el estilo de vida sedentario (Brunetti et al., 2014). Más alarmante aún resultan las estimaciones que indican que el número de pacientes con DM2 se duplicará en los próximos 30 años y en consecuencia esto aumentará significativamente el número de pacientes con complicaciones vasculares asociadas con la DM2 (Chaturvedi N., 2007).

A pesar de los numerosos esfuerzos en el manejo clínico de la DM2, muchos pacientes diabéticos desarrollan gran variedad de complicaciones vasculares a largo plazo, incluyendo retinopatía diabética, nefropatía diabética y enfermedades cardiovasculares, que se encuentran entre las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad en personas que padecen esta enfermedad (Krowleski et al., 1996). Dentro de las principales complicaciones asociadas con la alta mortalidad de la DM2 se encuentran la microangiopatía (complicaciones microvasculares) y la macroangiopatía diabética (complicaciones macrovasculares). Las complicaciones microvasculares derivan en alteraciones como la retinopatía, nefropatía y neuropatía, mientras que las complicaciones macrovasculares incluyen las coronarias, cerebrales y periféricas (Jonnalagada et al., 2014). La microangiopatía diabética

causa discapacidad y pérdida de la calidad de vida de los pacientes con DM2, mientras que la macroangiopatía diabética es la causa de muerte en el 80% de estos sujetos (Fernández-Miró et al., 2012). De manera general, estas complicaciones afectan a los nervios y a los vasos sanguíneos a largo plazo, lo cual se traduce en patologías tales como la insuficiencia renal crónica, los eventos cerebrovasculares y el infarto al miocardio, mismas que constituyen las primeras causas de muerte en México desde el año 2005 (Programa Nacional de Salud 2007-2012, 2007).

La DM2 es una enfermedad multifactorial y compleja en la cual interactúan tanto factores genéticos como ambientales (Stumvoll et al., 2008; Unger RH., 2008). Esto es reconocido por múltiples evidencias como la fuerte asociación familiar en la predisposición al desarrollo de la enfermedad. Diversos estudios estiman que el riesgo de desarrollar DM2 es de 40% en individuos con un progenitor diabético (el riesgo es más alto si la madre padece la enfermedad) y de 70% si ambos padres son diabéticos (Groop et al., 1996). El riesgo aumentado en parientes de primer grado, comparado con el de la población general, persiste incluso después del distanciamiento de la familia biológica, como resultado de la adopción. Además, en gemelos homocigóticos, el índice de concordancia para la enfermedad llega a ser cercano al 100%, mucho más alto que lo observado en gemelos heterocigóticos o entre hermanos nacidos de partos distintos (Weijnen et al., 2002). La predisposición genética de la DM2 se sustenta además por la observación de que existen diferencias en los índices de prevalencia de la enfermedad de manera población-específica, incluso después de grandes eventos de migración de grupos completos hacia otros países (Flegal et al., 1991).

Por otro lado, el rol de factores ambientales capaces de influir en la susceptibilidad a la DM2 ha sido descrito de manera exhaustiva. Entre estos factores están el incremento de la ingesta calórica y el estilo de vida sedentario, responsables de la mayoría de los casos de sobrepeso y obesidad en adultos (Neel JV., 1962). La diseminación del estilo de vida occidental en países en vías desarrollo se asocia también con la explosión epidémica de la DM2 (Wild et al., 2004; Danaei et al., 2011). Lo anterior se sustenta en el hecho de que la distribución espacial y temporal de la DM2 es comparable con la tendencia que presentan el sobrepeso y la obesidad en los países antes mencionados (Hossain et al., 2007). El sobrepeso y la obesidad se asocian con el estado de resistencia a la insulina, el cual representa el paso inicial en la historia natural de la DM2 como veremos a continuación.

### **3.1.1 Fisiopatología de la DM2**

Como se mencionó anteriormente, la alta mortalidad de la DM2 se asocia con el desarrollo de complicaciones micro y macrovasculares. A su vez, la generación de estas complicaciones se debe al estado hiperglucémico que se presenta en el paciente diabético (Chaturvedi N., 2007; Bassi et al., 2012). La hiperglucemia se define como la elevación anormal en los niveles sanguíneos de glucosa (glucosa mayor de 100 mg/dL) (Levetan et al., 1998; Umpierrez et al., 2002). Esta condición puede ser de tipo transitoria o de tipo crónica (Greci et al., 2003; Ishira et al., 2006; Dungan et al., 2009; Lemkes et al., 2010). Estudios recientes han demostrado que la hiperglucemia transitoria puede presentarse como consecuencia del deterioro metabólico durante cuadros patológicos severos tales como el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (Dungan et al., 2009). Es importante mencionar que

la hiperglucemia transitoria revierte a estados normoglucémicos en el 40% de los individuos que la presentan (Greci et al., 2003; Ishira et al., 2006). Por el contrario, la hiperglucemia crónica se presenta únicamente en el contexto de la diabetes, en donde los niveles de glucosa sanguínea se mantienen permanentemente elevados, condición que es frecuentemente acompañada por hiperinsulinemia, dislipidemia, hipertensión y obesidad central (Lemkes et al., 2010).

Desde el punto de vista fisiopatológico, la hiperglucemia que se observa durante la DM2 se caracteriza por la combinación entre la resistencia periférica a la insulina y, en estados más avanzados de la enfermedad, la secreción anómala de insulina por las células  $\beta$  pancreáticas (Staiger et al., 2009; Lyssenko et al., 2008). De manera interesante, las altas concentraciones de glucosa en la sangre se han asociado con la mayor expresión de citocinas pro-inflamatorias en el tejido adiposo visceral (Hotamisligil GS., 2006). Este fenómeno a su vez se ha descrito que promueve el estrés oxidativo y el estrés del retículo endoplasmático en el páncreas. La conjunción de todos estos factores contribuye al agotamiento y muerte de las células  $\beta$  pancreáticas, lo cual redundando en el mantenimiento de las altas concentraciones de glucosa sanguínea en el paciente con DM2 (Montane et al., 2014).

El estado inflamatorio resultante del estrés oxidativo inducido por la hiperglucemia es un componente primordial de la DM2. (Wellen y Hotamisligil, 2005). La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) tiene un rol importante en distintos procesos celulares, incluyendo la diferenciación, el metabolismo, la autofagia y la inflamación (Sena y Chandel, 2012). Las altas

concentraciones de ROS activan distintas cascadas de señalización, derivando en la transcripción de genes dependientes de la vía del factor nuclear kappa B (NF $\kappa$ B, por sus siglas en inglés), como son la proteína quimiotáctica de macrófagos 1 (MCP-1, por sus siglas en inglés), moléculas de adhesión celular, el óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés), el factor de crecimiento transformante-beta (TGF- $\beta$ , por sus siglas en inglés), el factor de crecimiento de tejido conectivo, así como diversas interleucinas (IL) (Hung et al. 2004; Wellen y Hotamisligil, 2005; Chambers et al., 2008). La producción de ROS en el páncreas también induce el incremento en la producción de citocinas pro-inflamatorias que afectan a las células  $\beta$  pancreáticas de forma paracrina (Lin et al., 2005). Como consecuencia podemos ver que la hiperglucemia posee un vínculo directo con la generación del estado inflamatorio, en donde diversas células del sistema inmune innato parecen poseer un papel clave en el desarrollo de las complicaciones vasculares asociadas con la DM, como es el caso de los macrófagos (Montane et al., 2014).

### **3.2 La diversidad fenotípica de los macrófagos y su participación en procesos inflamatorios**

La diferenciación hacia macrófagos ocurre después de que los monocitos (derivados de células pluripotenciales de médula ósea) atraviesan la pared arterial y cambian de células esféricas que circulan libres en la sangre a células adherentes de forma irregular que captan antígenos y migran al interior de prácticamente todos los tejidos del organismo (Gleissner CA., 2012a). La diferenciación hacia macrófagos incluye cambios importantes en el perfil de expresión génica, lo cual se demostró con

análisis del transcriptoma de monocitos diferenciados a macrófagos inducido por el factor estimulante de la colonia de macrófagos (M-CSF, por sus siglas en inglés) (Martínez et al., 2006). En condiciones *in vitro*, la mayoría de los cambios ocurren en los primeros tres días, cuando el proceso de diferenciación todavía no ha sido completado y algunos de los genes involucrados disminuyen su expresión a niveles basales posteriormente (Martínez et al., 2006). El inductor de diferenciación de monocito a macrófago mejor estudiado es el M-CSF (Stanley et al., 1978). El M-CSF evita la apoptosis de los monocitos e induce la diferenciación hacia macrófagos, lo que se evidencia por la disminución de la expresión del co-receptor de TLR4, el *Cluster of Differentiation* (CD) 14 y el aumento de la expresión de CD68 (Martínez et al., 2006). La participación del M-CSF en la aterogénesis y aterosclerosis se demostró en ratones que no expresaban el gen *CSF1* que codifica para la expresión del receptor de M-CSF (Yoshida et al., 1990; de Villiers et al., 1998). El bloqueo de la expresión de M-CSF resulta en la menor propensión a la aterogénesis, en ratones deficientes de la expresión de la apolipoproteína E (Yoshida et al., 1990).

Por otro lado, la diferenciación de monocitos a macrófagos inducida por M-CSF se ha estudiado ampliamente a nivel transcripcional y funcional (Martínez et al., 2006; Cho et al., 2007). El M-CSF se encuentra en circulación continuamente y de esta manera ayuda al mantenimiento de la sobrevivencia de los monocitos circulantes, así como a la diferenciación de monocitos a macrófagos (Tushinski et al., 1982; Hanamura et al., 1988). Esta es la principal diferencia que distingue al M-CSF de otros factores de crecimiento que han sido asociados con la diferenciación del macrófago, entre los que se encuentran el factor estimulante de la colonia de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés) o la quimiocina

plaquetaria CXCL4. Otros estudios han comparado el transcriptoma de macrófagos diferenciados con M-CSF y GM-CSF (Waldo et al., 2008), encontrando que el M-CSF induce la diferenciación de macrófagos con el fenotipo CD68<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>, mientras que el GM-CSF estimula el fenotipo CD68<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup> que presenta menor tendencia a acumular colesterol *in vitro*. En lesiones ateroscleróticas en humanos, ambos fenotipos de macrófagos se han asociado con la acumulación de lípidos y formación de células espumosas *in vivo*. Cuando se observa el fenotipo de los macrófagos diferenciados con GM-CSF, existe parecido al de los macrófagos M1. En contraste, cuando los monocitos se exponen al M-CSF se observa el fenotipo de diferenciación semejante al de los macrófagos M2 (Stoger et al., 2010). La polarización de macrófagos hacia los fenotipos M1 y M2 obedece al número importante de eventos moleculares que determinan la función de la célula y su papel en la inducción de respuestas inflamatorias o el control de las mismas a través de la producción de factores anti-inflamatorios y de reparación de tejidos, como veremos a continuación.

La polarización del macrófago es un término distinto al de diferenciación, y se refiere a la capacidad de un macrófago plenamente diferenciado de responder a estímulos externos mediante el cambio de sus características fenotípicas y funcionales (Gleissner CA., 2012a). Gordo y colaboradores describieron por primera vez la polarización alternativa de macrófagos inducida por IL-4 (Stein et al., 1992). Ellos identificaron la expresión del receptor de manosa como elemento característico de estos macrófagos, a los que denominaron como “macrófagos M2” (como oposición a los clásicamente polarizados macrófagos inducidos por lipopolisacárido (LPS) o interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ), que son denominados como “macrófagos M1”). Desde entonces el paradigma de la polarización se extendió a M1 *versus* M2a-c (tres

sub-clasificaciones de macrófagos M2) (Gordon y Taylor, 2005; Martinez et al., 2008; Mantovani et al., 2009). De manera breve, los macrófagos M1 pueden ser inducidos por LPS e IFN- $\gamma$  (resultante de alguna infección bacteriana o respuesta tipo Th1 emulada por linfocitos T CD4<sup>+</sup>), y se les considera pro-inflamatorios debido a que producen IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, o factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ , por sus siglas en inglés). Los macrófagos M2 pueden ser inducidos por IL-4 (M2a), en respuesta a inmunocomplejos (M2b) o por la acción de IL-13/IL-10 (M2c), y se les considera como anti-inflamatorios debido a que expresan IL-10, CD36 y/o el receptor de manosa (CD206) (Gleissner CA., 2012a). La polarización de macrófagos asociados a lesiones ateromatosas es inducida por la hemoglobina (Boyle et al., 2011). Los macrófagos polarizados por la hemoglobina tienen funciones atero-protectoras, caracterizadas por la expresión de IL-10, altos niveles de expresión del receptor de hemoglobina CD163 y baja expresión de HLA-DR (Boyle et al., 2011). Estudios subsecuentes demostraron que la inducción de estos macrófagos es mediada por el factor de transcripción Nrf2 y la expresión incrementada de la enzima hemo-oxigenasa 1 (Boyle et al., 2011). Los macrófagos asociados a lesiones ateromatosas presentan un fenotipo muy similar a los macrófagos M2c inducidos por IL-10, lo cual es concordante con el hecho de que la sobre expresión de IL-10 inducida por la hemoglobina puede tener efectos autócrinos y parácrinos que deriven en la polarización parecida a la de macrófagos M2c con propiedades anti-inflamatorias (Gleissner CA., 2012a). La heterogeneidad fenotípica y funcional de los macrófagos sigue siendo estudiada. De hecho, en fechas recientes Gleissner y colaboradores han propuesto la caracterización de un nuevo tipo de macrófago que ellos

denominan como M4, inducido por el estímulo con la quimiocina de plaquetas CXCL4 (Gleissner et al., 2010; Gleissner CA., 2012b). Es importante mencionar que tanto la diferenciación como la polarización pueden resultar en fenotipos disimilares, por ejemplo: GM-CSF induce el fenotipo de macrófagos parecidos a M1 (Stoger et al., 2010), mientras que M-CSF induce el fenotipo de macrófagos parecidos a M2 (Martínez et al., 2006). La principal distinción entre los procesos de diferenciación y polarización radica en que mientras la polarización puede ser reversible, la diferenciación parece ser un proceso irreversible (Porcheray et al., 2005).

La aterosclerosis es uno de los procesos patogénicos más frecuentes asociados con la hiperglucemia crónica que se observa en la DM2. Durante el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas, los monocitos de sangre periférica se adhieren al endotelio, migran hacia el espacio sub-endotelial, se diferencian a macrófagos y entonces a células espumosas (Galkina y Ley, 2009; Moore y Tabas, 2011). Este proceso de diferenciación es dirigido por varios factores como el contacto célula-célula, diversos componentes de la matriz extracelular, citocinas pro- y anti-inflamatorias, así como por lipoproteínas, de entre las cuales sobresale la lipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL, por sus siglas en inglés) (Moore y Tabas, 2011). No obstante, los macrófagos que se encuentran dentro de la placa aterosclerótica no representan una población homogénea, sino que consisten en diversos subpoblaciones que presentan distintas características fenotípicas y funcionales. El primer reporte sobre la presencia de macrófagos M1 y M2 en placas ateroscleróticas se publicó en 2007 por Bouhrel y colaboradores en el 2007, quienes demostraron la expresión de genes tanto M1 como M2 en la placa aterosclerótica de humanos. De manera específica, ellos encontraron la expresión simultánea del

receptor de manosa (marcador fenotípico M2) y de la quimiocina MCP-1 (citocina de tipo M1) en la placa aterosclerótica.

### **3.3 Los macrófagos como agentes promotores de la inflamación asociada con la DM**

El estado hiperglucémico asociado con la DM induce el incremento del fenotipo pro-inflamatorio en monocitos y macrófagos, tanto en humanos como en modelos murinos (Devaraj et al. 2000 y 2006; Padmos et al., 2008; Bradshaw et al., 2009; Kanter et al., 2012a; Jialal y Kaur, 2012). Lo anterior parece ser debido en parte al incremento de la expresión de los receptores tipo toll (TLR, por sus siglas en inglés), en particular de TLR2 y TLR4 (Jialal y Kaur, 2012). Los TLRs son receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos que inducen la activación de cascadas celulares inflamatorias (Kanter et al., 2012a). En los macrófagos la mayor producción de citocinas pro-inflamatorias se asocia con el aumento en la producción de mediadores lipídicos derivados del ácido araquidónico (C20:4). La vía del C20:4 genera gran número de eicosanoides, incluyendo prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos y otros productos. Algunos de estos lípidos ejercen efectos pro-inflamatorios mientras que otros son anti-inflamatorios o están involucrados en la resolución de la inflamación (Ricciotti y FitzGerald, 2011).

