



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

EFFECTO DE LA HIPERGLUCEMIA SOBRE LA ACTIVACIÓN Y
FUNCIÓN DE CD33 EN MONOCITOS DE PACIENTES CON DM2 Y
SUJETOS SANOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M EN C. YOLANDA GONZALEZ HERNANDEZ

TUTOR

DRA. MARTHA TORRES ROJAS

COMITÉ TUTORAL

DRA. GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO

DRA. MARIA DE LOURDES GARCÍA GARCÍA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

CONACyT

Agradezco la beca para estudios de doctorado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, número de Becario 96404).

UNAM

Agradezco al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina por el apoyo recibido y especialmente a la Dra. Yolanda López Vidal.

TUTORES

Mi más sincero agradecimiento a mi tutora la Dra. Martha Torres Rojas por su excelente dirección.

COMITÉ TUTORAL

Mi agradecimiento a mis tutoras, la Dra. Gloria Soldevila Melgarejo y la Dra. Ma. Lourdes García García por la asesoría brindada durante el desarrollo de la Tesis.

AL JURADO DE EXAMEN DE GRADO.

Les agradezco por el tiempo que dedicaron en la revisión de esta Tesis.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A MIS PAPÁS

Mí mayor agradecimiento es a mis Papás por su generosa e incondicional ayuda.

A MIS HERMANOS

Quiero hacer un agradecimiento especial a mis hermanos por el apoyo desinteresado que me han brindado.

A MIS AMIGOS

A mis amigos por estar disponibles cuando los he necesitado les doy las gracias.

A MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO

A los compañeros del departamento de microbiología por los incontables momentos de apoyo que me han dado hago manifiesto mi agradecimiento.

Al:

Dr. Alejandro Escobar, por enseñarme inmunología, historia, español, bioquímica, etc, por ser un gran maestro!

Dr. Sigifredo Pedraza, porque siempre me ha dado la oportunidad de aprender nuevas cosas!

DEDICATORIA

ESTA TESIS LA DEDICO A:

Mis Papás, Adolfo González e Irene Hernández porque simplemente esto nunca hubiera sido posible sin ustedes!!

Mis Hermanos, por orden alfabético, Adolfo, Alejandra, Claudia, Gustavo, Mariana, Roberto y Sonia, porque parte de esto les pertenece!!

A mis Sobrinos, por nacimiento, Saúl, Paola, Iván, Emiliano, Regina, Camila, Santiago, Ximena y Mateo, por el cariño sincero que me dan!

A, Fernanda, Montserrat, Lilita y José porque ya son parte de la familia!

A mis tías, tíos y primos! y A los que ya no están!!

DEDICATORIA

A mis amigos por su cariño y especialmente a:

Martha, por ser mi amiga y por enseñarme algo más que inmunología!

Tere, por todos estos años de amistad incondicional!

Caro, por los momentos regulares, los buenos, los estresantes y los excelentes que hemos pasado!

Marce, por la amistad y por el apoyo que me has dado en los momentos difíciles!

Gaby, Gloria y Mary, por las críticas constructivas y porque la amistad que me ofrecen perdure en el tiempo!

Amanda, por que eres la persona más sincera y generosa que he conocido y por ser una gran amiga!



ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
Resumen en español	I
Resumen en Inglés (Abstract)	III
Abreviaturas	V
1 Introducción	
1.1 <i>Diabetes Mellitus (DM).</i>	1
1.2 <i>Hiperglucemia</i>	2
1.2.1 <i>Hiperglucemia asociada a insulina.</i>	3
1.2.2 <i>Hiperglucemia asociada a la disminución del metabolismo de la glucosa y de los lípidos.</i>	4
1.3 <i>Consecuencias fisiopatológicas de la hiperglucemia.</i>	5
1.4 <i>Hiperglucemia e inflamación.</i>	6
1.5 <i>Mecanismos de inducción de inflamación por la hiperglucemia.</i>	9
1.5.1 <i>Formación de productos finales de glucosilación avanzada.</i>	9
1.5.2 <i>Especies reactivas de oxígeno.</i>	14
1.5.3 <i>Inflamasoma.</i>	15
1.6 <i>Otros mecanismos de inducción de inflamación asociados a hiperglucemia.</i>	18



2 Justificación	26
3 Hipótesis	27
4 Objetivo General	28
4.1 Objetivos específicos.	28
5 Material y métodos.	
5.1 Grupos de estudio.	30
5.2 Separación de monocitos.	31
5.3 Ensayo de pureza.	32
5.4 Medios y cultivos celulares.	33
5.5 Expresión de CD33.	33
5.6 Modelo de hiperglucemia in vitro.	34
5.7 Viabilidad celular por ensayos de MTT.	35
5.8 Extracción del ARN.	35
5.9 Síntesis DNA complementario.	36
5.10 Análisis de expresión génica por qPCR.	37
5.11 Cuantificación de citocinas inflamatorias.	38
5.12 Tratamiento con tocoferol.	39
5.13 Determinación de especies reactivas del oxígeno.	39
5.14 Análisis estadístico.	40
6 Resultados	41
7 Discusión	57
8 Limitaciones del estudio.	61



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

8 | Conclusiones 61

9 | Referencias 62

10 | Anexos 71

10.1 Artículo: High glucose concentrations induce TNF- α production through the down-regulation of CD33 in primary human monocytes.

10.2 Artículo: Asociación de tuberculosis y diabetes mellitus: Mecanismos inmunológicos involucrados en la susceptibilidad.