En condiciones basales, los macrófagos producen varios eicosanoides como prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) y D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>), el tromboxano B<sub>2</sub> (TxB<sub>2</sub>) y la 6-cetoprostaglandina F1-alfa (PGF<sub>1α</sub>), así como niveles bajos del eicosanoide ácido 5-hidroxi-eicosanoide (5-HETE) (Ricciotti y FitzGerald, 2011; Sabidó et al., 2012). La activación de macrófagos por estímulos pro-inflamatorios como ligandos de TLR4,

promueven el cambio evidente en la cantidad absoluta y relativa de eicosanoides producidos por el macrófago (Buczynski et al., 2009; Ricciotti y FitzGerald, 2011; Sabidó et al., 2012). Estudios de lipidómica demostraron que los macrófagos activados por LPS (ligando de TLR4) exhiben la expresión incrementada de los genes de la fosfolipasa citosólica *A2 Pla2g4a*, que libera el ácido araquidónico de los fosfolípidos, como proceso subsecuente de su activación. Además, el fosfatidilinositol y fosfatidil-etanolamina enriquecidos en ácido araquidónico, aumentan en macrófagos activados vía TLR2 con zymozan (Balgoma et al., 2010; Underhill DM., 2003). Además, la activación por TLR4 resulta en el incremento de los niveles de C20:4, de la expresión de ciclooxigenasa 2 (COX-2) y de la producción de PGE<sub>2</sub> (Ricciotti y FitzGerald, 2011). En ese mismo sentido, la PGE<sub>2</sub> favorece la expresión de COX-2 y Prostaglandina E sintetasa (PGES-1) (Díaz-Muñoz et al., 2012), lo cual origina retroalimentación positiva. De esta manera, la activación pro-inflamatoria de los macrófagos resulta en la activación preferencial de COX-2 y PGES-1 en la vía del C20:4, lo cual promueve que otras prostaglandinas derivadas de la vía COX-2, como PGD<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub>, también estén incrementadas al igual que el producto de la 5-lipoxigenasa, el 5-HETE (Sabidó et al., 2012; Buczynski et al., 2009).

### **3.3.1 Alteraciones del metabolismo C20:4 en los macrófagos durante la DM**

Diversos estudios apuntan a que los monocitos y macrófagos adquieren el fenotipo pro-inflamatorio durante alteraciones metabólicas como la DM (Padmos et al., 2008; Pradshaw et al., 2009; Jialal y Kaur, 2012). Los monocitos y macrófagos de pacientes y ratones diabéticos a menudo exhiben metabolismo incrementado de C20:4. La sobreproducción de araquidonoil-CoA, COX-2 y PGE<sub>2</sub> se ha descrito en

modelos murinos de DM1 y en pacientes con DM1 y DM2 en comparación con controles sanos (Natarajan y Nadler, 2004; Lo CJ., 2005; Padmos et al., 2008; Kanter et al., 2012a). Además, todos los tipos de DM se asocian con el nivel elevado de expresión del gen que codifica para las quimiocinas CCL7 y CCL2 en monocitos (Padmos et al., 2008). Los niveles de otros eicosanoides, incluyendo a los productos de la lipoxigenasa también pueden estar siendo alterados por la DM (Natarajan y Nadler, 2004; Zhou et al., 2007). Algunos de los efectos de la diabetes sobre el metabolismo de C20:4 en los macrófagos podrían ser ocasionados por la hiperglucemia (Natarajan y Nadler, 2004). Por ejemplo, los macrófagos derivados de médula ósea activados por vía clásica con LPS e IFN- $\gamma$  por 48 horas, y cultivados en concentraciones normales de glucosa, producen PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , 12-HETE, 15-HETE, 5-HETE, y mucho menos leucotrieno B<sub>4</sub> (Kanter et al., 2012a). Cuando estos macrófagos se diferencian en altas concentraciones de glucosa (25 mM), la cantidad absoluta de eicosanoides se incrementa al doble, al igual que las cantidades relativas de PGD<sub>2</sub> y PGE<sub>2</sub> (Kanter et al., 2012a). Por lo tanto, monocitos y macrófagos expuestos a altas concentraciones de glucosa *in vitro*, generan perfiles inflamatorios parecidos a los observados en el contexto de la diabetes. La mayor producción de eicosanoides parece exacerbar el fenotipo pro-inflamatorio de los monocitos y macrófagos en la DM. Sin embargo, todavía es necesario realizar estudios adicionales para elucidar la actividad de los diferentes eicosanoides y las vías que activan macrófagos hacia los fenotipos M1 o M2 bajo condiciones de hiperglucemia crónica (Kanter y Bornfeldt, 2013).

### **3.3.2 Alteraciones fenotípicas y funcionales de los macrófagos durante la DM**

En macrófagos humanos, las altas concentraciones de glucosa incrementan la expresión de diversos receptores como el transportador de ácidos grasos CD36 (Griffin et al., 2001). Por el contrario, en macrófagos peritoneales de ratón no se observa el efecto similar de la hiperglucemia sobre la expresión de CD36 (Liang et al., 2004). Es posible que esta aparente inconsistencia se deba a la diferencia en la capacidad de responder a la glucosa entre los macrófagos humanos y murinos, probablemente atribuible a los bajos niveles de expresión de la enzima aldosa reductasa en los macrófagos de roedor. Lo anterior se sustenta debido a que incrementando los niveles de aldosa reductasa en células murinas se observa el aumento en la expresión de CD36 (Vikramadithyan et al., 2005). Además, las concentraciones elevadas de glucosa inducen la secreción de IL-12 en macrófagos peritoneales de ratón, así como también la mayor expresión a nivel de RNA mensajero de las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 y TNF- $\alpha$  (Wen et al., 2006). Otros receptores involucrados en la toma de LDL modificado también son inducidos por la glucosa (Li et al., 2004; Fukuhara-Takakiet al., 2005). De hecho, la glucosa por si misma parece ser capaz de promover la acumulación de colesterol en el macrófago (Hayek et al., 2005). En este sentido, existe evidencia de que los monocitos de personas con DM expresan niveles elevados de CD36 y la incorporación aumentada de LDL modificado (Sampson et al., 2003; Cipolletta et al., 2005). Además, concentraciones elevadas de glucosa incrementan el contenido de lípidos debido a la disminución en la expresión del transportador de esteroides ABCG1, el cual está implicado en coordinar la salida de colesterol de los macrófagos (Mauldin et al.,

2006; Tarling 2011). Otros lípidos como el oleato y el linoleato tienen efecto similar, pues reducen la expresión de ABCG1 en macrófagos (Uehara et al., 2007).

### **3.4 La hiperglucemia como factor promotor de la respuesta inflamatoria asociada con la DM**

Existen dos mecanismos probables mediante los cuales la hiperglucemia podría contribuir a la alteración de las propiedades vasculares en la DM. EL primero de ellos implica la formación excesiva de poliol por el aumento del flujo de glucosa al interior de la célula, el cual se ha reportado como parte de las alteraciones en nervios periféricos durante la DM (Gabbay et al., 1966). Casi 10 años después de esta observación, se describió un mecanismo novedoso de daño a tejido vascular y nervioso, la formación de AGEs debida a las altas concentraciones de glucosa extracelular (Brownlee M., 2005).

La vía de poliol se sobreactiva en estados hiperglucémicos asociados con la DM, metabolizando el exceso de glucosa que entra a las células (Greene et al., 1987). El flujo elevado de metabolitos a través de la vía del poliol resulta en el exceso de sorbitol que induce la generación de ROS. A su vez, la hiperglucemia favorece también la generación de AGEs, que son proteínas glicadas resultado de la interacción de aldosas (como la glucosa) con grupos aminos libres presentes en las proteínas. Un ejemplo de este tipo de AGEs es la bien estudiada hemoglobina glicada (Schmidt et al., 1999). Los productos glicados no enzimáticamente son reconocidos por el receptor de productos terminales de glicación avanzada (RAGE) (Schmidt et al., 1994 y 1995) y esto deriva en la activación de una vía pro-inflamatoria mediada por NF $\kappa$ B y Ras-MAPK (Schmidt et al., 1999).

### 3.4.1 Vía inflamatoria mediada por la formación de AGE

La hiperglucemia crónica media la formación no enzimática de AGEs como resultado de la interacción de la glucosa con grupos aminos libres en las proteínas (residuos de arginina o lisina) (Schmidt et al., 1999; Cho et al., 2007; Peppas et al., 2009; Jack et al., 2012; Zheng et al., 2012). La glicación proteica es una de las modificaciones no enzimáticas más importantes de las proteínas, involucradas en la formación de agregados de proteínas endógenas (Ott et al., 2014). El descubrimiento de los AGEs se remonta a la investigación de la reacción de pardeamiento no enzimático de Maillard realizada en 1912 (John y Lamb, 1993). Este investigador fue el primero en observar y describir los productos terminales color pardo después de la reacción entre la glucosa y la glicina. Actualmente, los AGEs se emplean en la industria alimenticia para mejorar el sabor, la seguridad y la biodisponibilidad de los alimentos (O'Brien y Morrissey 1989).

La formación de los AGEs durante la preparación de alimentos es un procedimiento muy rápido, dado que su formación se favorece con el incremento de la temperatura y la concentración de azúcar. Sin embargo, la formación de los AGEs *in vivo* es un proceso prolongado dadas las bajas temperaturas a las que ocurre (Ott et al., 2014). Se considera que la formación de AGEs a lo largo de periodos prolongados afecta especialmente a proteínas con vida media a largo plazo, como la hemoglobina, la fosfatasa alcalina, la lisozima, el colágeno y la elastina (Nass et al., 2007; Kasper y Funk, 2001). En el caso del colágeno, la formación de enlaces cruzados de los AGEs provoca la rigidez de la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés), que a menudo está involucrada en la disfunción de órganos y

vasos sanguíneos (Badenhorts et al., 2003). Adicionalmente a su prolongado tiempo de vida, la exposición a altas concentraciones de glucosa extracelular hace a estas proteínas blancos del proceso de glicación no enzimática. Como consecuencia de este proceso de glicación se presentan alteraciones en la estructura proteica, lo cual hace más resistentes a estas macromoléculas a la degradación, culminando en la acumulación de proteínas con enlaces cruzados en células y tejidos (Kasper y Funk, 2001).

La primera reacción en la formación de los AGEs es la condensación del grupo carbonilo de un carbohidrato reducido (o aldehído) con el grupo amino libre de una proteína. Posteriormente, se forma una base de Schiff (proceso reversible), la cual puede después ser convertida a un producto de Amadori con un enlace covalente (Ott et al., 2014). El re-arreglo de la base de Schiff depende de la cantidad de glucosa, grupos aminos libres, así como del valor de pH alcalino. En contraste, la formación del producto de Amadori depende del pH ácido y tiene índices de reacción más lentos (Ott et al., 2014; Dyer et al., 1992). La hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>) fue uno de los primeros productos de Amadori conocidos y se utiliza como marcador preciso del promedio de la concentración de glucosa sanguínea medible hasta por tres semanas. Sin embargo, no sólo los productos de Amadori son responsables de la formación de los AGEs. Adicionalmente, la degradación de lípidos y amino ácidos, la escisión de compuestos dicarbonilo de aldminas (imina derivada de aldehídos por reacciones de condensación, como las bases de Schiff) por la vía de Namiki, así como también la formación de compuestos carbonílicos después de la auto-oxidación de monosacáridos, tales como glucosa, ribosa, fructosa y gliceraldehído mediado por la vía de Wolff (Thornalley et al., 1999); todos estos procesos pueden

contribuir a la formación de AGEs (Ferreira et al., 1999; Glomb y Monnier, 1995). En la definición para los AGEs formados *in vivo*, se establecen dos grupos de productos de glicados, los que se derivan de la reacción con un grupo carbonil (AGE), y por otro lado los productos terminales de lipoxidación avanzada (ALE). Mientras que los primeros se originan de la glicación no enzimática y la auto-oxidación de la glucosa o del sorbitol, los ALE son generados por dicarbonilos reactivos derivados de la peroxidación lipídica (Aldini et al., 2013).

#### *Receptores de los AGE (RAGE)*

Los AGE pueden ser reconocidos por RAGE, el cual es expresado en células neuronales, gliales, endoteliales, de tejido hepático, de músculo liso, fibroblastos, condrocitos y queratinocitos, así como en linfocitos T y células dendríticas (Schmidt et al. 1994 y 1995; Dumitriu et al., 2005; Nah et al., 2007; Tian et al., 2007; Nass et al., 2007; Moser et al., 2007; Chen et al., 2008; Zhang F. et al., 2009; Pollreisz et al., 2010; Ohashi et al., 2010; Liu et al., 2010; Kamioka et al., 2011; Wang et al., 2012; Akirav et al., 2012; Zhu et al., 2012). RAGE es un receptor tipo I de superficie celular que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y se ha descrito como un receptor de reconocimiento de patrones moleculares asociados a daño (Neeper et al., 1992; Chavakis et al., 2003). Basado en estudios de clonación molecular, RAGE se describió primero como un polipéptido de peso molecular de 35 kDa en células endoteliales de pulmón bovino. De acuerdo con su secuencia, el RAGE en humanos consiste de 404 aminoácidos, con peso molecular de 42.8 kDa. Análisis de Western Blot de líneas celulares (células 293) transfectadas con RAGE, muestran una banda de aproximadamente 50 kDa debido al procesamiento postraduccional del receptor (Neeper et al., 1992). Después de reconocer a sus ligandos, RAGE activa diferentes

vías de señalización (Kierdorf et al., 2013). La proteína completa o full-length RAGE (fl-RAGE, por sus siglas en inglés) consiste de un gran dominio extracelular, un dominio transmembranal de un solo paso (formado por un alfa hélice) y un dominio citoplasmático corto. El dominio intracelular de fl-RAGE es esencial para la señalización intracelular y la activación de NFκB (Huttunen et al., 1999). La región extracelular de fl-RAGE está compuesta de un dominio N-terminal de tipo variable (Tipo-V), y dos dominios de tipo constante (Tipo-C) (Dattilo et al., 2007). El sitio de unión del ligando se encuentra en el dominio Tipo-V, cuya estructura secundaria consiste en dos laminas beta, un alfa hélice corta y una cola con conformación al azar (lo cual es muy parecido a la estructura de los dominios variables de las inmunoglobulinas) (Matsumoto et al., 2008). En contraste con el dominio C2, los dominios V y C1 funcionan como una unidad estructural (VC1) y forman una estructura independiente. Además, se demostró que el dominio VC1 está unido al dominio C2 por un enlace flexible (Dattilo et al., 2007). Existen 20 diferentes variantes de RAGE conocidas, originadas por splicing alternativo (Flacone 2013). Dos principales variantes por splicing de fl-RAGE a nivel de mRNA han sido caracterizadas recientemente, una de estas variantes (N-truncated RAGE) carece del dominio N-terminal de tipo-V, y se encuentra localizada en la membrana plasmática. La segunda variante por splicing de RAGE es una forma soluble que carece del dominio C-terminal pero que contiene todos los dominios de inmunoglobulina de fl-RAGE (Yonekura et al., 2003). La forma soluble de RAGE es secretada extracelularmente y dos diferentes tipos fueron identificados. La primera es la esRAGE resultado del splicing alternativo del RNA mensajero de RAGE. La segunda forma soluble se debe al clivaje proteolítico del fl-RAGE por medio de las

metaloproteinasas ADAM10 y MMP9 que deriva en la liberación de RAGE en su forma soluble (sRAGE) (Zhang L. et al., 2008). sRAGE puede competir por la unión a los AGE con RAGE y otros receptores celulares (como TLR4) impidiendo la activación de las vías de señalización mediada por los AGEs (Bierhaus et al., 2005).

La interacción entre el AGE y el RAGE induce la producción local de especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno, así como la expresión de citocinas proinflamatorias, y factores quimioatrayentes y protrombóticos (Brett et al., 1993; Schmidt et al., 1994 y 1995). De esta manera, el reconocimiento de los AGEs promueve directamente daño al tejido vascular y nervioso, así como el reclutamiento de leucocitos mononucleares, mismos que exacerbaban el daño (Yan et al., 2009). Como se mencionó anteriormente, uno de los tipos celulares clave en el daño tisular mediado por la interacción AGE/RAGE es el macrófago, tópico que se abordará más adelante.

### **3.4.2 Vía inflamatoria mediada por el poliol y el incremento del flujo metabólico**

La hiperglucemia es capaz de inducir daño en diversos tipos celulares y tejidos como las células endoteliales en los capilares de la retina, las células mesangiales en el glomérulo renal, y las neuronas y células de Schwann en los nervios periféricos. La mayoría de las células son capaces de reducir el transporte de glucosa al interior de célula cuando están expuestas a hiperglucemia, promoviendo la concentración interna de glucosa constante. En contraste, las células que son dañadas por la hiperglucemia no son capaces de hacer lo mismo de manera tan eficiente (Kaiser et al., 1993; Heilig et al., 1995). Por lo tanto, la diabetes daña selectivamente células como las endoteliales y mesangiales, cuyo transporte de glucosa no declina

rápidamente como resultado de la hiperglucemia, llevándolas a tener alta concentración de glucosa al interior de la célula y causando daño permanente en éstas (Brownlee M., 2005).

La vía del poliol se centra en la enzima aldosa reductasa. La aldosa reductasa tiene normalmente la función de reducir aldehídos tóxicos en la célula a alcoholes inactivos. No obstante, cuando la concentración de glucosa en la célula es demasiado alta, la aldosa reductasa reduce la glucosa a sorbitol, que después se oxida a la fructosa por la participación de la enzima sorbitol deshidrogenasa (Lee et al., 1999). En el proceso de reducción de la glucosa intracelular a sorbitol, la aldosa reductasa consume el cofactor NADPH (Lee et al., 1999). El NADPH es también el cofactor esencial para la regeneración de un antioxidante intracelular crítico, el glutatión reducido. Al reducir la cantidad de glutatión reducido, la vía del poliol aumenta la susceptibilidad al estrés oxidativo intracelular.

La importancia de este mecanismo en el desarrollo de complicaciones vasculares asociadas con la diabetes es evidente al observar el estudio realizado por Ron Engerman y Tim Kern (Engerman et al., 1994), en la que perros diabéticos fueron tratados durante 5 años con un inhibidor de la aldosa reductasa. Los resultados de estos investigadores demostraron que si bien la velocidad de conducción nerviosa en los perros diabéticos disminuyó con el tiempo como ocurre en los pacientes, en los perros diabéticos tratados con el inhibidor de la aldosa reductasa el desarrollo del daño degenerativo inducido por la diabetes fue significativamente menor, lo cual llevo a la adecuada velocidad en la conducción del impulso nervioso.

#### **IV. ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los macrófagos poseen básicamente dos estados de activación: activación clásica M1 y alternativa M2. La activación clásica o pro-inflamatoria es favorecida por citocinas tipo Th1 como el IFN- $\gamma$ , o por moléculas derivadas de patógenos como el LPS, mientras que la activación alternativa o anti-inflamatoria, es inducida por citocinas tipo Th2 como la IL-4 y la IL-13. De esta forma, los macrófagos activados clásicamente son capaces de producir grandes cantidades de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y óxido nítrico, mientras que los macrófagos activados de manera alternativa sintetizan IL-10, una citocina con actividad inmunoreguladora. Diversos estudios han mostrado que la hiperglucemia posee un vínculo directo con la generación del estado inflamatorio en pacientes diabéticos, mismo que contribuye al desarrollo de lesiones en tejido vascular y nervioso en estos individuos. De manera complementaria, evidencia reciente ha mostrado que pacientes diabéticos con diversas comorbilidades como la enfermedad isquémica del corazón o la insuficiencia renal crónica expresa el incremento en la población de monocitos-macrófagos M1 y la disminución concomitante en la población M2. Además, estudios complementarios indican que los macrófagos presentes en lesiones arterioescleróticas poseen un perfil inflamatorio en el paciente diabético con respecto a pacientes que no presentan alteraciones en el metabolismo de la glucosa. En conjunto, toda esta información sugiere que durante la diabetes los macrófagos podrían ser capaces de direccionarse hacia tejidos vasculares dañados, promoviendo la respuesta inflamatoria exacerbada así como la aparición de complicaciones asociadas con la hiperglucemia, como la formación de placas arterioescleróticas y la producción de

especies protrombóticas, aumentando así el riesgo cardiovascular en pacientes con DM2. Sin embargo, todavía no se conocen con exactitud los mecanismos a través de los cuales los macrófagos participan en el daño tisular observado durante el estado hiperglucémico.

El estudio de los macrófagos en la generación de complicaciones asociadas con el estado hiperglucémico observado durante la DM2 se ha restringido a su capacidad de reconocer AGEs y promover daño en tejido vascular y nervioso a través de la orquestación de la respuesta inflamatoria local. Sin embargo, hasta la fecha se desconoce si las altas concentraciones de glucosa son capaces de potenciar de manera directa la activación clásica M1 de macrófagos humanos y, de manera concomitante, restringir la activación alternativa M2 de estas células. Así mismo, si las concentraciones elevadas de glucosa poseen efecto directo sobre la activación de los macrófagos, es muy importante dilucidar el posible mecanismo a través del cual esto ocurre. Con base en la información revisada hasta el momento, las altas concentraciones de glucosa podrían polarizar al macrófago hacia el estado pro-inflamatorio, ya sea por medio del incremento del flujo metabólico de la vía del poliol en esta célula inmunológica, y/o por el reconocimiento de AGEs a través de los receptores RAGE o TLR4. Aunado a lo anterior, las altas concentraciones de glucosa podrían también restringir la activación alternativa de los macrófagos, a través de la disminución de la capacidad anti-inflamatoria de estas células.

Dada la grave epidemia de obesidad y la alta prevalencia de DM2 en nuestro país, es muy importante entender el efecto que poseen las concentraciones elevadas de glucosa sobre la activación de macrófagos, lo cual podría ser útil en el futuro diseño de nuevas estrategias farmacológicas que puedan prevenir o controlar

la aparición de complicaciones micro y macrovasculares asociadas con la hiperglucemia crónica en humanos.

## **V. HIPÓTESIS**

Las concentraciones elevadas de glucosa favorecen la activación clásica de macrófagos humanos y/o, concomitantemente, limitan la activación alternativa de estas células, a través de la vía de señalización TLR4/RAGE-NF $\kappa$ B y/o la vía metabólica del poliol.

## **VI. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de las concentraciones elevadas de glucosa sobre la activación clásica y alternativa de macrófagos humanos *in vitro*, caracterizando dicho efecto a nivel fenotípico, funcional y transcripcional.

## **VII. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Obtener monocitos humanos de sangre periférica y diferenciarlos a macrófagos *in vitro*.
- Establecer el efecto de las concentraciones elevadas de glucosa sobre la capacidad inflamatoria de macrófagos humanos, a nivel fenotípico, funcional y transcripcional.
- Evaluar el efecto de las concentraciones elevadas de glucosa sobre la capacidad anti-inflamatoria de macrófagos humanos, a nivel fenotípico, funcional y transcripcional.

## **VIII. METODOLOGÍA**

### **8.1 Obtención de las muestras biológicas**

La recolección de las muestras biológicas para el estudio se realizó en el Servicio de Banco de Sangre del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”. Se obtuvieron extractos leucocitarios de donadores de sangre que aceptaron participar en el estudio a través de la firma de la Carta de Consentimiento Informado. El estudio fue avalado por las comisiones de ética en investigación e investigación del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”. Los donadores incluidos en el estudio cumplieron con los criterios de inclusión, como a continuación se detalla.

#### **8.1.1 Criterios de inclusión**

Las muestras de sangre (extractos leucocitarios) se obtuvieron de donadores varones, mexicanos, sin ancestros indígenas en primera y segunda línea generacional, con rango de edad de 18 a 35 años e índice de masa corporal (IMC) entre 18.5 y 24.9 kg/m<sup>2</sup> (sin obesidad o sobrepeso). Los donadores fueron incluidos en el estudio si presentaban química sanguínea de seis elementos en rangos normales (Glucosa, Colesterol, Triglicéridos, ácido úrico, creatinina y urea). Los donadores fueron incluidos en el estudio si no presentaban resistencia a la insulina de acuerdo con la definición del índice de HOMA-IR < 3.8 para individuos hispanos (Qu HQ et al., 2011), y sin diagnóstico previo de intolerancia a la glucosa o DM. Además, los donadores fueron incluidos en el estudio si no presentaban seropositividad para los virus de la hepatitis B (HBV), hepatitis C (HCV) y de la inmunodeficiencia humana (HIV), así como ningún tipo de infección bacteriana o parasitaria al momento de su asistencia al Servicio de Banco de Sangre.

### **8.1.2 Criterios de exclusión**

No se incluyeron en el estudio, individuos con diagnóstico previo de diabetes tipo 1 y 2, pancreatitis aguda o crónica, insuficiencia renal aguda o crónica. Tampoco se incluyeron donadores con cualquier grado de desnutrición, VIH-SIDA y hepatitis virales; y con infecciones por virus de influenza, bacterianas, parasitarias y micóticas en lapso menor de 30 días al momento de la toma de la muestra sanguínea. De igual manera se excluyeron donadores con enfermedades autoinmunes, procesos inflamatorios crónicos, neoplasias de cualquier origen o cualquier otro desorden o condición con capacidad de alterar al sistema inmunológico. Se excluyeron también individuos que en lapso menor de 30 días al momento de la toma de la muestra sanguínea hayan usado anti-inflamatorios esteroideos o no esteroideos, anti-piréticos, anti-histamínicos u otros fármacos inmunosupresores o inmunomoduladores, o que los usaran de manera regular.

### **8.1.3 Criterios de eliminación**

Se eliminaron del estudio a aquellos sujetos que presentaron resultado positivo a las pruebas confirmatorias para infecciones por HBV, HCV y HIV, posterior al reclutamiento. Se eliminaron también aquellas muestras en donde el extracto leucocitario por parte del Servicio de Banco de Sangre presentara ruptura de la bolsa o algún daño que comprometiera la calidad de la muestra, o por errores en el procesamiento de las mismas.

## **8.2 Purificación de monocitos/macrófagos**

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) fueron obtenidas a partir de los extractos leucocitarios de donadores como se describió anteriormente. Las PBMC se obtuvieron diluyendo el extracto leucocitario 1:1 con buffer de fosfatos 1X estéril (PBS, por sus siglas en inglés), separándolas por gradiente de Ficoll usando Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich). Durante este paso de la purificación verificamos que no hubiera contaminación por plaquetas, la cual evitamos con 4 lavados por 5 min con PBS 1X de las PBMC. Los monocitos fueron obtenidos mediante selección negativa por columna de separación magnética (Miltenyi). La pureza de la separación (>95%) se comprobó por citometría de flujo con la adición de 3 µl de cada uno de los siguientes anticuerpos: anti-CD45 humano acoplado a fluoresceína 5-isotiocianato (FITC, Biolegend) y anti-CD14 humano acoplado a ficoeritrina con Cy7 (PE-Cy7, Biolegend). Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo (BD FACSCanto II), considerando 20 mil eventos para la población de monocitos/macrófagos. Los resultados fueron expresados como media de fluorescencia y analizados mediante el programa FACSDiva.

## **8.3 Cultivo y diferenciación de monocitos a macrófagos**

Los monocitos/macrófagos CD14<sup>+</sup> obtenidos a partir del proceso de separación se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco) con gentamicina (50 µg/mL) en cajas de Petri de plástico (Costar, México), sembrando  $2 \times 10^6$  células por placa. El medio contenía 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (Hi-SFB, Gibco), 10 ng/mL de factor estimulante de la colonia de macrófagos (M-CSF, Peprotech, México), 10

ng/mL de Interleucina 3 (IL-3, Peprotech, México) y fue incubado por seis días cambiando el medio de cultivo cada 48 horas.

#### **8.4 Comparación morfológica de monocitos y macrófagos derivados de monocitos**

La comparación morfológica entre monocitos y macrófagos derivados de monocitos (MDM) se llevó a cabo por citometría de flujo, tomando en cuenta el tamaño y la complejidad celular, así como la intensidad media de fluorescencia (IMF) de CD14 y CD45 en las células.

#### **8.5 Condiciones de estímulo de MDM**

Los MDM de cada donador fueron cultivados bajo 9 condiciones distintas como se describirá a continuación. La incubación de macrófagos se llevó a cabo durante tres días usando concentraciones normales de glucosa (5.5 mM) y concentraciones elevadas de glucosa (15 mM), usando 5.5 mM de glucosa y 9.5 mM de D-manitol como control de presión osmótica. La activación de macrófagos por vía clásica M1 se realizó con 100 ng/ml de INF- $\gamma$ , usando concentraciones de glucosa de 5.5 mM y 15 mM, y usando 5.5 mM de glucosa y 9.5 mM de D-manitol como control de presión osmótica. La activación de macrófagos por vía alternativa M2 se hizo con 10 ng/ml de IL-4 y 10 ng/ml de IL-13, usando concentraciones de glucosa de 5.5 mM y 15 mM, y usando 5.5 mM de glucosa y 9.5 mM de D-manitol como control de presión osmótica. La producción de citocinas se determinó por medio del ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) a partir del sobrenadante de los cultivos. Las células se analizaron por citometría de flujo para

identificar su fenotipo y se extrajo el ácido ribonucleico (RNA, por sus siglas en inglés) de las muestras con el fin de caracterizar su actividad transcripcional por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) punto final.

## **8.6 Expresión de marcadores fenotípicos**

La caracterización fenotípica se encuentra categorizada en dos fases, la primera reconoce la incidencia de los marcadores fenotípicos que definieron a nuestra población de estudio. El fenotipo de los MDM fue realizado mediante la identificación de la expresión de CD45 y CD14, seguidos de CD11c y CD206. Para la inmunodetección por citometría de flujo se colectaron los MDM adheridos a la placa mediante el uso de un cosechador manual de células y se colocaron 50  $\mu$ L de la suspensión celular conteniendo  $1 \times 10^6$  células en un tubo eppendorf. Posteriormente se adicionaron 3  $\mu$ L de Human TruStain FcX a cada eppendorf para bloquear las fracciones Fc por 5 minutos, con anticuerpos no marcados y así evitar el pegado inespecífico de los anticuerpos unidos a fluorocromo. Se adicionaron los anticuerpos en las cantidades que se indican en la Tabla 1, se agitó en Vortex por 3 segundos y se incubaron durante 15 minutos a 4°C en oscuridad. Las células se centrifugaron a 2500 rpm por 5 minutos. El sobrenadante fue retirado y la pastilla celular fue resuspendida en 400  $\mu$ L de PBS 1X (pH 7.2). Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo (BD FACSCanto II), considerando 20 mil eventos para la población de MDM. Los resultados se expresaron como porcentajes y medias de fluorescencia, y analizados mediante el software FACSDiva.

**Tabla 1.** Condiciones para la detección de monocitos-macrófagos por citometría de flujo.

Marcador	Anticuerpo	Cantidad	Función/células que lo expresan
CD45	Anti-CD45 FITC	3 $\mu$ L	Tirosina-fosfatasa/todos los leucocitos.
CD14	Anti-CD14 PE-Cy7	2 $\mu$ L	Co-receptor de TLR4/Monocitos y Macrófagos.
CD11c	Anti-CD11c PE-Cy5	2 $\mu$ L	Integrina-Adhesión celular/Macrófagos pro-inflamatorios.
CD206	Anti-CD206 APC-Cy7	3 $\mu$ L	Receptor de manosa/Macrófagos anti-inflamatorios.

### 8.7 Evaluación de la producción de citocinas por ELISA

El sobrenadante de los cultivos de MDM se colectó después de 24, 48 y 72 horas en cultivo *in vitro*. La producción de citocinas se cuantificó por ensayos por ELISA tipo sándwich. Los MDM cultivados en presencia de concentraciones normales y elevadas de glucosa, así como activados por vía clásica o alternativa se analizaron para determinar la producción de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e IL-12. La cuantificación por ELISA tipo sándwich se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Peprotech, México). Brevemente, a cada pozo se añadieron 100  $\mu$ l del anticuerpo de captura (1  $\mu$ g/ml) y se incubó toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, los pozos de la placa fueron lavados cuatro veces con PBS 1X-Tween 20 0.05% (Sigma-Aldrich) y se bloqueó la placa con PBS 1X BSA 1% por 1 hora y media, seguido por un lavado adicional con PBS 1X-Tween 20 0.05% (Sigma-Aldrich). Enseguida se añadieron los estándares y el suero de cada paciente por triplicado a temperatura

ambiente, incubando durante 2 horas, seguido de un lavado con PBS 1X-Tween 20 0.05% (Sigma-Aldrich). Posteriormente se adicionó el anticuerpo secundario conjugado a biotina a temperatura ambiente durante 2 horas (PeproTech, México). Una vez transcurrido este tiempo, se realizó un lavado para eliminar el exceso de anticuerpo secundario libre. Después se añadió la solución del conjugado de Avidina-Peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés) seguido de un último lavado para eliminar el exceso del conjugado enzimático no acoplado al anticuerpo secundario. Por último, se añadió el sustrato líquido ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS, Sigma, México). Finalmente, la concentración de proteína se cuantificó por medio de lector de ELISA a 405 nm (Bio-Tek ELx800, 96 pozos, BIO-Tek, USA) con corrección de longitud de onda a 630 nm.