RESUMEN

La molécula CD33 es un receptor de membrana que contiene un dominio tipo lectinas en la región extracelular y un motivo de inhibición basado en tirosina (ITIM) en la región intracelular y cuya función es inhibir la activación celular y la producción de citocinas. CD33 se expresa principalmente en monocitos y la reducción de su expresión correlaciona con la producción de citocinas inflamatorias como la IL-1 β , el TNF- α , y la IL-8. Sin embargo, el papel de CD33 en la inflamación asociada con la hiperglucemia y la diabetes es desconocido. Por lo tanto, en este estudio se evaluó la expresión de CD33 y la secreción de citocinas inflamatorias en monocitos recién aislados de un grupo de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2) en comparación con monocitos de sujetos sanos. Para evaluar el efecto de la hiperglucemia, se utilizó un modelo de hiperglucemia *in vitro* en donde los monocitos de sujetos sanos fueron cultivados con diferentes concentraciones de glucosa (15-50 mmol/l de D-glucosa), se evaluó tanto la expresión de CD33 como la producción de citocinas inflamatorias. Para conocer los mecanismos involucrados en la disminución de CD33, se cuantificó la generación de las especies reactivas del oxígeno (ROS), así como la expresión de la molécula supresora de la señalización de citocinas 3 (SOCS-3).



Se observó que los monocitos de pacientes con DM2 expresaron un menor número de moléculas de CD33 sobre la superficie celular así como también un menor número de copias del RNAm de CD33 respecto al grupo de sujetos sanos. También se encontró incremento de las citocinas inflamatorias TNF- α , IL-8 e IL-12p70 en el plasma de los pacientes con DM2 en comparación con los sujetos sanos. Un análisis posterior utilizando un modelo *in vitro* de hiperglucemia mostró que en los monocitos de sujetos sanos cultivados en condiciones de glucosa alta, tanto la expresión de CD33 sobre la superficie celular como la expresión de RNAm disminuyen y se asocia con el incremento de la producción espontánea de TNF- α , éste efecto se revirtió cuando los monocitos fueron cultivados en presencia del antioxidante α -tocoferol y alta glucosa, lo que sugiere la participación de la generación de EROS en la regulación de la expresión de CD33. Al evaluar el efecto de la alta concentración de glucosa sobre la expresión de SOCS-3 que es la molécula que induce la degradación de CD33 de la superficie celular, se encontró un incremento significativo de la misma con respecto a los monocitos cultivados en concentraciones normales de glucosa.

Nuestros resultados sugieren que la hiperglucemia tiene efecto sobre la expresión de CD33 y activa la secreción espontánea de TNF- α por monocitos periféricos. Este fenómeno está asociado con la



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

generación de ROS y la expresión de SOCS-3. Estas observaciones sugieren la participación de CD33 en el perfil inflamatorio asociado con la diabetes tipo 2 y un efecto de la glucosa sobre moléculas de la respuesta inmune innata pro-inflamatoria



ABSTRACT

BACKGROUND: CD33 is a membrane receptor containing a lectin domain and a cytoplasmic immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) that is able to inhibit cytokine production. CD33 is expressed by monocytes, and reduced expression of CD33 correlates with augmented production of inflammatory cytokines, such as IL-1b, TNF-a, and IL-8. However, the role of CD33 in the inflammation associated with hyperglycemia and diabetes is unknown. Therefore, we studied CD33 expression and inflammatory cytokine secretion in freshly isolated monocytes from patients with type 2 diabetes. To evaluate the effects of hyperglycemia, monocytes from healthy donors were cultured with different glucose concentrations (15-50 mmol/l D-glucose), and CD33 expression and inflammatory cytokine production were assessed. The expression of suppressor of cytokine signaling protein-3 (SOCS-3) and the generation of reactive oxygen species (ROS) were also evaluated to address the cellular mechanisms involved in the down regulation of CD33.

RESULTS: CD33 expression was significantly decreased in monocytes from patients with type 2 diabetes, and higher levels of TNF-a, IL-8 and IL-12p70 were detected in the plasma of patients compared



to healthy donors. Under high glucose conditions, CD33 protein and mRNA expression was significantly decreased, whereas spontaneous TNF- α secretion and SOCS-3 mRNA expression were increased in monocytes from healthy donors. Furthermore, the down-regulation of CD33 and increase in TNF- α production were prevented when monocytes were treated with the antioxidant α -tocopherol and cultured under high glucose conditions.

CONCLUSION: Our results suggest that hyperglycemia down-regulates CD33 expression and triggers the spontaneous secretion of TNF- α by peripheral monocytes. This phenomenon involves the generation of ROS and the up-regulation of SOCS-3. These observations support the importance of blood glucose control for maintaining innate immune function and suggest the participation of CD33 in the inflammatory profile associated with type 2 diabetes.



ABREVIATURAS

ADH	(hormona antidiuretica)
AGEs	(productos finales de glucosilación avanzada)
CD33	(Sialoadhesina 3)
DNA	(Ácido desoxirribonucleico)
DM	(diabetes mellitus)
DM1	(diabetes mellitus tipo 1)
DM2	(diabetes mellitus tipo 2)
Fc γ R	(receptor para la fracción cristalizable de la inmunoglobulina G)
GLUT	(transportador de la glucosa)
Hiperglucemia	(altas concentraciones de glucosa en sangre)
HSP	(proteinas de choque térmico)
ICAM-1	(Molécula de adhesión intercelular)
Ig	(Inmunoglobulina)
Ig-Like	(semejante a las inmunoglobulinas)
IL-1 β	(Interleucina 1 beta)
IL-6	(Interleucina 6)
IL-8	(Interleucina 8)
IL-12p70	(Interleucina 12 p70)
IL-18	(Interleucina 18)
IKK β	(inhibidor del factor nuclear kappa-B subunidad beta cinasa)
ITAM	(motivo de activación basados en tirosina)



ITIM	(motivo de inhibición basado en tirosina)
JNK	(c-Jun cinasa N-terminal)
LDL	(lipoproteínas de baja densidad)
LDLox	(LDL oxidados)
MAPp38	(P38 proteína cinasas activadas por mitógenos)
mmol/l	(milimol por litro)
mOsm/Kg	(miliosmoles por kilogramo)
Neu5Ac	(Ácido N-acetilneuramínico)
NF-kB	(factor nuclear kappa-B)
NLRP3	(familia de receptores tipo NOD, que contiene un dominio 3 pryin)
NOD	(dominio de oligomerización de nucleótidos)
O ₂ -	(anión superóxido)
PAMS	(patrones moleculares asociados en patógenos)
PI3K	(fosfoinositol 3-cinasas)
PKC	(proteína cinasa C)
RAGE	(receptorores de AGEs)
RAW264	(linea celular de en macrófagos murinos)
RNA	(Ácido ribonucleico)
RNAi	(Ribointerferencia o ARN interferente)
RNA _m	(RNA mensajero)
ROS	(especies reactivas de oxígeno)
Siglec	(lectinas semejantes a las inmunoglobulinas)
SHP	(proteína tirosina fosfatasa)



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

SOCS-3	(molécula supresora de la señalización de citocinas 3)
TLR4	(receptores tipo toll 4)
TNF- α	(Factor de Necrosis Tumoral alfa)
Trp2	(triptófano 2)
Trp106	(triptófano 106)
TXNIP	(proteína de interacción con tiorredoxina)



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

INTRODUCCIÓN

DIABETES MELLITUS.

La diabetes mellitus (DM), es un desorden metabólico de etiología múltiple caracterizado por hiperglucemia crónica con alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas que se producen por defectos en la secreción y/o acción de la insulina.¹ Se estima que la DM afecta a 250 millones de individuos en el mundo y se calcula que estas cifras se duplicarán en el 2020, significa que la DM es ahora una epidemia.² En México la DM afecta entre el 10 a 15% de la población adulta.

De acuerdo con la etiología, la DM se clasifica en varios tipos siendo los más frecuentes el tipo 1 y 2. La DM tipo 1 (DM1) se produce por destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas con la ausencia en la producción de insulina, y la DM tipo 2 (DM2) presenta deficiencia en la secreción y/o acción de la insulina. Otros tipos menos frecuentes son la diabetes gestacional, el grupo de diabetes tipo MODY (*del inglés, maturity-onset diabetes of the young, diabetes del adulto de inicio juvenil*) que se caracteriza por su herencia autosómica dominante, la diabetes causada por ciertos fármacos (glucocorticoides, agonistas alfa y beta adrenérgicos) y la diabetes inducida por infecciones (rubéola congénita, citomegalovirus, etc).



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

La DM2 es la forma clínica más frecuente causando alrededor del 90% de todos los casos de esta enfermedad, es una enfermedad metabólica progresiva y crónica siendo la hiperglucemia la principal causa de las complicaciones asociadas a la DM2.¹

HIPERGLUCEMIA.

Las concentraciones normales de glucosa en sangre periférica se encuentran en un rango de 60 a 110 mg/dl (3.3-7.0 mmol/l)¹, el aumento de la glucosa por encima de los valores normales máximos es una condición que se conoce como hiperglucemia y no siempre se acompaña de síntomas. Aunque existen diferentes condiciones en las que pueden observarse estados de hiperglucemia (por ejemplo, en el abuso en la dieta, infecciones, cirugías o accidentes, enfermedades del corazón, tensión emocional, edema cerebral, y medicamentos como los corticoides), ésta se mantiene elevada de forma crónica solo en pacientes con enfermedades metabólicas como la DM.^{3, 4}

En los pacientes con DM, la hiperglucemia se mantiene en un estado crónico por diferentes causas; entre las principales se encuentra la insuficiencia de insulina, resistencia a la insulina, disminución del metabolismo de la glucosa o lípidos o una combinación de los anteriores.^{1, 5}



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

Hiperglucemia asociada a insulina. La insulina es una hormona pleiotrópica y su principal función es estimular la absorción de glucosa en el músculo esquelético y el corazón. Otros efectos metabólicos de la insulina incluyen la inhibición de la liberación de glucosa desde el hígado y la inhibición de la liberación de ácidos grasos libres del tejido adiposo. La deficiencia y /o resistencia a la insulina (RI) son condiciones en las cuales la insulina no activa la señal para la absorción de glucosa y las consecuencias clínicas incluye a la hiperglucemia.^{6, 7} Además de la RI, puede presentarse insuficiencia de insulina, clasificada de acuerdo a su origen en primaria o secundaria. La primaria a su vez puede ser absoluta o relativa. La absoluta es por falta de producción o secreción de insulina (esta condición se relaciona con la reducción en el tamaño y/o el número de islotes) y en la relativa, hay inhibición o destrucción de la insulina circulante por anticuerpos o enzimas. La insuficiencia primaria se observa en pacientes con diabetes mellitus tipo 1, en donde la herencia es el factor etiológico más importante vinculado a este tipo de diabetes. La insuficiencia de insulina secundaria puede ser por falla del páncreas, por factores anti-insulínicos hormonales, como los contrarreguladores (glucagón, epinefrina, y cortisol), o por aumento de la demanda de insulina por los tejidos. La insuficiencia de insulina secundaria y/o la RI se presenta en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.⁸⁻¹⁰



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

Hiperglucemia asociada a la disminución del metabolismo de la glucosa y de los lípidos. El mantenimiento de glucosa a una concentración normal en plasma requiere de un balance entre la utilización de glucosa, la producción endógena de glucosa, y la ingesta de glucosa. La glucosa en periferia proviene de 3 fuentes: la absorción intestinal inmediatamente después de la ingestión de carbohidratos en la dieta, la glucogenólisis y la gluconeogénesis. La glucosa es transportada a las células a través de múltiples vías metabólicas: se puede almacenar en forma de glucógeno, puede sufrir glucólisis a piruvato y, por último, puede ser liberada a la circulación por el hígado y los riñones (son los únicos órganos que contienen glucosa-6-fosfatasa, el enzima necesaria para la liberación de glucosa en la circulación).^{11, 12}

Otra vía de inducción de hiperglucemia es el alto contenido en grasa en la dieta, ésta es considerada una de las principales causas de la resistencia a la insulina asociada a la obesidad. El alto contenido de grasa induce hiperglucemia debido a que disminuye la expresión de GLUT4 y como consecuencia reduce la captación de glucosa periférica. En tejidos dependientes de la insulina como el corazón, músculo esquelético y tejido adiposo, el transportador de glucosa 4 (GLUT4) juega un papel importante en la homeostasis de la glucosa en todo el cuerpo. Este transportador es responsable de la captación de glucosa inducido por la insulina. Esta induce la rápida translocación del transportador GLUT4 de vesículas intracelulares a la membrana plasmática.¹³



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

CONSECUENCIAS FISIOPATÓLOGICAS DE LA HIPERGLUCEMIA.