### **8.8 Evaluación de la actividad transcripcional por RT-PCR**

Los MDM adheridos a la placa se colectaron mediante el uso de un cosechador manual de células y se colocaron 50  $\mu$ L de la suspensión celular conteniendo  $1 \times 10^6$  células en un tubo eppendorf. Los MDM fueron entonces lisados en 200  $\mu$ L Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las muestras fueron homogeneizadas usando agitación constante durante 3 min y posteriormente se adicionaron 40  $\mu$ L de Cloroformo (Sigma-Aldrich). Las muestras se incubaron 5 min a 4°C y se centrifugaron a 13000 rpm/4°C por 30 min, recuperando la fase acuosa en tubos eppendorf de 1.5 mL. Enseguida, considerando el volumen de la fase acuosa se adicionó el mismo volumen de isopropanol (Sigma-Aldrich) y se incubó a 4°C toda la noche. Después de este tiempo, el ARN fue precipitado a 13000 rpm/4°C durante 30 min, y se lavó con alcohol absoluto tres veces. El ARN resultante se resuspendió en H<sub>2</sub>O-DEPC

(Sigma-Aldrich) y posteriormente se cuantificó por medio de la lectura de su absorbancia en el espectrofotómetro a longitud de onda de 260 nm. La pureza del ARN se comprobó por medio de la lectura de su absorbancia en el espectrofotómetro a longitud de onda de 280 nm, utilizando este valor como denominador y el valor de absorbancia de la lectura a 260 nm como numerador (260/280). La integridad del ARN se verificó corriendo una alícuota de las muestras en gel de agarosa al 1.5% (las muestras degradadas presentan barrido de bandas de todo tipo de longitudes a lo largo del gel de agarosa, lo que no ocurrió con estas muestras). Posteriormente, se procedió a la retrotranscripción de 1 µg de RNA mediante el uso de Oligonucleótido dT (1:5; Invitrogen, Carlsbad, CA) y M-MLV retrotranscriptasa (1 µL/20 µL de reacción; Invitrogen, Carlsbad, CA), a 37°C/60 min. Usando el cDNA como templado, se realizó el PCR usando oligonucleótidos específicos de secuencia para marcadores de activación clásica (NFκB y TLR-4), alternativa (IL-10) y genes relacionados con la vía del poliol (sorbitol deshidrogenasa y aldosa reductasa). Se utilizó 18s como gen de expresión constitutiva. Las condiciones del PCR fueron las siguientes: AmpliTaq 0.5 µL/50 µL de reacción (Biotecnologías Universitarias, UNAM, México), temperatura inicial de 95°C por 5 min, 35-45 ciclos de 95 °C por 30 seg (desnaturalización), 57 °C – 63 °C por 30 a 45 seg (dependiendo del gen; alineación), y 72°C por 30-45 seg (elongación), con temperatura de elongación final de 72°C por 5 min. Posteriormente, el producto de PCR se corrió en gel de agarosa 1.5%, para, previa tinción con Bromuro de Etidio 1%, ser visualizado en transiluminador de luz UV de onda corta. La expresión de cada gen fue analizada como la medida de su densidad óptica entre el valor de

densidad óptica del gen constitutivo, con ayuda del software de análisis Image-J. Por lo cual, este tipo de análisis es de tipo semi-cuantitativo.

### **8.9 Análisis estadístico**

El análisis de los datos se realizó mediante el software Graph Pad Prism versión 6. Los análisis fueron comparaciones de dos grupos (caracterización de la diferenciación de monocitos a macrófagos) y de tres grupos (comparación entre concentraciones de glucosa fisiológicas, elevadas y control de presión osmótica). Los datos resultados de cada variable de salida fueron analizados con pruebas de normalidad Kolmogorov-Smirnov (K-S), para determinar si presentaban distribución normal. Los resultados de las pruebas de normalidad K-S se confirmaron mediante pruebas de normalidad Shapiro-Wilk (S-W). Al comparar dos grupos cuyas variables de salida presentaban distribución normal, se utilizó como prueba estadística la t de Student pareada. Las variables analizadas bajo este esquema fueron las comparaciones de tamaño, complejidad celular e IMF de CD14 entre monocitos y MDM. Al comparar tres grupos cuyas variables de salida presentaban distribución normal, se utilizó como prueba estadística el ANOVA de una vía, seguido del análisis de comparación múltiple de Tukey. Las variables analizadas bajo este esquema fueron las comparaciones de IMF de CD206, concentración de TNF- $\alpha$ , concentración de IL-6 y concentración de IL-10 entre MDM cultivados en concentraciones fisiológicas y elevadas de glucosa y de control de presión osmótica. La comparación entre dos grupos cuyas variables de salida no presentaron distribución normal se analizó con la prueba de Wilcoxon. La variable analizada bajo este esquema fue la IMF de CD45 entre monocitos y macrófagos. La comparación entre tres grupos

cuyas variables de salida no presentaron distribución normal se analizó con la prueba de Friedman, seguida con el análisis de comparación múltiple de Dunn. Las variables analizadas bajo este esquema fueron porcentaje de células CD11c<sup>+</sup>, porcentaje de células CD206<sup>+</sup>, IMF de CD11c, concentración de IL-12, la expresión de los genes de NFκB, TLR4, ADR y SDH entre MDM cultivados en concentraciones fisiológicas y elevadas de glucosa y de control de presión osmótica. De acuerdo con literatura previa, se consideró la n de 10 individuos para realizar el análisis estadístico correspondiente.

## IX. RESULTADOS

### 9.1 Características antropométricas y bioquímicas de los donadores incluidos en el estudio

Las características antropométricas y bioquímicas de los donadores reclutados se resumen en la tabla 2. Los donadores (n=10) incluidos en el estudio no presentaban ninguna alteración metabólica al momento de la donación de los extractos leucocitarios, cumpliendo los parámetros antropométricos y bioquímicos establecidos dentro de los criterios de inclusión.

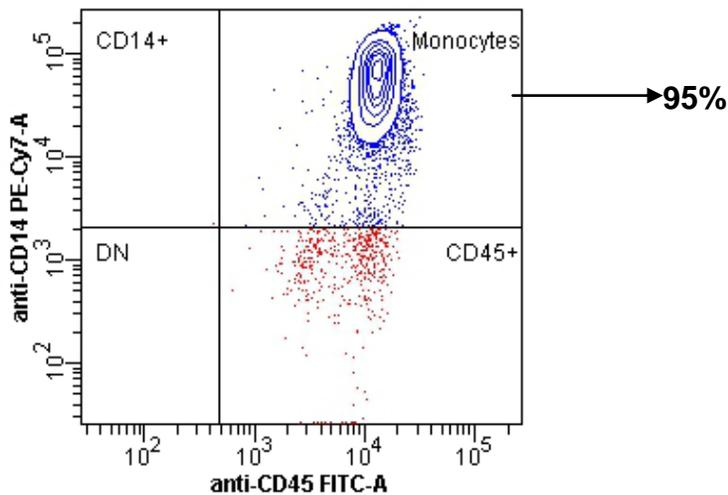
**Tabla 2.** Características antropométricas y bioquímicas de los donadores incluidos en el estudio. Los datos son presentados como el promedio  $\pm$  el desvío estándar.

Edad (años)	24.3 $\pm$ 4.191
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	22.18 $\pm$ 1.716
Circunferencia de cintura (cm)	79.2 $\pm$ 4.1
Porcentaje de grasa corporal	23.7 $\pm$ 6.4
Glucosa sanguínea en ayuno (mg/dL)	82.5 $\pm$ 5.7
Insulina en ayuno (mU/L)	11.89 $\pm$ 2.4
HOMA-IR	2.6 $\pm$ 0.7
Colesterol total (mg/dL)	169.8 $\pm$ 11.2
Triglicéridos totales (mg/dL)	124.3 $\pm$ 16.8

**Abreviaturas:** IMC, índice de masa corporal; HOMA-IR, modelo homeostático de evaluación del índice de resistencia a la insulina.

## 9.2 Eficiencia de la purificación

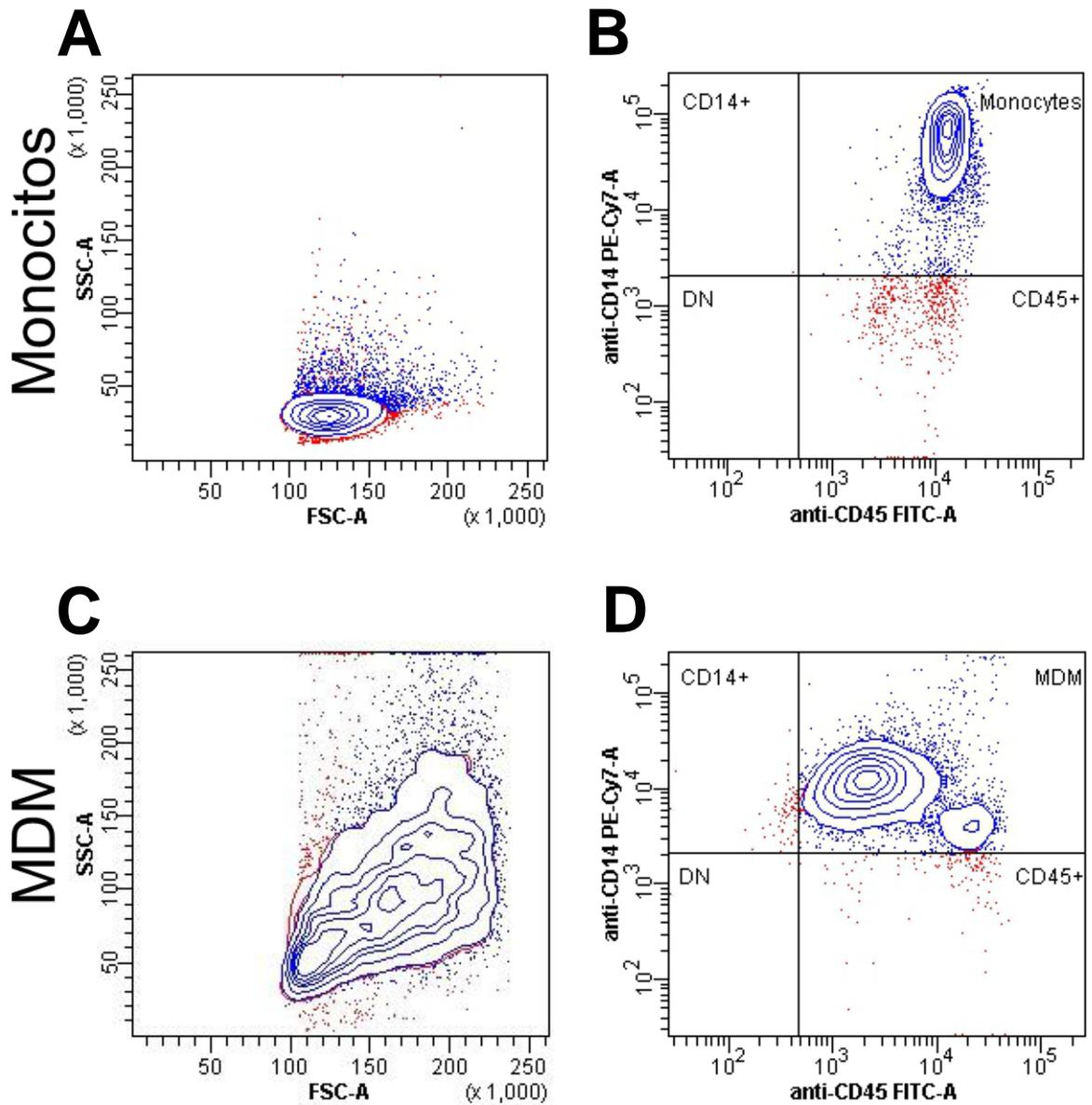
Las células obtenidas después de la separación por gradiente de Ficoll y selección por columna magnética, fueron categorizados como monocitos  $CD45^+CD14^+$  con pureza de más del 95% (Fig.1). Estos monocitos presentaban adherencia a la placa del cultivo y morfología esférica al microscopio. Por otro lado, los monocitos purificados mostraron menor tamaño y menor complejidad con respecto a lo observado en los MDM, después de 6 días de diferenciación en presencia de M-CSF e IL-3 (Fig. 2A y C; 3A-B). Adicionalmente, la expresión de los marcadores de linaje CD45 (tirosina-fosfatasa expresada en todos los leucocitos) y CD14 (co-receptor de TLR4) es menor en monocitos con respecto a los MDM (Fig. 2B y D).



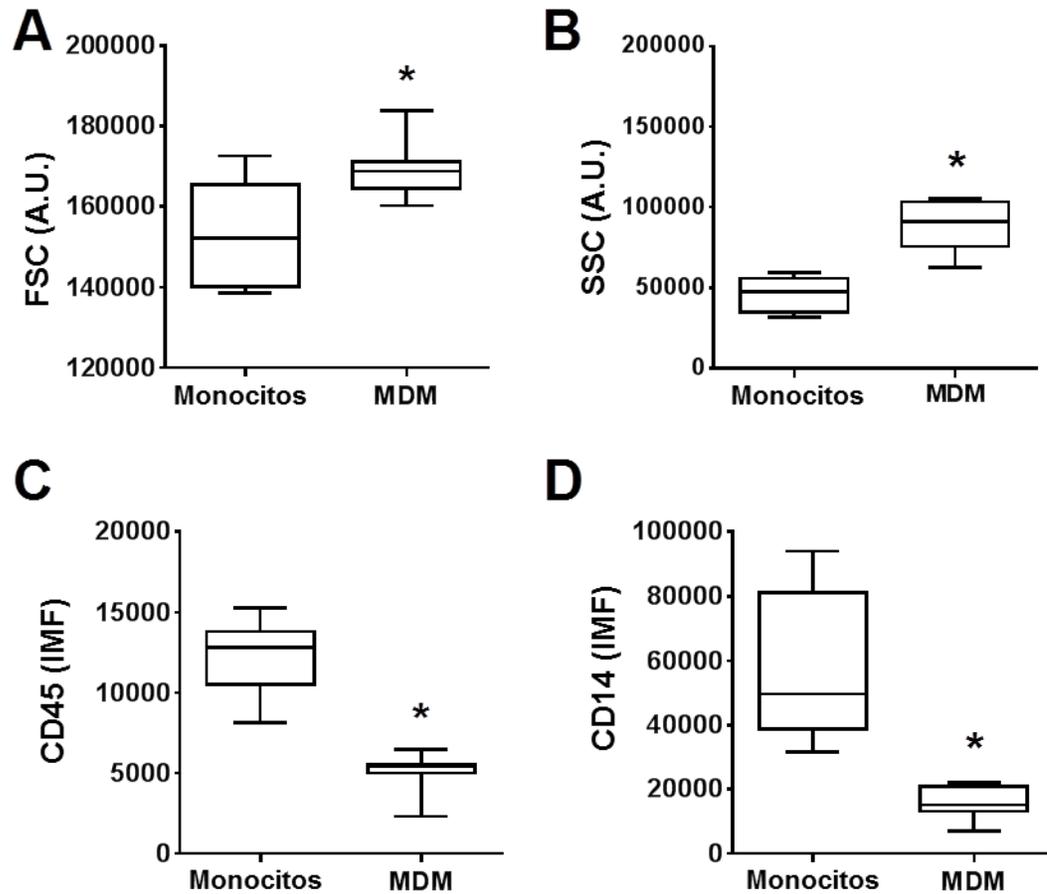
**Figura 1. Eficiencia de la purificación.** Porcentaje de células  $CD45^+CD14^+$  después de la separación por gradiente de Ficoll y selección negativa por columnas magnéticas.

### **9.3 Cambios morfológicos e inmunofenotípicos en la diferenciación**

Las diferencias morfológicas e inmunofenotípicas entre los monocitos obtenidos de los extractos leucocitarios y los MDM son los parámetros típicos que se atribuyen a la diferenciación de monocito a macrófago. En los MDM se puede observar el aumento de tamaño y granularidad con respecto a los monocitos, así como la disminución de la expresión de CD14 (Fig. 2). De manera interesante, la expresión de CD45 también disminuye en MDM con respecto a monocitos, lo cual está en concordancia con estudios previos que indican que la fosfatasa CD45 regula negativamente la diferenciación del monocito a macrófago (Deszo et al., 2001). Para asegurar que los cambios morfológicos e inmunofenotípicos observados en las gráficas de citometría de flujo no fueran debidos a la apreciación subjetiva del observador, llevamos a cabo pruebas estadísticas de los datos obtenidos. Al realizar las pruebas estadísticas correspondientes observamos que las diferencias observadas son estadísticamente significativas en todos los grupos analizados (Fig. 3).



**Figura 2. Comparación morfológica entre monocitos y MDM.** Los monocitos presentan menor tamaño y complejidad celular (A), Así como la mayor expresión de CD45 y CD14 (B) con respecto a los MDM que aunque son de mayor tamaño y granularidad (C) expresan niveles más bajos de CD45 y CD14 (D).