Cuando la glucosa sanguínea es mayor a 600 mg/dl, y la osmolaridad sérica se incrementa a más de 350 mOsm/Kg se produce un estado hiperosmolar hiperglucémico.¹⁴ El estado hiperosmolar resulta de la deficiencia de insulina, de la elevación de las hormonas contrarreguladoras (glucagón, epinefrina, cortisol) en el hígado, el tejido adiposo así como también de la diuresis osmótica inducida por hiperglicemia en el riñón y la disminución de la captación periférica de glucosa. Las prostaglandinas I₂ y E₂ generadas por el tejido adiposo y que se ven aumentadas en el estado hiperosmolar hiperglucémico pueden llevar a la caída de la resistencia vascular periférica y otras alteraciones como taquicardia, hipotensión, náuseas, vómitos, y dolor abdominal.

El riñón desempeña un papel clave en el desarrollo de la hiperglicemia ya que cuando la glucosa permanece por un periodo largo de tiempo en el espacio extracelular produce un efecto osmótico con el paso de agua desde el compartimento intracelular. La glucosa, el agua y las sales son filtradas por el glomérulo y la reabsorción tubular de glucosa es de aproximadamente 200 mg/min, por lo que el exceso de glucosa en el túbulo produce una diuresis osmótica que lleva a una pérdida excesiva de agua junto a sales minerales. La



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

glucosa excesiva junto con los productos de desecho del metabolismo incompleto de las grasas y las proteínas, se acumulan como detritos en el torrente sanguíneo y con ello se produce un aumento en la hiperosmolaridad. Para disminuirla, el líquido es arrastrado desde el compartimento intracelular hacia el lecho vascular, produciéndose una intensa depleción del volumen intracelular. La hemoconcentración persiste a pesar de eliminar grandes cantidades de glucosa en la orina. La filtración glomerular y la eliminación de glucosa por los túbulos renales son insuficientes para reducir el nivel de glucosa sérica. La hiperosmolaridad y el volumen sanguíneo reducido estimulan la liberación de hormona antidiurética (ADH) para aumentar la reabsorción tubular de agua, pero la ADH no tiene potencia para vencer la fuerza osmótica que ejerce la carga de glucosa y se pierde un volumen excesivo de líquido por los túbulos renales lo que provoca la deshidratación. Sin un tratamiento eficaz del episodio de hiperglucemia, puede generar un coma diabético, que a veces conduce a la muerte.^{15, 16}

HIPERGLUCEMIA E INFLAMACIÓN.

El sistema inmune innato está involucrado en la patogénesis de la diabetes, observándose un proceso inflamatorio crónico sistémico asociado a la hiperglucemia.^{17, 18} La inflamación es una respuesta inmediata del organismo a cualquier daño posterior a la exposición a agentes infecciosos, estímulos



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

antigénicos no infecciosos o lesiones físicas que involucra al sistema nervioso, vascular e inmunológico. Es de corto tiempo y su función es homeostática, de protección o defensa, no obstante si el proceso es ineficiente y se mantiene crónicamente, se transforma en un proceso fisiopatológico (causando disfunción microvascular y macrovascular, hipotensión, leucocitosis, caquexia etc) que compromete la inflamación activa e implica la reparación tisular.¹⁹⁻²¹

La inflamación se clasifica como aguda o crónica dependiendo del tipo de estímulo, de la eficacia de la respuesta inicial y de las moléculas anti-inflamatorias. La inflamación aguda tiene un inicio inmediato y de corta duración, se caracteriza por la producción de proteínas de fase aguda (proteína C reactiva PCR, amiloide A sérico, fibrinógeno, haptoglobina, ferritina) por el hígado. La inflamación crónica tiene una larga duración y se caracteriza por una respuesta celular principalmente de monocitos, macrófagos, y linfocitos [con producción de citocinas inflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18 y el TNF- α . La inflamación crónica se desarrolla cuando la fase aguda no es controlada (el control involucra la reparación del tejido conectivo con fibrosis y escharificación) o cuando la respuesta inflamatoria continúa (por ejemplo; en episodios recurrentes de inflamación aguda, en una resolución incompleta de la inflamación aguda, y los casos donde la curación involucra la destrucción tisular con formación de fibrina).²²



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

En la actualidad es ampliamente aceptado que la diabetes se asocia con un estado de inflamación aguda que posteriormente se mantiene de forma crónica.¹⁹ Los pacientes con DM2 presentan niveles elevados de proteínas de fase aguda circulantes (tales como la PCR, haptoglobina, el fibrinógeno, inhibidor del activador del plasminógeno y el amiloide A sérico), de ácido siálico, así como citocinas y quimiocinas proinflamatorias.²³

En pacientes con DM2 los monocitos juegan un papel importante en la inflamación sistémica con la producción de IL-6, TNF- α , IL-8, IL-1 β y de las moléculas de adhesión intercelular ICAM-1, E-selectina y de la IL-10.²⁴⁻²⁷ La IL-10 es un inhibidor importante de la síntesis de citocinas debido a que suprime la función de los macrófagos e inhibe la producción de citocinas proinflamatorias. Los niveles séricos bajos de IL-10 ó polimorfismos en el gen de la IL-10 están asociados con un incremento en la susceptibilidad del síndrome metabólico y la diabetes mellitus tipo 2.^{28, 29} La IL-1 β favorece la destrucción tisular debido a que induce la expresión de metaloproteinasas, y mantiene la inflamación crónica evitando la reparación de tejidos, al inhibir la síntesis de colágena y proteoglicanos, la IL-6 aumenta el número de plaquetas circulantes, las proteínas de fase aguda, induce la transición de la inflamación aguda a crónica al reclutar neutrófilos polimorfonucleares y monocitos/macrófagos los cuales potencian por periodos prolongados. Por otro lado, la IL-1 β también tiene un papel importante en la etiopatología de diabetes debido a que contribuye a la resistencia a la



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

insulina.^{30, 31} La principal acción del TNF- α es inducir la secreción de proteínas de inflamación de fase aguda y crónica, regula el metabolismo de la glucosa y de lípidos, el TNF- α en particular es de gran interés, ya que juega un papel importante en las complicaciones de la diabetes (por ejemplo, en las complicaciones microvasculares, y en la inflamación local crónica en ojos).^{32, 33}

MECANISMOS DE INDUCCIÓN DE INFLAMACIÓN POR LA HIPERGLUCEMIA.

En condiciones clínicas y experimentales, se ha demostrado que la hiperglucemia activa las vías de señalización intracelular reguladas por la proteína cinasa C (PKC), la proteína cinasa p38, y del factor nuclear kB (NF-kB); estas moléculas inducen a su vez la producción de citocinas y quimiocinas inflamatorias^{17, 34, 35} por las siguientes vías:

1. Formación de productos finales de glucosilación avanzada. El mecanismo más ampliamente descrito es la generación de los productos finales de glucosilación avanzada AGEs (por sus siglas en inglés advanced glycation end products), se forman por la interacción química de la glucosa con las proteínas, sin que haya necesidad de una intervención enzimática; este proceso depende



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

exclusivamente de la concentración de la glucosa y del tiempo de contacto de este monosacárido con las proteínas, que es determinado por la vida media de cada proteína.

El proceso de glucosilación de las proteínas se representa en la Figura 1. En la etapa inicial del proceso de glucosilación se forman enlaces covalentes entre los grupos libres amino (reactivos) de las proteínas, lípidos o ácidos nucleicos con la glucosa. En el caso de las proteínas, estos grupos se ubican generalmente sobre las cadenas laterales de lisina y en los residuos NH₂-terminales de los aminoácidos. Esta reacción solo ocurre cuando la glucosa se encuentra en su conformación de cadena abierta, lo cual permite que quede expuesto un grupo carbonilo reactivo (grupo aldehído de la glucosa), y es la que da lugar a la base de Schiff. Por lo tanto, el primer producto de reacción de la glucosilación temprana es la aldimina inestable conocida como base de Schiff, y este proceso bioquímico inicial es fácilmente reversible. Sin embargo, la base de Schiff formada también puede experimentar un reordenamiento intramolecular lento, que la transforma en un producto más estable, el compuesto de Amadori, conocido también con el nombre de fructosamina (1-amino-1-desoxicetona); que se forma cuando el glucosil (de la base de Schiff) se transforma en fructosil, por el desplazamiento del grupo carbonilo del carbono 1 al 2 durante el reordenamiento. Tanto la reacción en la cual se forma la base de Schiff como en la consecutiva en la que se produce el compuesto de Amadori, son reversibles, lo



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

cual significa que la interrupción del contacto de la glucosa con la proteína en cualquiera de estas etapas produce la reversión completa del efecto.³⁶

La conversión del compuesto de Amadori en AGEs es un proceso que ocurre en proteínas estructurales, muy abundantes en el organismo, y de vida media larga como, hemoglobina, colágena, elastina, mielina, actina, miosina y proteínas del cristalino; aunque también puede afectar a proteínas de vida media corta, como las lipoproteínas, especialmente cuando estas son retenidas por períodos prolongados en la pared arterial.³⁶

Los AGE son reconocidos por receptores expresados en la superficie de los monocitos y macrófagos conocidos como receptores de AGEs (RAGE), su reconocimiento activa a la molécula de señalización intracelular PKC e induce la expresión de un gran número de citocinas y quimiocinas inflamatorias, sin embargo para que se generen los AGEs en sangre se requiere de un periodo de 4-6 semanas, por lo que este mecanismo juega un papel importante en las complicaciones de la diabetes. Por ejemplo, los AGE se encuentran en los vasos de la retina de los pacientes diabéticos, y sus niveles correlacionan con la severidad de la retinopatía, también se acumulan en los nervios periféricos de pacientes diabéticos afectando la velocidad de conducción nerviosa y neuronal.³⁸ Por otro lado, la interacción ligando-RAGE induce la activación celular lo que conduce a la generación de estrés oxidativo activa factores de transcripción³⁷



como NF- κ B que a su vez induce la transcripción proteínas importantes en la inflamación; estos incluye al TNF- α , la IL-1, IL-6 e IL-8 y la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) y la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1).^{39, 40}