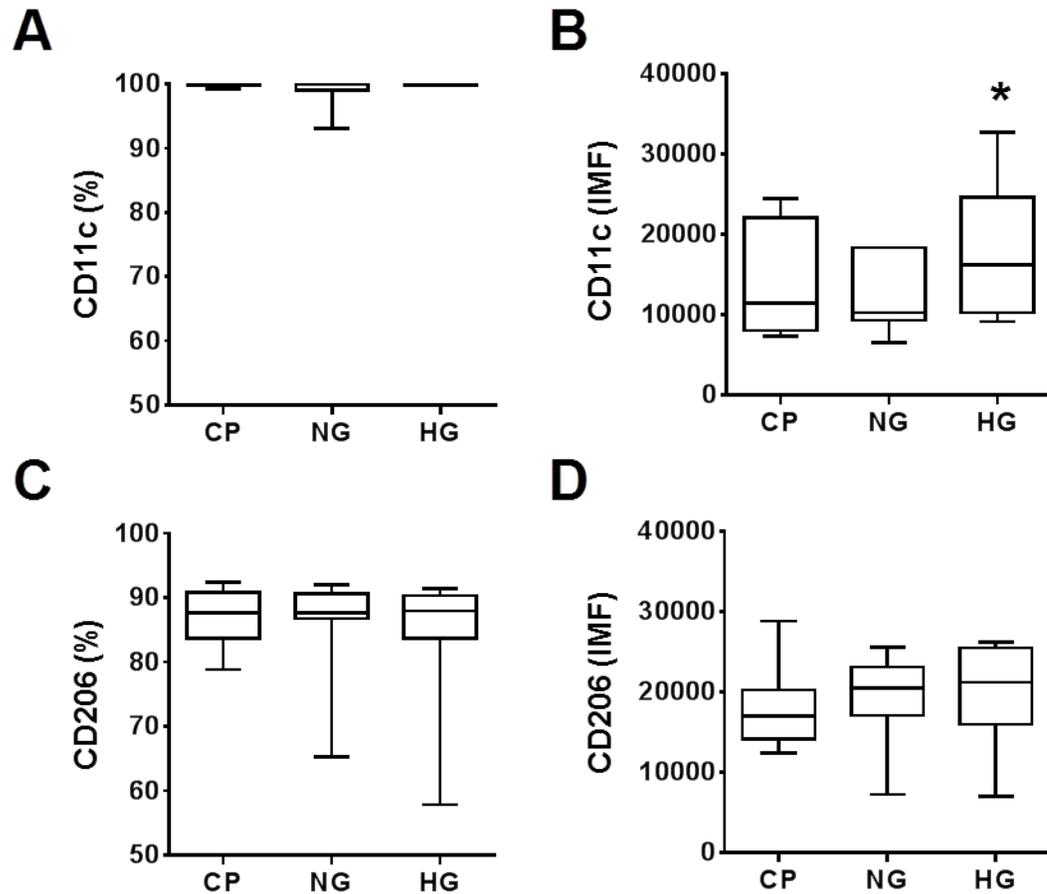


**Figura 3. Análisis estadístico de las diferencias morfológicas e inmunofenotípicas entre monocitos y MDM.** Los monocitos presentan menor tamaño y complejidad celular (A), así como la mayor expresión de CD45 y CD14 (B) con respecto a los MDM, que aunque son de mayor tamaño y granularidad (C) expresan niveles más bajos de CD45 y CD14 (D). a) P= 0.0101, b) P= 0.0010, c) P= 0.0078, d) P= 0.0019

#### **9.4 Marcadores inmunofenotípicos**

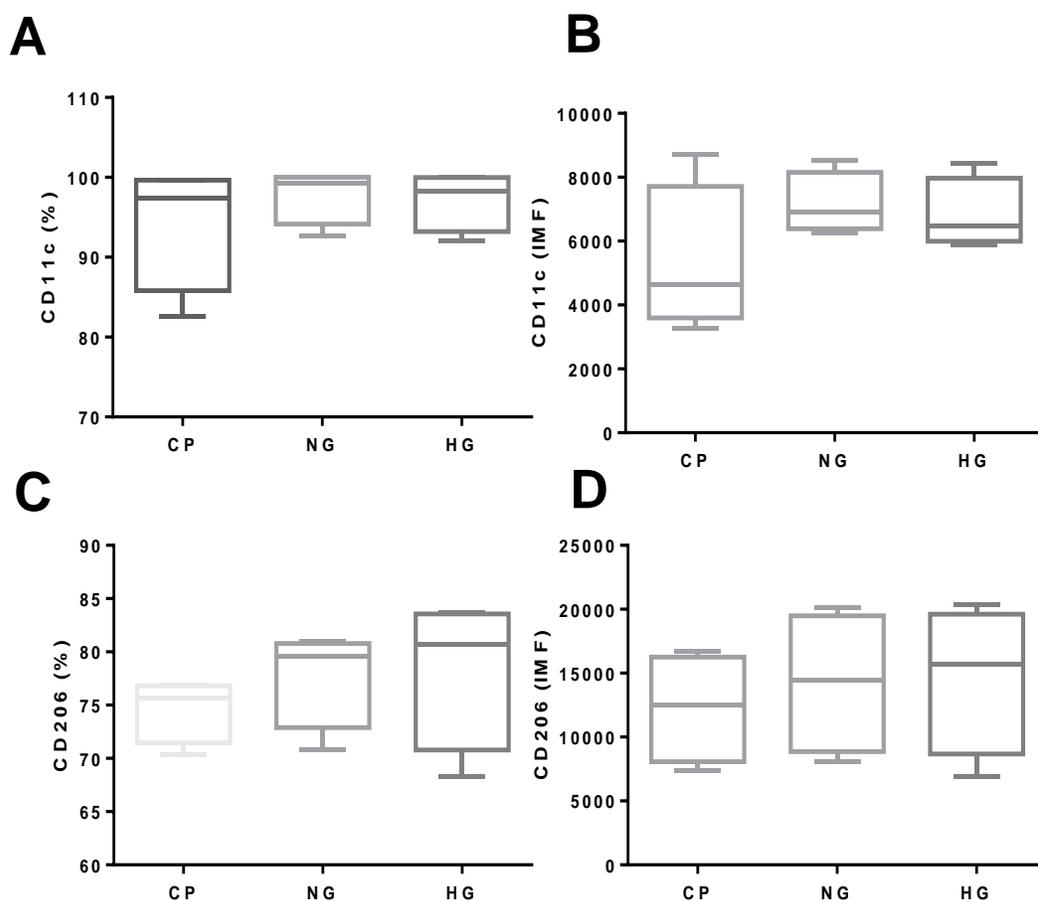
El 100% de los MDM expresan CD11c, independientemente de la concentración de glucosa en la que fueron cultivados (Fig. 4A). Sin embargo, de manera interesante existen diferencias en la intensidad con la que los MDM expresan esta integrina de membrana, dependiendo del nivel de glucosa presente en el medio. Los macrófagos cultivados en condiciones de altas concentraciones de glucosa poseen intensidad media de fluorescencia en CD11c 1.5 veces mayor que en las células expuestas a concentraciones fisiológicas de glucosa, en ausencia de estímulos de activación como INF- $\gamma$  ó IL-4/IL-13 (Fig. 4B). No se observaron diferencias significativas en la intensidad media de fluorescencia de CD11c como consecuencia del aumento de la presión osmótica (Fig. 4B). Esto sugiere que los MDM expresan mayor número de moléculas de CD11c en su superficie cuando se les expone a concentraciones elevadas de glucosa.

El marcador CD206 se expresa en el 86-90% de los MDM. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de MDM positivos para CD206 entre las condiciones de concentraciones elevadas y normales de glucosa (Fig. 4C). De manera contrastante a lo que ocurre con CD11c, no se observan diferencias significativas en la intensidad de la expresión de CD206 como consecuencia de la exposición de los MDM a concentraciones elevadas de glucosa (Fig. 4D).



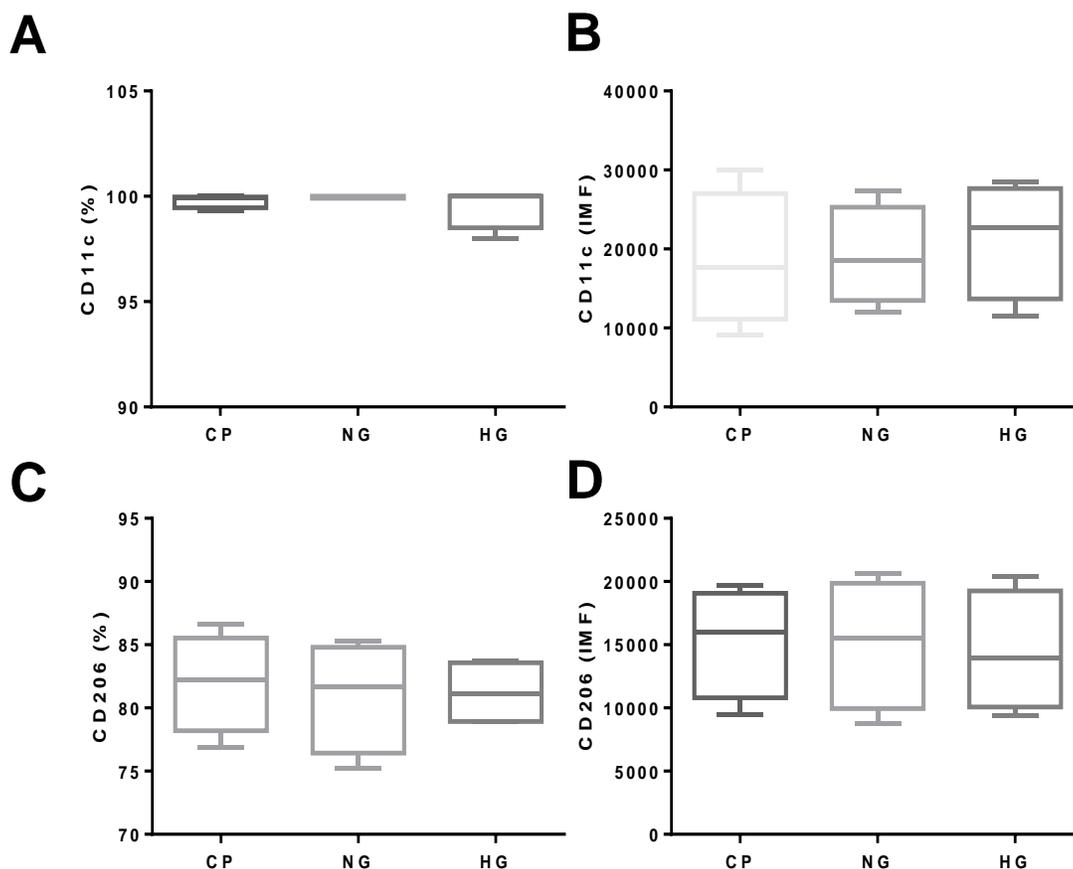
**Figura 4. Caracterización inmunofenotípica de MDM cultivados en concentraciones normales y elevadas de glucosa.** La expresión de CD11c se analizó de acuerdo al porcentaje de células que expresaron dicho marcador (A), así como por la intensidad media de fluorescencia del mismo (B). Se observa la mayor intensidad media de fluorescencia de CD11c en MDM cultivados en concentraciones elevadas de glucosa con respecto a los controles (B). No existen diferencias significativas en la expresión de CD206 en MDM cultivados en concentraciones fisiológicas y elevadas de glucosa (D). CP = Control de Presión osmótica; NG = 5.5 mM de Glucosa; HG = 15 mM de Glucosa. \*P= 0.0020

Cuando las células se estimularon con  $\text{INF-}\gamma$  no se observaron diferencias significativas en la intensidad de la expresión de los marcadores CD11c y CD206 (B y D), ni en el porcentaje de macrófagos que los expresan (A y C) en respuesta a concentraciones elevadas de glucosa (Fig. 5).



**Figura 5. Caracterización inmunofenotípica de MDM cultivados en concentraciones normales y elevadas de glucosa en presencia de  $\text{INF-}\gamma$ .** La expresión de CD11c se analizó de acuerdo al porcentaje de células que expresaron dicho marcador (A), así como por la intensidad media de fluorescencia del mismo (B), sin encontrar diferencias significativas. No se observaron diferencias significativas en la expresión de CD206 (D), ni en el porcentaje de células que lo expresan (C).  
 CP = Control de Presión osmótica; NG = 5.5 mM de Glucosa; HG = 15 mM de Glucosa.

De igual manera, cuando los MDM fueron expuestos IL-4 e IL-13 no se observaron diferencias significativas en la intensidad de la expresión de los marcadores CD11c y CD206 (B y D), ni en el porcentaje de macrófagos que los expresan (A y C) en respuesta a concentraciones elevadas de glucosa (Fig. 6).



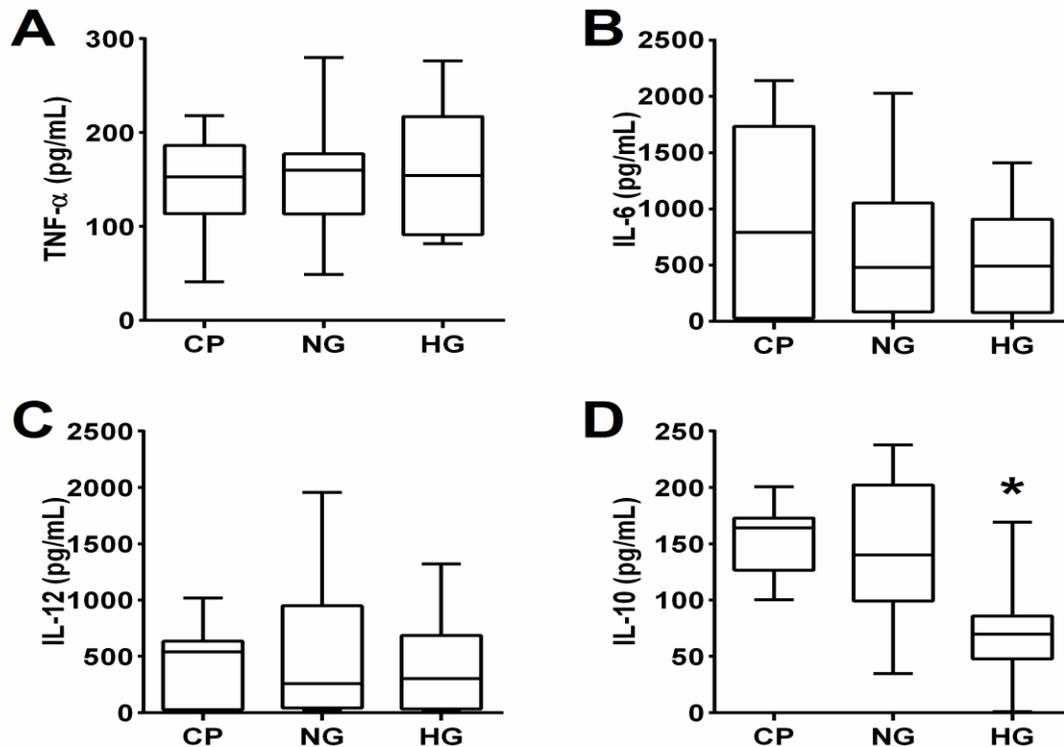
**Figura 6. Caracterización inmunofenotípica de MDM cultivados en concentraciones normales y elevadas de glucosa en presencia de IL-4 e IL-13.**

La expresión de CD11c se analizó de acuerdo al porcentaje de células que expresaron dicho marcador (A), así como por la intensidad media de fluorescencia del mismo (B), sin encontrar diferencias significativas. No se observaron diferencias significativas en la expresión de CD206 (D), ni en el porcentaje de células que lo expresan (C).

CP = Control de Presión osmótica; NG = 5.5 mM de Glucosa; HG = 15 mM de Glucosa.

## 9.5 Producción de citocinas

Después de 3 días en cultivo, no se observaron diferencias significativas en la producción de las citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 en respuesta a concentraciones elevadas de glucosa (Fig. 7A-C). En contraste, se observa la disminución significativa en la síntesis de IL-10 en MDM expuestos a altas concentraciones de glucosa con respecto a MDM cultivados en concentraciones normales de glucosa (Fig. 7D). No se observan diferencias significativas en la producción de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 e IL-10 como consecuencia del aumento de la presión osmótica en el cultivo.

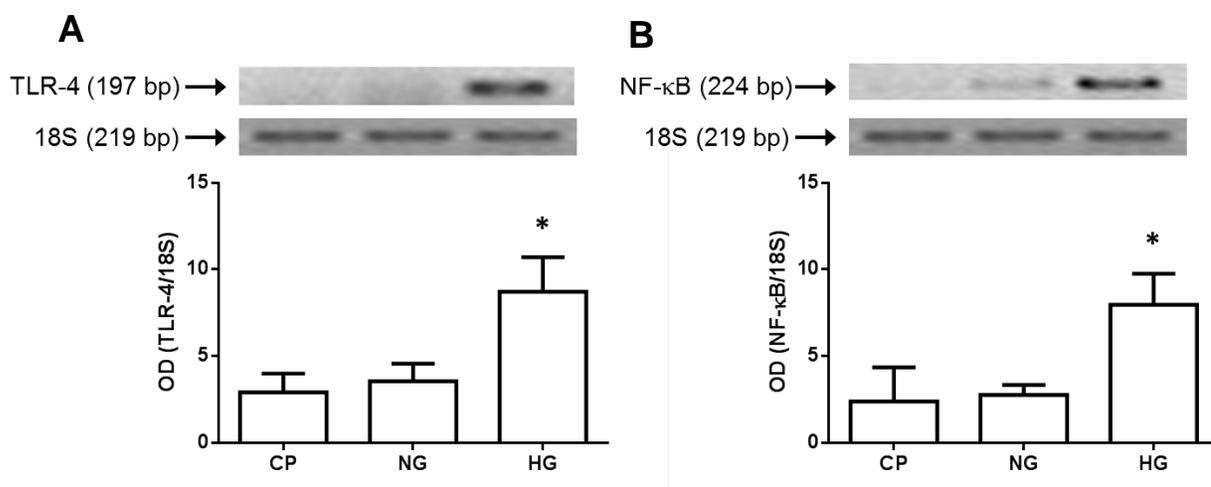


**Figura 7. Efecto de las concentraciones elevadas de glucosa en la producción de citocinas en MDM.** La producción de citocinas como TNF- $\alpha$  (A), IL-6 (B) o IL-12 (C) no se modificó con la exposición a altas concentraciones de glucosa. Sin embargo, se observa la disminución significativa en la producción de IL-10 en MDM expuestos a concentraciones elevadas de glucosa (D).

CP = Control de Presión osmótica; NG = 5.5 mM de Glucosa; HG = 15 mM de Glucosa. \*P= 0.0010

## 9.6 Perfil de expresión génica

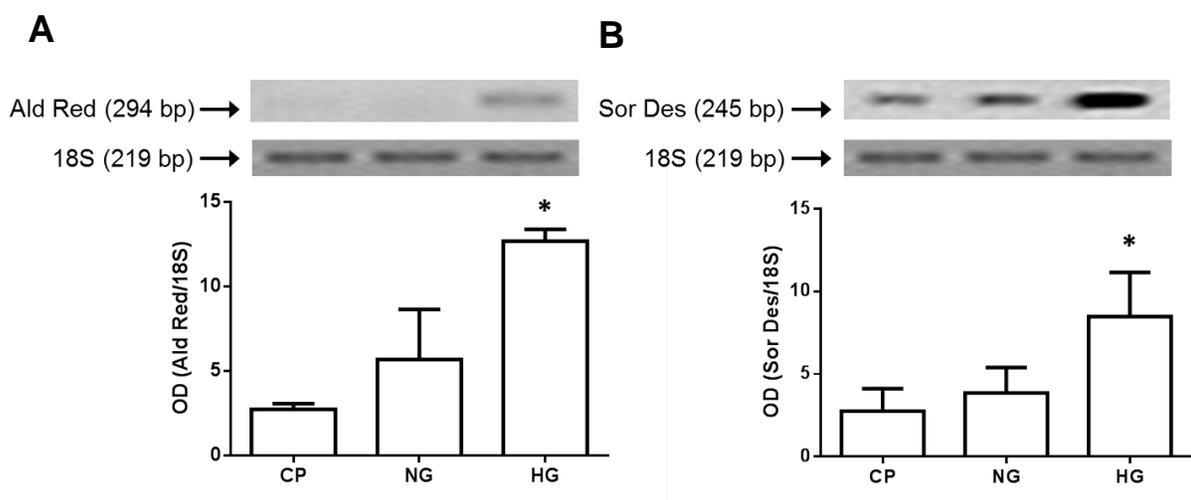
Los MDM cultivados en presencia de concentraciones elevadas de glucosa muestran expresión de TLR4 y NF $\kappa$ B 2.5 veces mayor con respecto a MDM cultivados en concentraciones normales de este azúcar (Fig. 8). Este podría ser indicio de que los elementos que constituyen las vías de señalización TLR4/NF $\kappa$ B se sobre-expresan en MDM expuestos a concentraciones elevadas de glucosa. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en la expresión de TLR4 y NF $\kappa$ B como consecuencia del aumento de la presión osmótica en el cultivo.



**Figura 8. Expresión de TLR4 y NF $\kappa$ B en MDM expuestos a concentraciones normales y elevadas de glucosa.** La expresión de TLR4 y NF $\kappa$ B se incrementó en MDM en respuesta a las altas concentraciones de glucosa (A y B). CP = Control de Presión osmótica; NG = 5.5 mM de Glucosa; HG = 15 mM de Glucosa. \*P<0.001

En el mismo sentido, se ha reportado que el mayor flujo de glucosa al interior de la célula puede ser metabolizado por la vía del poliol, contribuyendo al estrés reticular y a la producción de especies reactivas de oxígeno. Por lo tanto, nosotros quisimos estudiar si las enzimas que constituyen esta vía se sobre expresan a nivel de RNA

ensajero en MDM en respuesta a concentraciones elevadas de glucosa. Nuestros resultados muestran que los MDM expuestos a concentraciones elevadas de glucosa exhiben incremento significativo en la expresión de la aldosa reductasa (Ald Red, Fig. 9A) y la sorbitol deshidrogenasa (Sor Des, Fig. 9B) en comparación con MDM cultivados en presencia de concentraciones fisiológicas de glucosa. Como en ocasiones anteriores, no se observaron diferencias significativas en la expresión de estas dos enzimas como consecuencia del aumento de la presión osmótica en el cultivo.



**Figura 9. Expresión de aldosa reductasa y sorbitol deshidrogenasa en MDM expuestos a concentraciones normales y elevadas de glucosa.** La expresión de aldosa reductasa (Ald Red) y sorbitol deshidrogenasa (Sor Des) se incrementó en MDM cultivados en concentraciones elevadas de glucosa (A y B). CP = Control de Presión osmótica; NG = 5.5 mM de Glucosa; HG = 15 mM de Glucosa. \*P<0.001

## X. DISCUSIÓN

A pesar de que existen diversas formas de diferenciar *in vitro* monocitos a macrófagos, en este estudio empleamos la diferenciación inducida con M-CSF. Lo anterior radica en el hecho de que la diferenciación con M-CSF provee a los macrófagos un fenotipo más parecido a M2, reproduciendo lo que ocurre *in vivo* con los macrófagos residentes de tejido vascular, adiposo y hepático en ausencia de patógenos (Gleissner CA., 2012a). Por el contrario, la diferenciación con otras citocinas como GM-CSF origina macrófagos de fenotipo más parecido a M1. Esta diferenciación simula lo que ocurre cuando el monocito es expuesto a patógenos, originando un fenotipo pro-inflamatorio exacerbado (Gleissner CA., 2012a). Por lo tanto, los MDM utilizados en este estudio poseían fenotipo parecido al que exhiben los macrófagos residentes de tejidos biológicos cuya función primordial es contener procesos inflamatorios exacerbados.

Después de seis días de diferenciación con el estímulo antes mencionado, los monocitos sufren cambios morfológicos e inmunofenotípicos. Estos cambios se asocian precisamente al proceso a través del cual el monocito se diferenciará a macrófago, e incluyen el aumento del tamaño y la granularidad celular. Sin embargo, estos cambios no se limitan a aspectos puramente morfológicos, sino que además incluyen la expresión de marcadores inmunofenotípicos de superficie celular. El cambio inmunofenotípico más conocido de la diferenciación de los monocitos hacia macrófagos es la reducción en la expresión de CD14. En efecto, nuestros resultados indicaron que los MDM mostraron la disminución significativa en el nivel de síntesis de CD14 con respecto a los monocitos. Además, de manera interesante observamos

la disminución en la expresión de CD45. La reducción en la expresión de la tirosinafosfatasa CD45 podría ser un factor que favorezca la diferenciación de monocitos a macrófagos, ya que se ha reportado que CD45 regula negativamente este proceso (Deszo et al., 2001). Hasta la fecha no hemos encontrado ningún reporte que denote específicamente la reducción en la expresión de CD45 durante el proceso de diferenciación del monocito; sin embargo, este es un tema relevante en términos de la ontogenia y la maduración de este tipo celular y requiere de mayor investigación.

Una vez que confirmamos la diferenciación de monocitos humanos a macrófagos en cultivo, el siguiente paso fue identificar marcadores inmunofenotípicos de la polarización del macrófago hacia M1 o M2. Estudios previos han reportado que la expresión de CD11c se incrementa 3.4 veces en cultivo, debido al aumento de la capacidad adherente de esta célula (Georgakopoulos et al., 2008). Lo anterior podría ser una de las razones por las que en este estudio prácticamente todos los MDM expresan CD11c. Por otro lado, el hecho de que los MDM expresen con mayor intensidad CD11c nos indica que estas células poseen orientación más marcada hacia el fenotipo clásico de activación. De manera interesante, cuando los MDM fueron expuestos a niveles elevados de glucosa por tres días la intensidad en la expresión de CD11c aumentó considerablemente. En este sentido, trabajos previos han demostrado que durante la hiperglucemia postprandial los monocitos humanos de sangre periférica incrementan la expresión de CD11c, lo cual posee correlación con el aumento en la capacidad adherente de esta célula vía VCAM-1 (Gower et al., 2011). Es importante mencionar que además de ser un marcador de activación clásica en macrófagos, CD11c es una integrina que promueve la interacción entre esta célula y el tejido endotelial de los vasos sanguíneos. Es

probable entonces que las altas concentraciones de glucosa favorezcan la capacidad adherente de los macrófagos o su direccionamiento y reclutamiento a tejido vascular, a través de la sobre-expresión de moléculas como CD11c.

En contraste, en este estudio no observamos efecto significativo de las altas concentraciones de glucosa sobre la expresión de CD206, un marcador típico de activación alternativa en macrófagos. En este sentido es importante considerar la duración de la exposición de los MDM a las concentraciones elevadas de glucosa. Nuestros cultivos tuvieron duración de 78 horas, lo que hace probable que al aumentar el periodo de exposición a los niveles altos de glucosa de 3 a 6 o 9 días podamos observar efecto sobre la expresión de CD206. Por lo tanto, es necesario realizar curvas temporales con la finalidad de aumentar el periodo de exposición de los MDM a las concentraciones elevadas de glucosa y esclarecer si existe o no efecto de este azúcar sobre la expresión de CD206 y otros marcadores de activación M2 en macrófagos humanos.

Cuando se caracteriza el efecto de una sustancia sobre una célula inmunológica, es necesario realizar ensayos que evalúen no únicamente el inmunofenotipo de esta célula sino también su funcionalidad. En este sentido, mediante la técnica de ELISA determinamos los niveles de distintas citocinas que son producidas como consecuencia de la polarización del macrófago hacia el estado de activación clásico o alternativo. Nuestros resultados indican claramente que los MDM cultivados en concentraciones elevadas de glucosa muestran la disminución significativa en la producción de IL-10, lo cual sugiere la pérdida progresiva de la capacidad inmunoreguladora de estas células. Lo anterior es concordante con lo reportado en estudios *ex vivo* en donde macrófagos de la placa aterosclerótica

muestran la disminución en la síntesis de IL-10 en pacientes con estado hiperglucémico marcado (Sato et al., 2013). Dado que la IL-10 puede favorecer de manera autócrina y parácrina la polarización de los macrófagos hacia el fenotipo M2 (Gleissner CA., 2012a), la disminución en la producción de esta citocina podría estar asociada con mayor polarización del macrófago hacia el fenotipo M1. Sin embargo, en este estudio no observamos el aumento en los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 en MDM expuestos a concentraciones elevadas de glucosa. Considerando estos resultados, nosotros hipotetizamos que durante el estado hiperglucémico primero ocurre la pérdida de la capacidad anti-inflamatoria del macrófago (denotada por la menor producción de IL-10) y en ausencia de esta señal inmunoreguladora podría entonces presentarse el aumento en la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-6. El esclarecimiento de esta intrigante hipótesis requiere una vez más la realización de cultivos de MDM humanos con exposición más prolongada a las altas concentraciones de glucosa.

Una vez que determinamos el inmunofenotipo de los macrófagos y su funcionalidad en la producción de citocinas, decidimos estudiar el posible mecanismo a través del cual los niveles elevados de glucosa podrían inducir el aumento en la síntesis de CD11c y la disminución en la producción de IL-10 en estas células. De manera interesante, nuestros hallazgos indican que en respuesta a condiciones de alta glucosa existe la expresión aumentada del mensajero de ARN de NF $\kappa$ B y TLR4, sugiriendo la posible activación de esta cascada inflamatoria en el macrófago. De esta manera, es probable que el estímulo pro-inflamatorio pudiera ser dado por la vía de receptores de superficie como TLR4 y RAGE, lo cual derivaría en

la activación de NF $\kappa$ B y restringiría el proceso de activación alternativa en MDM expuestos a concentraciones elevadas de glucosa. Sin embargo, es necesario evaluar las formas activas de estos receptores y factores de transcripción con la finalidad de esclarecer su papel en la pérdida de la activación anti-inflamatoria del macrófago durante la hiperglucemia.

Por otro lado, como ya se ha señalado existe otro mecanismo que potencialmente podría estar involucrado en las alteraciones que los MDM presentan como consecuencia de su exposición a concentraciones elevadas de glucosa. Este mecanismo es la activación de la vía del poliol, descrita ampliamente en células endoteliales. La vía del poliol está encargada de convertir aldehídos peligrosos a alcoholes, tomando glucosa del medio intracelular para convertirla en sorbitol y posteriormente fructosa. En condiciones de concentraciones elevadas de glucosa, existe el incremento en el flujo de este azúcar al interior de la célula. El aumento en la concentración intracelular de glucosa es capaz de activar la vía del poliol a través de enzimas como la aldosa reductasa, quien está encargada de convertir glucosa en sorbitol. La acumulación de sorbitol en el interior de la célula endotelial genera mal plegamiento de proteínas, así como liberación de radicales libres y citocinas inflamatorias (Piarulli et al., 2013). Con la finalidad de reducir la concentración de sorbitol intracelular y evitar que la célula entre en apoptosis, diversas enzimas como la sorbitol deshidrogenasa son activadas. Todo este planteamiento es muy interesante debido a que en este estudio observamos que la expresión de las enzimas aldosa reductasa y sorbitol deshidrogenasa se ve aumentada en macrófagos expuestos a altas concentraciones de glucosa. Por lo tanto, es factible pensar que los macrófagos expuestos al mayor flujo intracelular de glucosa podrían

perder su capacidad anti-inflamatoria debido a la activación de la vía del poliol. Sin embargo, estos resultados no son concluyentes ya que el nivel de aldosa reductasa y sorbitol deshidrogenasa se estudió a través de RT-PCR, técnica que nos permite evaluar la expresión de los genes codificantes para las proteínas antes mencionadas. Por lo tanto, es necesario evaluar a nivel de proteína y actividad enzimática si la vía del poliol juega un papel en la inducción del fenotipo inflamatorio o la restricción de la activación anti-inflamatoria en macrófagos sometidos a niveles elevados de glucosa.

El aumento de la expresión de moléculas de adhesión y la pérdida de la capacidad anti-inflamatoria en macrófagos expuestos a concentraciones altas de glucosa podría ser especialmente relevante en el contexto de la aterogénesis y la aterosclerosis asociada con la hiperglucemia. En este sentido, existen reportes que indican que la administración de metformina (una droga anti-hiperglucemiante) limita la formación de células espumosas (células derivadas de macrófagos inflamatorios) asociadas al ateroma. Además, el control adecuado de la glucemia se ha asociado con la disminución en la activación pro-inflamatoria de macrófagos humanos infiltrados en la placa aterosclerótica (Wan et al., 2013). Por esta razón, consideramos sumamente relevante estudiar el efecto que la hiperglucemia posee sobre la activación inflamatoria o anti-inflamatoria del macrófago. Lo cual podría generar en el futuro cercano, nuevos blancos terapéuticos encaminados en la disminución del daño a tejido vascular observado en pacientes diabéticos.

## XI. CONCLUSIONES

1. Las concentraciones elevadas de glucosa inducen el aumento en la expresión de CD11c en macrófagos derivados de monocitos *in vitro*.
2. Las concentraciones elevadas de glucosa inducen la disminución en la producción de IL-10 en macrófagos derivados de monocitos *in vitro*.
3. Las concentraciones elevadas de glucosa inducen el aumento en la expresión de TLR4 y NF $\kappa$ B en macrófagos derivados de monocitos *in vitro*, lo cual sugiere la participación de esta vía de señalización en la pérdida de la capacidad inmunoreguladora de estas células.
4. Las concentraciones elevadas de glucosa inducen el aumento en la expresión de las enzimas aldosa reductasa y sorbitol deshidrogenasa en macrófagos derivados de monocitos *in vitro*, lo cual sugiere la participación de esta vía metabólica en la pérdida de la capacidad inmunoreguladora de estas células.
5. Las concentraciones elevadas de glucosa parecen estar asociadas con la polarización del macrófago hacia el fenotipo pro-inflamatorio y, al mismo tiempo, la restricción del fenotipo anti-inflamatorio.