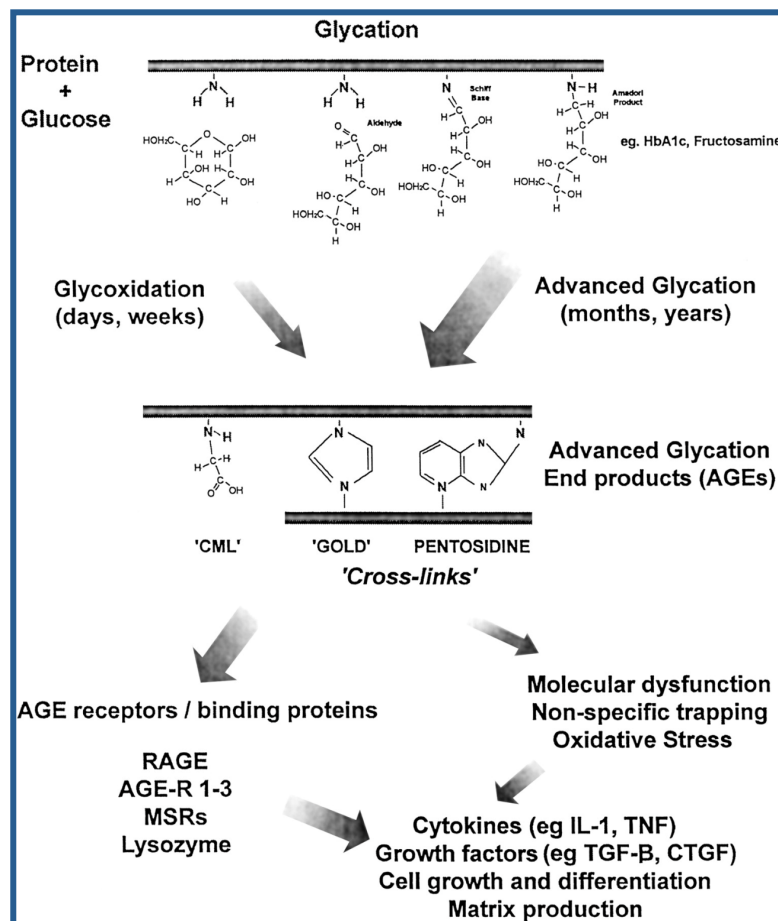


Figura 1 | La formación de productos finales de glucosilación avanzada (AGES), reconocimiento y activación celular. (imagen publicada por Forbes JM, et al. J Am Soc Nephrol. 2003).³⁷



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

Las lipoproteínas glucosiladas, oxidadas y glucooxidadas están implicadas en la patogenia de la enfermedad microvascular/macrovascular y en el proceso inflamatorio en la DM, sobre todo, las lipoproteínas de baja densidad (LDL), la cual ha sido la más estudiada y puede presentar diferentes modificaciones, como un descenso de 25 a 60 % de su contenido de ácido siálico, una disminución de su diámetro y un aumento de su densidad y de su electronegatividad.^{41, 42}

Las lipoproteínas glucosiladas, oxidadas y glucooxidadas son reconocidas por los receptores tipo toll (TLRs), éstos receptores participan en el reconocimiento de patrones moleculares de los agentes infecciosos, sin embargo, también se ha demostrado que desempeñan un papel importante en el desarrollo de la inflamación inducida por la hiperglucemia. El TLR4 reconoce LDL modificadas y proteínas de choque térmico (HSP). Esta última es una proteína que se expresa cuando se expone a lípidos de baja densidad oxidados (LDLox).⁴³⁻
⁴⁵ Estos estímulos extracelulares activan las vías intracelulares que convergen en la vía de señalización del factor de transcripción kB (NF-kB) y de la proteína c-Jun cinasa N-terminal (JNK) ambos factores de transcripción activan genes de respuesta inflamatoria.

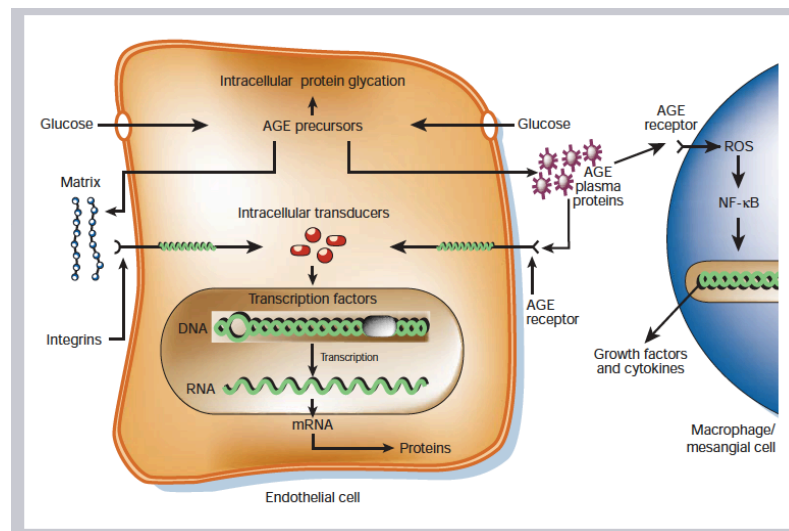


Figura 2 | Los mecanismos por los cuales la producción intracelular de productos finales de glucosilación avanzada (AGE). La modificación covalente de las proteínas intracelulares por los precursores AGE altera varias funciones celulares. La modificación de proteínas de matriz extracelular causa interacciones anormales con otras proteínas de la matriz y con las integrinas. La modificación de las proteínas del plasma por los precursores AGE crea ligandos que se unen a los receptores de AGE, la inducción de cambios en la expresión génica en las células endoteliales, células mesangiales y macrófagos. (Imagen publicada por Michael Brownlee. Nature, 2001).⁴⁶

2. Especies reactivas de oxígeno. Un segundo mecanismo por el que la hiperglucemia induce inflamación, incluye la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las mitocondrias son la principal fuente de ROS endógenas, en la mayoría de los mamíferos del 1-al 5% del oxígeno consumido se convierte a ROS, como subproductos de las reacciones de oxidación-reducción en la cadena respiratoria. Las concentraciones altas de glucosa incrementan la glucólisis y la producción mitocondrial de anión superóxido (O_2^-), y la sobreproducción de radicales libres⁴⁷ que activan a la proteína PKC y NF- κ B,^{48, 49} la activación por



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

esta vía, induce la producción de IL-1 β e IL-6 en monocitos humanos.⁵⁰ La producción mitocondrial de especies reactivas del oxígeno (ROS) inducidos por la hiperglucemia es reconocida como una de las principales causas de las complicaciones clínicas asociadas a diabetes y a la obesidad.⁴⁶

3. Inflamasoma. El inflamasoma es un complejo de proteínas que desencadena la activación de la caspasa-1 y la subsiguiente secreción de IL-1 β e IL-18. El inflamasoma está compuesto por el receptor NLR (Nod-like receptor) llamado NLRP3 la proteína adaptadora apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) y la caspasa-1. Esta vía pro-inflamatoria se induce cuando la Tiorredoxina (TRX) se disocia de la proteína TRX (TXNIP), posteriormente la TXNIP en forma libre se une a la proteína NLRP3, con el subsecuente ensamble del inflamasoma, y la activación de la caspasa-1, esta enzima produce la forma activa de la IL-1 β e IL-18 por escisión del precursor inactivo de la pro-IL-1 β y pro-IL-18 (Figura 3).⁵¹ El reconocimiento de patógenos mediante el NLR y de la liberación citocinas pro-inflamatorias son importantes en la defensa del hospedero contra numerosas infecciones.

Estudios recientes han identificado una nueva función del inflamasoma en la inducción y la patogénesis de varias enfermedades autoinmunes e inflamatorias en las que se encuentra la DM2. Los ácidos grasos saturados y otros metabolitos relacionados con la obesidad se encuentran elevados en los



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

pacientes con DM2 y se sospecha que contribuyen a la progresión de la inflamación y la enfermedad. El palmitato, uno de los ácidos grasos saturados más abundantes en el plasma de los pacientes con DM2, pueden inducir la activación del inflamasoma NLRP3-ASC y provocar la secreción de IL-1 β e IL-18.⁵² Adicionalmente el inflamasoma puede activarse por las ROS inducidas por la hiperglucemia, por el mismo mecanismo (Figura 3).⁵³

Tanto la IL-1 β como la IL-18 son potentes mediadores de la inflamación y la respuesta inmune. La secreción de IL-1 β desencadena la producción de IL-6 y TNF- α , que a su vez provoca la migración celular y la infiltración de células inmunes en el tejido. La IL-18 también es una citocina proinflamatoria que incita el reclutamiento de células inmunes y la activación activa a las células natural killer (NK) que potencian la respuesta inflamatoria.

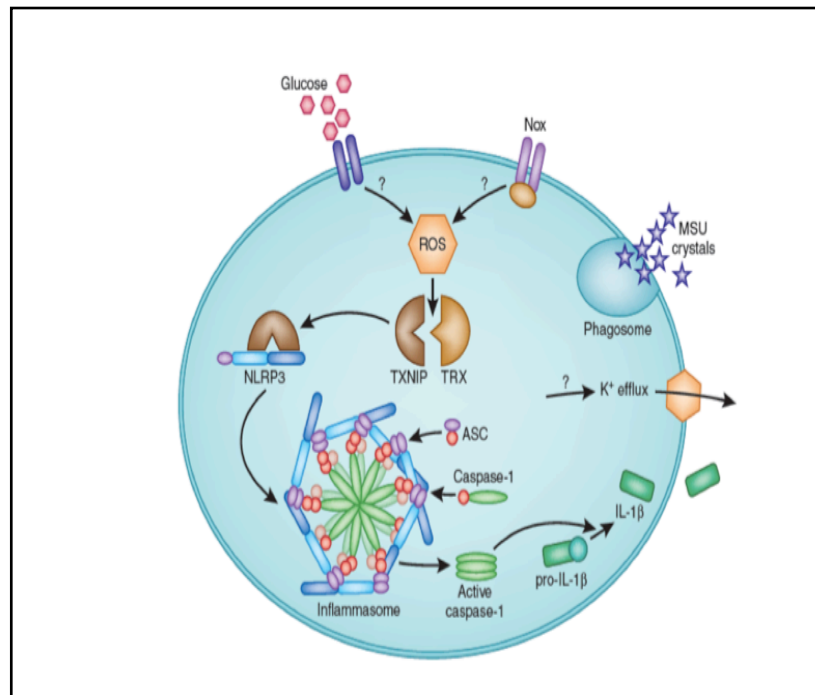


Figura 3 | El inflamasoma NLRP3. La activación del inflamasoma inicia con la generación de ROS por la hiperglucémia. Durante el estrés oxidativo, Se disocia TXNIP de TRX. El TXNIP interactúa con la región rica en leucina de NLRP3. Este estado facilita la formación de la caspasa1 por el inflamasoma, lo que conduce a la elaboración de la forma activa la IL-1 β . (Imagen publicada por Beckley K Davis, Nature Immunology, 2010).⁵¹



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

OTROS MECANISMOS DE INDUCCIÓN DE INFLAMACIÓN ASOCIADOS A HIPERGLUCEMIA.

Aunque los mecanismos descritos anteriormente explican parcialmente los altos niveles de citocinas inflamatorias observadas durante la hiperglucemia, aún se desconoce el mecanismo que sostiene la inflamación crónica observa en los pacientes con DM2. Una molécula que podría estar involucrada en la inflamación crónica inducida por la hiperglucemia es la sialoadhesina 3 (Siglec-3 o CD33), esta molécula se expresa en la superficie de los monocitos e inhibe la activación celular y la producción de citocinas inflamatorias durante las interacciones célula-célula en condiciones homeostáticas o de reposo (*steady-state*). La expresión disminuida de CD33 en la membrana celular se ha asociado con la producción espontánea de citocinas inflamatorias como la IL-1 β , TNF α e IL8.⁵⁴

Inicialmente se describió que la expresión de CD33 se restringía a las células hematopoyéticas. Posteriormente se observó que su expresión continúa hasta la diferenciación mielomonocítica, donde su expresión está disminuida en granulocitos pero se mantiene alta en los monocitos. La expresión de CD33 en el sistema hematopoyético indica un papel en la regulación de la diferenciación de células mieloides (Figura 4).⁵⁵