## **XII. PERSPECTIVAS**

El presente trabajo demuestra que la exposición a concentraciones elevadas de glucosa induce la pérdida de la capacidad inmunoreguladora de macrófagos humanos, favoreciendo potencialmente el fenotipo inflamatorio en estas células. La activación inflamatoria del macrófago contribuye en el daño a distintos tejidos durante la hiperglucemia y la DM2. Sin embargo el mecanismo a través del cual esto ocurre no ha sido completamente dilucidado. Los resultados obtenidos en este estudio podrían sentar las bases para determinar las posibles vías de activación inflamatoria en macrófagos sometidos al estado hiperglucémico. Para esto, sería conveniente evaluar la influencia de la vía de señalización RAGE-NF $\kappa$ B y TLR4-NF $\kappa$ B en la activación pro-inflamatoria de macrófagos, mediante el bloqueo de las interacciones AGE/RAGE y AGE/TLR4 con anticuerpos neutralizantes. Además, sería también factible estudiar la participación de la vía del poliol mediante la inhibición farmacológica de la aldosa reductasa y la evaluación de los niveles de glutatión y malondialdehído en macrófagos expuestos a concentraciones elevadas de glucosa.

### **XIII. REFERENCIAS**

- Ahlqvist E, Ahluwalia TS, Groop L. Genetics of type 2 diabetes. *Clin Chem.* 2011; 57: 241-254.
- Akirav E.M., Preston-Hurlburt P., Garyu J., Henegariu O., Clynes R., Schmidt A.M., Herold K.C. RAGE expression in human T cells: a link between environmental factors and adaptive immune responses. *PloS One.* 2012; 7: e34698.
- Aldini G, Vistoli G, Stefek M, Chondrogianni N, Grune T, Sereikaite J, Sadowska-Bartosz I, Bartosz G. Molecular strategies to prevent, inhibit, and degrade advanced glycoxidation and advanced lipoxidation end products. *Free Radic Res.* 2013; 47: 93-137.
- Audouze K, Brunak S, Grandjean P. A computational approach to chemical etiologies of diabetes. *Sci Rep.* 2013; 3: 2712.
- Balgoma D, Astudillo AM, Perez-Chacon G, Montero O, Balboa MA, Balsinde J. Markers of monocyte activation revealed by lipidomic profiling of arachidonic acid-containing phospholipids. *J Immunol.* 2010; 184: 3857-3865.
- Bassi R, Trevisani A, Tezza S, Ben Nasr M, Gatti F, Vergani A, Farina A, Fiorina P. Regenerative therapies for diabetic microangiopathy. *Exp Diabetes Res.* 2012; 2012: 916560.
- Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept *Cardiovasc Res.* 1998; 37: 586-600.

- Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, Stern DM, Nawroth PP. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med.* 2005; 83: 876-886.
- Bouhlef MA, Derudas B, Rigamonti E, Dievart R, Brozek J, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Torpier G, Marx N, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative m2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab.* 2007;6: 137-143.
- Boyle JJ, Johns M, Lo J, Chiodini A, Ambrose N, Evans PC, Mason JC, Haskard DO. Heme induces heme oxygenase 1 via nrf2: role in the homeostatic macrophage response to intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31: 2685-2691.
- Bradshaw EM, Raddassi K, Elyaman W, Orban T, Gottlieb PA, Kent SC, Hafler DA. Monocytes from patients with type 1 diabetes spontaneously secrete proinflammatory cytokines inducing Th17 cells. *J Immunol.* 2009; 183: 4432-4439
- Brender JR, Krishnamoorthy J, Messina GM, Deb A, Vivekanandan S, La Rosa C, Penner-Hahn JE, Ramamoorthy A. Zinc stabilization of prefibrillar oligomers of human islet amyloid polypeptide. *Chem Commun (Camb).* 2013; 49: 3339-3341.
- Brett J, Schmidt AM, Zou YS, Yan SD, Weidman E, Pinsky DJ, Nepper M, Przysiecki M, Shaw A, Migheli A, Stern DM. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol.* 1993; 143: 1699-1712.

- Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005; 54: 1615-1625.
- Brunetti A, Chiefari E, Foti D. Recent advances in the molecular genetics of type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes*. 2014; 5: 128-140.
- Buczynski MW, Dumlao DS, Dennis EA. Thematic Review Series: Proteomics. An integrated omics analysis of eicosanoid biology. *J Lipid Res*. 2009; 50: 1015-1038.
- Chambers KT, Unverferth JA, Weber SM, Wek RC, Urano F, Corbett JA. The role of nitric oxide and the unfolded protein response in cytokine-induced beta-cell death. *Diabetes*. 2008; 57: 124-132.
- Chaturvedi N. The burden of diabetes and its complications: trends and implications for intervention. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007; 76: S3-S12.
- Chavakis T, Bierhaus A, Al-Fakhri N, Schneider D, Witte S, Linn T, Nagashima M, Morser J, Arnold B, Preissner KT, Nawroth PP. The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *J Exp Med*. 2003; 198: 1507-1515.
- Chen Y, Akirav EM, Chen W, Henegariu O, Moser B, Desai D, Shen JM, Webster JC, Andrews RC, Mjalli AM, Rothlein R, Schmidt AM, Clynes R, Herold KC. RAGE ligation affects T cell activation and controls T cell differentiation. *J Immunol (Baltimore, MD)*. 2008; 181: 4272-4278.
- Cho HJ, Shashkin P, Gleissner CA, Dunson D, Jain N, Lee JK, Miller Y, Ley K. Induction of dendritic cell-like phenotype in macrophages during foam cell formation. *Physiol Genomics*. 2007;29: 149-160.

- Cho SJ, Roman G, Llevan F, Konishi Y. The road to advanced glycation end products; a mechanistic perspectiva. *Curr Med Chem.* 2007; 14: 1653-1671.
- Cipolletta C, Ryan KE, Hanna EV, Trimble ER. Activation of peripheral blood CD14+ monocytes occurs in diabetes. *Diabetes.* 2005; 54: 2779-2786.
- Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ, Lin JK, Farzadfar F, Khang YH, Stevens GA, Rao M, Ali MK, Riley LM, Robinson CA, Ezzati M; Global Burden of metabolic Risk Factors of Chornic Diseases Collaborating Group (Blood Glucose). National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet.* 2011; 378: 31-40.
- Dattilo BM, Fritz G, Leclerc E, Kooi CWV, Heizmann CW, Chazin WJ. The extracelular región of the receptor for advanced glycation end products is composed of two independent structural units. *Biochemistry.* 2007; 46: 6957-6970.
- de Villiers WJ, Smith JD, Miyata M, Dansky HM, Darley E, Gordon S. Macrophage phenotype in mice deficient in both macrophage-colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein e. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18: 631-640.
- Deszo EL, Brake DK, Cengel KA, Kelley KW, Freud GG. CD45 negatively regulates monocytic cell differentiation by inhiting phorbol 12-myristate 13-acetate-dependent activation ant tyrosine phosphorylation of protein kinase Cdelta. *J Biol Chem.* 2001; 276: 10212-10217.

- Devaraj S, Glaser N, Griffen S, Wang-Polagruto J, Miguelino E, Jialal I. Increased monocytic activity and biomarkers of inflammation in patients with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2006; 55: 774-779.
- Devaraj S, Jialal I. Low-density lipoprotein postsecretory modification, monocyte function, and circulating adhesion molecules in type 2 diabetic patients with and without macrovascular complications: the effect of  $\alpha$ -tocopherol supplementation. *Circulation*. 2000; 102: 191-196.
- Díaz-Muñoz MD, Osma-García IC, Fresno M, Iñiguez MA. Involvement of PGE2 and the cAMP signalling pathway in the up-regulation of COX-2 and mPGES-1 expression in LPS-activated macrophages. *Biochem J*. 2012; 443: 451-461.
- Díaz-Muñoz MD, Osma-García IC, Fresno M, Iñiguez MA. Involvement of PGE2 and the cAMP signalling pathway in the up-regulation of COX-2 and mPGES-1 expression in LPS-activated macrophages. *Biochem J*. 2012; 443: 451-461.
- Doria A, Patti ME, Kahn CR. The emerging genetic architecture of type 2 diabetes. *Cell Metab*. 2008; 8: 186-200.
- Dumitriu IE, Baruah P, Valentinis B, Voll RE, Herrmann M, Nawroth PP, Arnold B, Bianchi ME, Manfredi AA, Rovere-Querini P. Release of high mobility group box 1 by dendritic cells controls T cell activation via the receptor for advanced glycation end products. *J Immunol (Baltimore, MD)*. 2005; 174: 7506-7515.

- Dungan KM, Braithwaite SS, Preiser JC. Stress hyperglycemia. *Lancet*. 2009; 373: 1798-1807.
- Dyer DG, Dunn JA, Thorpe SR, Lyons TJ, McCance DR, Baynes JW. Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *Ann N Y Acad Sci*. 1992; 663: 421-422.
- Engerman RL, Kern TS, Larson ME. Nerve conduction and aldose reductase inhibition during 5 years of diabetes or galactosaemia in dogs. *Diabetologia*. 1994; 37: 141-144.
- Falcone C, Bozzini S, D'Angelo A, Matrone B, Colonna A, Benzi A, Paganini EM, Falcone R, Pelissero G. Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and coronary atherosclerosis: possible correlation with clinical presentation. *Dis Markers*. 2013; 35: 135-140.
- Fernández-Miró M, Colom C, Lloveras A, Llauradó G, Chillarón JJ. Infradiagnóstico de complicaciones crónicas de la diabetes mellitus: utilidad de una revisión sistemática en una sola visita. *Endocrinol Nutr*. 2012; 59: 585-590.
- Ferreira AE, Ponces Freire AM, Voit EO. A quantitative model of the generation of N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in the Maillard reaction between collagen and glucose. *Biochem J*. 2003; 376: 109-121.
- Flegal KM, Ezzati TM, Harris MI, Haynes SG, Juarez RZ, Knowler WC, Perez-Stable EJ, Stern MP. Prevalence of diabetes in Mexican Americans, Cubans, and Puerto Ricans from the Hispanic Health and Nutrition Examination Survey, 1982-1984. *Diabetes Care*. 1991; 14: 628-638.

- Fujisaka S, Usui I, Bukhari A, Ikutani M, Oya T, Kanatani Y, Tsuneyama K, Nagai Y, Takatsu K, Urakaze M, Kobayashi M, Tobe K. Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes*. 2009; 58: 2574-2582.
- Fukuhara-Takaki K, Sakai M, Sakamoto Y, Takeya M, Horiuchi S. Expression of class A scavenger receptor is enhanced by high glucose in vitro and under diabetic conditions in vivo: one mechanism for an increased rate of atherosclerosis in diabetes. *J Biol Chem*. 2005; 280: 3355-3364.
- Gabbay KH, Merola LO, Field RA. Sorbitol pathway: presence in nerve and cord with substrate accumulation in diabetes. *Science*. 1966; 151: 209-210.
- Galkina EV, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Annu Rev Immunol*. 2009;27: 165-197.
- Georgakopoulos T, Moss ST, Kanagasundaram V. Integrin CD11c contributes to monocyte adhesion with CD11b in a differential manner and requires Src family kinase activity. *Mol Immunol*. 2008; 45: 3671-3681.
- Gleissner CA, Shaked I, Little KM, Ley K. CXC chemokine ligand 4 induces a unique transcriptome in monocyte-derived macrophages. *J Immunol*. 2010; 184: 4810-4818.
- Gleissner CA. Macrophage phenotype modulation by CXCL4 in atherosclerosis. *Front Physiol*. 2012a; 3: 1.
- Gleissner CA. Platelet-derived chemokines in atherogenesis: what's new? *Curr Vasc Pharmacol*. 2012b; 10: 563-569.

- Glomb MA, Monnier VM. Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction. *J Biol Chem.* 1995; 270: 10017-10026.
- González EL, Johansson S, Wallander MA, Rodríguez LA. Trends in the prevalence and incidence of diabetes in the UK: 1996-2005. *J Epidemiol Community Health.* 2009; 63: 332-336.
- Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5: 953-964.
- Gower RM, Wu H, Foster GA, Devarai S, Jialal I, Ballantyne CM, Knowlton AA, Simon SI. CD11c/CD18 expression is upregulated on blood monocytes during hypertriglyceridemia and enhances adhesion to vascular cell adhesion molecule-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31: 160-166.
- Greci LS, Kailasam M, Malkani S, Katz DL, Hulinsky I, Ahmadi R, Nawaz H. Utility of HbA(1c) levels for diabetes care finding in hospitalized patients with hyperglycemia. *Diabetes Care.* 2003; 26: 1064-1068.
- Greene DA, Lattimer SA, Sima AA. Sorbitol, phosphoinositides, and sodiumpotassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. *N Engl J Med.* 1987; 316: 599-606.
- Griffin E, Re A, Hamel N, Fu C, Bush H, McCaffrey T, Asch AS. A link between diabetes and atherosclerosis: glucose regulates expression of CD36 at the level of translation. *Nat Med.* 2001; 7: 840-846.
- Groop L, Forsblom C, Lehtovirta M, Tuomi T, Karanko S, Nissén M, Ehrnström BO, Forsén B, Isomaa B, Snickars B, et al. Metabolic consequences of a

family history of NIDDM (the Botnia study): evidence for sex-specific parental effects. *Diabetes*. 1996; 45: 1585-1593.

- Hanamura T, Motoyoshi K, Yoshida K, Saito M, Miura Y, Kawashima T, Nishida M, Takaku F. Quantitation and identification of human monocytic colony-stimulating factor in human serum by enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood*. 1988; 72: 886-892.
- Hashim Z, Zarina S. Osmotic stress induced oxidative damage: possible mechanism of cataract formation in diabetes. *J Diabetes Complications*. 2012; 26: 275-279.
- Hayek T, Hussein K, Aviram M, Coleman R, Keidar S, Pavoltzky E, Kaplan M. Macrophage foam-cell formation in streptozotocin-induced diabetic mice: stimulatory effect of glucose. *Atherosclerosis*. 2005; 183: 25-33.
- Hebda JA, Miranker AD. The interplay of catalysis and toxicity by amyloid intermediates on lipid bilayers: insights from type II diabetes. *Annu Rev Biophys*. 2009; 38: 125-152.
- Heilig CW, Concepcion LA, Riser BL, Freytag SO, Zhu M, Cortes P. Overexpression of glucose transporters in rat mesangial cells cultured in a normal glucose milieu mimics the diabetic phenotype. *J Clin Invest*. 1995; 96: 1802-1814.
- Hossain P, Kavar B, El Nahas M. Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge. *N Engl J Med*. 2007; 356: 213-215.
- Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006; 444: 860-867.

- Hung JH, Su IJ, Lei HY, Wang HC, Lin WC, Chang WT, Huang W, Chang WC, Chang YS, Chen CC, Lai MD. Endoplasmic reticulum stress stimulates the expression of cyclooxygenase-2 through activation of NF-kappaB and pp38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 2004; 279: 46384-46392.
- Huttunen HJ, Fages C, Rauvala H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *J Biol Chem.* 1999; 274: 19919-19924.
- International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas, 6th edn.* Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2013. <http://www.idf.org/diabetesatlas>
- Ishira M, Inoue I, Kawagoe T, Shimatani Y, Kurisu S, Hata T, Nakama Y, Kijima Y, Kagawa E. Is admisión hyperglycaemia in non-diabetic patients with acute myocardial infarction a surrogate for previously undiagnosed abnormal glucosa tolerante? *Eur Heart J.* 2006; 27: 2413-2419.
- Jack M, Wright D. Role of advanced glycation endproducts and glyoxalase I in diabetic peripheral sensory neuropathy. *Transl Res.* 2012; 159: 355-365.
- Jialal I, Kaur H. The role of toll-like receptors in diabetes-induced inflammation: Implications for vascular complications. *Curr Diab Rep.* 2012; 12: 172-179.
- John WG, Lamb EJ. The Maillard or browning reaction in diabetes. *Eye.* 1993; 7: 230-237.

- Jonnalagadda VG, Ram Raju AV, Pittala S, Shaik A, Selkar NA. The prelude on novel receptor and ligand targetsinvolved in the treatment of diabetes mellitus. *Adv Pharm Bull.* 2014; 4: 209-217.
- Kaiser N, Sasson S, Feener EP, Boukobza-Vardi N, Higashi S, Moller DE, Davidheiser S, Przybylski RJ, King GL. Differential regulation of glucose transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Diabetes.* 1993; 42: 80-89.
- Kamioka M, Ishibashi T, Ohkawara H, Nagai R, Sugimoto K, Uekita H, Matsui T, Yamagishi SI, Ando K, Sakamoto T, Sakamoto N, Takuwa Y, Wada I, Shiomi M, Maruyama Y, Takeishi Y. Involvement of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in RAGE activation signaling pathways. *J Cell Physiol.* 2011; 226: 1554-1563.
- Kanter JE, Bornfeldt KE. Inflammation and diabetes-accelerated atherosclerosis: myeloid cell mediators. *Trends Endocrinol Metab.* 2013; 24: 137-144.
- Kanter JE, Johansson F, LeBoeuf RC, Bornfeldt KE. Do Glucose and Lipids Exert Independent Effects on Atherosclerotic Lesion Initiation or Progression to Advanced Plaques? *Circ Res.* 2007; 100: 769-781.
- Kanter JE, Kramer F, Barnhart S, Averill MM, Vivekananda-Giri A, Vickery T, Li LO, Becker L, Yuan W, Chait A, Braun KR, Potter-Perigo S, Sanda S, Wight TN, Pennathur S, Serhan CN, Heinecke JW, Coleman RA, Bornfeldt KE. Diabetes promotes an inflammatory macrophage phenotype and atherosclerosis through acyl-CoA synthetase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012a; 109: E715-E724.

- Kanter JE, Tang C, Oram JF, Bornfeldt KE. Acyl-CoA synthetase 1 is required for oleate and linoleate mediated inhibition of cholesterol efflux through ATP-binding cassette transporter A1 in macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 2012b; 1821: 358-364
- Kasper M, Funk RH. Age-related changes in cells and tissues due to advanced glycation end products (AGEs). *Arch Gerontol Geriatr*. 2001; 32: 233-243.
- Kierdorf K, Fritz G. RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. *J Leukoc Biol*. 2013; 94: 55-68.
- Krolewski AS, Warram JH, Freire MB. Epidemiology of late diabetic complications. A basis for the development and evaluation of preventive programs. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1996; 25: 217-242.
- Lee AY, Chung SS. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J*. 1999; 13: 23-30.
- Lemkes BA, Hermanides J, Devries JH, Holleman F, Meijers JCM. Hyperglycemia: a prothrombotic factor? *J Thromb Haemost*. 2010; 8: 1663-1669.
- Levetan CS, Passro M, Jablonski K, Kass M, Ratner RE. Unrecognized diabetes among hospitalized patients. *Diabetes Care*. 1998; 21: 246-249.
- Li L, Sawamura T, Renier G. Glucose enhances human macrophage LOX-1 expression: role for LOX-1 in glucose-induced macrophage foam cell formation. *Circ Res*. 2004; 94: 892-901.

- Liang CP, Han S, Okamoto H, Carnemolla R, Tabas I, Accili D, Tall AR. Increased CD36 protein as a response to defective insulin signaling in macrophages. *J Clin Invest.* 2004; 113: 764-773.
- Lin Y, Berg AH, Iyengar P, Lam TK, Giacca A, Combs TP, Rajala MW, Du X, Rollman B, Li W, Hawkins M, Barzilai N, Rhodes CJ, Fantus IG, Brownlee M, Scherer PE. The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 2005; 280: 4617-4626.
- Liu Y, Liang C, Liu X, Liao B, Pan X, Ren Y, Fan M, Li M, He Z, Wu J, Wu Z. AGEs increased migration and inflammatory responses of adventitial fibroblasts via RAGE, MAPK and NF-kappaB pathways. *Atherosclerosis.* 2010; 208: 34-42.
- Lo CJ. Upregulation of cyclooxygenase-II gene and PGE2 production of peritoneal macrophages in diabetic rats. *J Surg Res.* 2005; 125: 121-127.
- Lyssenko V, Jonsson A, Almgren P, Pulizzi N, Isomaa B, Tuomi T, Berglund G, Altshuler D, Nilsson P, Groop L. Clinical risk factors, DNA variants, and the development of type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2008; 359: 2220-2232.
- Mantovani A, Garlanda C, Locati M. Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis: a question of balance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29: 1419-1423.
- Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *J Biochem Mol Toxicol.* 2003; 17: 24-38.

- Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol.* 2006;177: 7303-7311.
- Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 2008;13: 453-461.
- Matsumoto S, Yoshida T, Murata H, Harada S, Fujita N, Nakamura S, Yamamoto Y, Watanabe T, Ynoekura H, Yamamoto H, Ohkubo T, Kobayashi Y. Solution structure of the variable-type domain of the receptor for advanced glucation end products: new insight into AGE-RAGE interaction. *Biochemistry.* 2008; 47: 12299-12311.
- Mauldin JP, Srinivasan S, Mulya A, Gebre A, Parks JS, Daugherty A, Hedrick CC. Reduction in ABCG1 in type 2 diabetic mice increases macrophage foam cell formation. *J Biol Chem.* 2006; 281: 21216-21224.
- Montane J, Cadavez L, Novials A. Stress an the inflammatory process: a major cause of pancreatic cell death in type 2 diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2014; 7: 25-34.
- Moore K. J, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell.* 2011;145: 341-355.
- Moser B, Desai DD, Downie MP, Chen Y, Yan SF, Herold K, Schmidt AM, Clynes R. Receptor for advanced glycation end products expression on T cells contributes to antigen-specific cellular expansion in vivo. *J Immunol (Baltimore, MD).* 2007; 179: 8051-8058.

- Nah SS, Choi IY, Yoo B, Kim YG, Moon HB, Lee CK. Advanced glycation end products increases matrix metalloproteinase-1, -3, and -13, and TNF-alpha in human osteoarthritic chondrocytes. *FEBS Lett.* 2007; 581: 1928-1932.
- Nass N, Bartling B, Navarrete Santos A, Scheubel RJ, Borgermann J, Silber RE, Simm A. Advanced glycation end products, diabetes and ageing. *Z Gerntol Geriatr.* 2007; 40: 349-356.
- Natarajan R, Nadler JL. Lipid inflammatory mediators in diabetic vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 1542-1548.
- Neel JV. Diabetes mellitus: a “thrifty” genotype rendered detrimental by “progress”? *Am J Hum Genet.* 1962; 14: 353-362.
- Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, Elliston K, Stern D, Shaw A. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem.* 1992; 267: 14998-15004.
- O’Brien J, Morrissey PA. Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1989; 28: 211-248.
- Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 2000; 894: i-xii, 1-253.
- Odegaard JI, Chawla A. Mechanisms of macrophage activation in obesity-induced insulina resistance. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008; 4: 619-626.
- Ohashi K, Takahashi HK, Mori S, Liu K, Wake H, Sadamori H, Matsuda H, Yagi T, Yoshino T, Nishibori M, Tanaka N. Advanced glycation end products enhance monocyte activation during human mixed lymphocyte reaction. *Clin Immunol (Orlando, FL).* 2010; 134: 345-353.

- Organización mundial de la salud (OMS). Diabetes Nota Descriptiva N° 312. 2012. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>
- Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol.* 2014; 2: 411-429.
- Padmos RC, Schloot NC, Beyan H, Ruwhof C, Staal FJ, de Ridder D, Aanstoot HJ, Lam-Tse WK, de Wint H, de Heder C, Drexhage RC, Menart B, Leslie RD, Drexhage HS; LADA Consortium. Distinct monocyte gene-expression profiles in autoimmune diabetes. *Diabetes.* 2008; 57: 2768-2773.
- Peppas M, Stavroulakis P, Rapis SA. Advanced glycoxidation products and impaired diabetic wound healing. *Wound Repair Regen.* 2009; 17: 461-472.
- Piarulli F, Sartore G, Lapolla A. Glyco-oxidation and cardiovascular complications in type 2 diabetes: a Clinical Update. *Acta Diabetol.* 2013; 50: 101-110.
- Pollreisz A, Hudson BI, Chang JS, Qu W, Cheng B, Papapanou PN, Schmidt AM, Lalla E. Receptor for advanced glycation endproducts mediates pro-atherogenic responses to periodontal infection in vascular endothelial cells. *Atherosclerosis.* 2010; 212: 451-456.
- Porcheray F, Viaud S, Rimaniol AC, Leone C, Samah B, Dereuddre-Bosquet N, Dormont D, Gras G. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol.* 2005;142: 481-489.
- Programa Nacional de Salud 2007-2012. Por un México sano: construyendo alianzas. México, DF: Secretaría de Salud. Primera edición. 2007. pp 23-41.

- Qu HQ, Li Q, Rentfro AR, Fisher-Hoch SP, McCormick JB. The definition of insulin resistance using HOMA-IR for americans of mexican descent using machine learning. *Plos One*. 2011; 6: e21041
- Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988; 37: 1595-1607
- Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011; 31: 986-1000.
- Roglic G, Unwin N. Mortality attributable to diabetes: estimates for the year 2010. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010; 87: 15-19.
- Sabidó E, Quehenberger O, Shen Q, Chang CY, Shah I, Armando AM, Andreyev A, Vitek O, Dennis EA, Aebersold R. Targeted proteomics of the eicosanoid biosynthetic pathway completes an integrated genomics-proteomics-metabolomics picture of cellular metabolism. *Mol Cell Proteomics*. 2012; 11: M111.014746.
- Sampson MJ, Davies IR, Braschi S, Ivory K, Hughes DA. Increased expression of a scavenger receptor (CD36) in monocytes from subjects with Type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 2003; 167: 129-134.
- Sato T, Kameyama T, Noto T, Inoue H. Impaired macrophage production of anti-atherosclerotic interleukin-10 induced by coronary intraplaque hemorrhage in patients with acute coronary síndrome and hyperglycemia. *J Diabets complications*. 2014; 28: 196-202.
- Satoh N, Shimatsu A, Himeno A, Sasaki Y, Yamakage H, Yamada K, Suganami T, Ogawa Y. Unbalanced M1/M2 phenotype of peripheral blood

monocytes in obese diabetic patients: effect of pioglitazone. *Diabetes Care*. 2010; 33: e7.

- Schmidt AM, Hori O, Brett J, Yan SD, Wautier JL, Stern DM. Cellular receptors for AGEs. *Arterioscler Thromb*. 1994; 14: 1521-1528.
- Schmidt AM, Yan SD, Stern DM. The dark side of glucose. *Nat Med*. 1995; 1: 1002-1004.
- Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res*. 1999; 84: 489-497.
- Sciacca MF, Milardi D, Messina GM, Marletta G, Brender JR, Ramamoorthy A, La Rosa C. Cations as switches of amyloid-mediated membrane disruption mechanisms: calcium and IAPP. *Biophys J*. 2013; 104: 173-184.
- Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell*. 2012; 48: 158-167.
- Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*. 2001; 44:129-146.
- Staiger H, Machicao F, Fritsche A, Häring HU. Pathomechanisms of type 2 diabetes genes. *Endocr Rev*. 2009; 30: 557-585.
- Stanley ER, Chen DM, Lin HS. Induction of macrophage production and proliferation by a purified colony stimulating factor. *Nature*. 1978;274: 168-170.
- Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med*. 1992;176: 287-292.

- Stoger JL, Goossens P, de Winther MP. Macrophage heterogeneity: relevance and functional implications in atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol.* 2010;8: 233-248.
- Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: pathogenesis and treatment. *Lancet.* 2008; 371: 2153-2156.
- Svensson L, Camejo G, Cabre A, Vallve JC, Pedreno J, Noren K, Wiklund O, Hulten LM. Fatty acids modulate the effect of darglitazone on macrophage CD36 expression. *Eur J Clin Invest.* 2003; 33: 464-471.
- Tarling EJ, Edwards PA. ATP binding cassette transporter G1 (ABCG1) is an intracellular sterol transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108: 19719-19724.
- Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J.* 1999; 344: 109-116.
- Thornalley PJ. Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification—a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen Pharmacol.* 1996; 27: 565-573.
- Tian J, Avalos AM, Mao SY, Chen B, Senthil K, Wu H, Parroche P, Drabic S, Golenbock D, Sirois C, Hua J, An LL, Audoly L, La Rosa G, Bierhaus A, Naworth P, Marshak-Rothstein A, Crow MK, Fitzgerald KA, Latz E, Kiener PA, Coyle AJ. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune

complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol.* 2007; 8: 487-496.

- Tushinski RJ, Oliver IT, Guilbert LJ, Tynan PW, Warner JR, Stanley ER. Survival of mononuclear phagocytes depends on a lineage-specific growth factor that the differentiated cells selectively destroy. *Cell.* 1982;28: 71-81.
- Uehara Y, Miura SI, von Eckardstein A, Abe S, Fujii A, Matsuo Y, Rust S, Lorkowski S, Assmann G, Yamada T, Saku K. Unsaturated fatty acids suppress the expression of the ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1) and ABCA1 genes via an LXR/RXR responsive element. *Atherosclerosis.* 2007; 191: 11-21.
- Umpierrez GE, Isaacs SD, Bazargan N, You X, Thaler LM, Kitabchi AE. Hyperglycemia: an independent marker of in-hospital mortality in patients with undiagnosed diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87: 978-982.
- Underhill DM. Macrophage recognition of zymosan particles. *J Endotoxin Res.* 2003; 9: 176-180.
- Unger RH. Reinventing type 2 diabetes: pathogenesis, treatment, and prevention. *JAMA.* 2008; 299: 1185-1187.
- Uotila LM, Aatonen M, Gahmberg CG. Integrin CD11c/CD18  $\alpha$ -chain phosphorylation is functionally important. *J Bio Chem.* 2013; 288: 33494-33199.
- Vallve JC, Uliaque K, Girona J, Cabre A, Ribalta J, Heras M, Masana L. Unsaturated fatty acids and their oxidation products stimulate CD36 gene expression in human macrophages. *Atherosclerosis.* 2002; 164: 45-56.

- Vikramadithyan RK, Hu Y, Noh HL, Liang CP, Hallam K, Tall AR, Ramasamy R, Goldberg IJ. Human aldose reductase expression accelerates diabetic atherosclerosis in transgenic mice. *J Clin Invest.* 2005; 115: 2434-2443.
- Waldo SW, Li Y, Buono C, Zhao B, Billings EM, Chang J, Kruth HS. Heterogeneity of human macrophages in culture and in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol.* 2008;172: 1112-1126.
- Wang Y, Wang H, Piper MG, McMaken S, Mo X, Opalek J, Schmidt AM, Marsh CB. sRAGE induces human monocyte survival and differentiation. *J Immunol (Baltimore, MD).* 2010; 185: 1822-1835.
- Weijnen CF, Rich SS, Meigs JB, Krolewski AS, Warram JH. Risk of diabetes in siblings of index cases with Type 2 diabetes: implications for genetic studies. *Diabet Med.* 2002; 19: 41-50.
- Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest.* 2005; 115: 1111-1119.
- Wen Y, Gu J, Li SL, Reddy MA, Natarajan R, Nadler JL. Elevated glucose and diabetes promote interleukin-12 cytokine gene expression in mouse macrophages. *Endocrinology.* 2006; 147: 2518-2525.
- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 2004; 27: 1047-1053.
- Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. The RAGE axis: a fundamental mechanism signaling danger to the vulnerable vasculature. *Circ Res.* 2010; 106: 842-853.

- Yan SF, Yan SD, Ramasamy R, Schmidt AM. Tempering the wrath of RAGE: an emerging therapeutic strategy against diabetic complications, neurodegeneration, and inflammation. *Ann. Med.* 2009; 41: 408-422.
- Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Petrova RG, Abedin MJ, Li H, Yasui K, Takeuchi M, Makita Z, Takasawa S, Okamoto H, Watanabe T, Yamamoto H. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J.* 2003; 370: 1097-1109.
- Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H, Sudo T, Shultz LD, Nishikawa S. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature.* 1990;345: 442-444.
- Zhang F, Kent KC, Yamanouchi D, Zhang Y, Kato K, Tsai S, Nowygrod R, Schmidt AM, Liu B. Anti-receptor for advanced glycation end products therapies as novel treatment for abdominal aortic aneurysm. *Ann Surg.* 2009; 250: 416-423.
- Zhang L, Bukulin M, Kojro E, Roth A, Metz VV, Fahrenholz F, Nawroth PP, Bierhaus A, Postina R. Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases. *J Biol Chem.* 2008; 283: 35507-35516.
- Zheng CM, Ma WY, Wu CC, Lu KG. Glycated albumin in diabetic patients with chronic kidney disease. *Clin Chim Acta.* 2012; 413: 1555-1561.

- Zhou YJ, Wang JH, LiL, Yang HW, Wen de L, He QC. Expanding expression of the 5-lipoxygenase/leukotriene B4 pathway in atherosclerotic lesions of diabetic patients promotes plaque instability. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 363: 30-36.
- Zhu P, Ren M, Yang C, Hu YX, Ran JM, Yan L. Involvement of RAGE, MAPK and NF- $\kappa$ B pathways in AGEs-induced MMP-9 activation in HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol.* 2012; 21: 123-129.