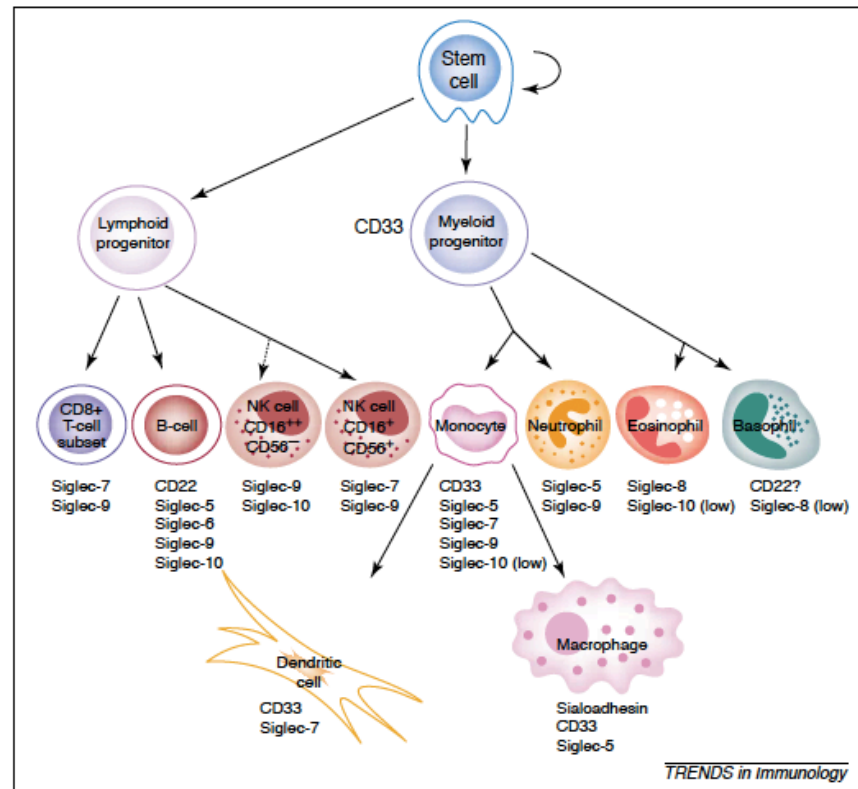


Figura 4 | Expresión en humanos de las lectinas de la familia de las inmunoglobulinas (Ig) que unen ácido siálico (Siglecs) dentro del sistema hematopoyético. La molécula de superficie CD33 se expresa tempranamente en el progenitor mieloide y además de CD33 y CD22, se sabe poco acerca de los patrones de expresión de Siglecs sobre las stem cell y progenitoras. La molécula CD33 se expresa altamente en monocitos en sangre periférica, en células dendríticas derivadas de monocitos y en las subpoblaciones de macrófagos tisulares. (Imagen publicada por Paul R. Crocker and Ajit Varki en TRENDS in Immunology 2001).⁵⁵

La sialoadhesina 3 o CD33 es una glicoproteína pertenece a la familia de los Siglec (Lectinas que unen ácido siálico semejantes a las inmunoglobulinas), la familia se compone de 11 lectinas de tipo I. CD33 es una glicoproteína de 67 kDa transmembranal que contiene un dominio variable y un dominio constante



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

parecido a las inmunoglobulinas (Ig-like), los Siglecs relacionados a CD33 forman un subconjunto de la familia Siglec, que comparten aproximadamente del 50 al 80% de secuencia dentro de la región extracelular. La función de CD33 es participar en las interacciones celulares, y regular la activación, proliferación y la adhesión celular (Figura 7).⁵⁵

Los Siglecs son proteínas de membrana tipo I, con una región extracelular que contiene un dominio V similar a las inmunoglobulinas (Ig) con un extremo N-terminal y un número variando de dominios C semejante a las Ig. En la figura 5, se muestra que la región intracelular de la mayoría de las Siglecs contienen motivos de señalización ITIM basados en residuos de tirosina (Tyr ó Y). Los motivos de activación basados tirosina que están altamente conservadas en los Siglecs relacionados a CD33 (CD33-Siglecs). Estas proteínas reconocer una familia de carbohidratos llamados ácidos siálicos o ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) que se expresan abundantemente en las superficies de células huésped. En la figura 5 b se muestra el reconocimiento de los receptores de ácido siálico (Siglec), los residuos clave de reconocimiento son la arginina 97 (Arg97) en la hebra F (conservada en las otras Siglecs) forma un puente salino con el carboxilato de ácido siálico (Neu5Ac) y dos triptófanos (TRP2 y Trp106) sobre las cadenas b-plegadas A y G forman se forman contactos hidrófobos con el N-acetilo y grupos glicerol secundarios de Neu5Ac respectivamente.



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

En términos generales, la activación celular está regulada por el equilibrio dinámico de los receptores activadores e inhibidores. La fosforilación de tirosinas y la desfosforilación de las proteínas constituyen los principales acontecimientos de regulación en la transducción de señales que conducen a la proliferación, diferenciación y muerte. En condiciones de estado estacionario, la fosforilación de las tirosina de las proteínas intracitoplasmicas están dictaminadas por las acciones opuestas de la proteína tirosina cinasas (PTK) y la proteína tirosina fosfatasas (PTP).⁵⁶

Los dominios intracelulares de activación se conoce como immunoreceptores y contienen motivo de activación basados en tirosina (ITAM) y su fosforilación resulta en el reclutamiento y la activación de tirosina cinasas (PTK) citoplasmáticas que inicia una cascada de transducción de señal. En contraste, los receptores inhibidores poseen un immunoreceptor denominado motivos de inhibición basado de tirosina (ITIM). La fosforilación de tirosina de los motivos del ITIM recluta a las proteínas tirosina- fosfatasa (PTP), específicamente a las proteínas Src-homology 2 domain (SHP) que bloquean la señalización proveniente de los receptores de activación. El dominio citoplasmático del CD33 humano contiene dos secuencias ITIM, las tirosinas 324(LHYASL) y 342 (TEYSEV) que reclutan a las proteínas SHP1 y SHP2.^{57,58}

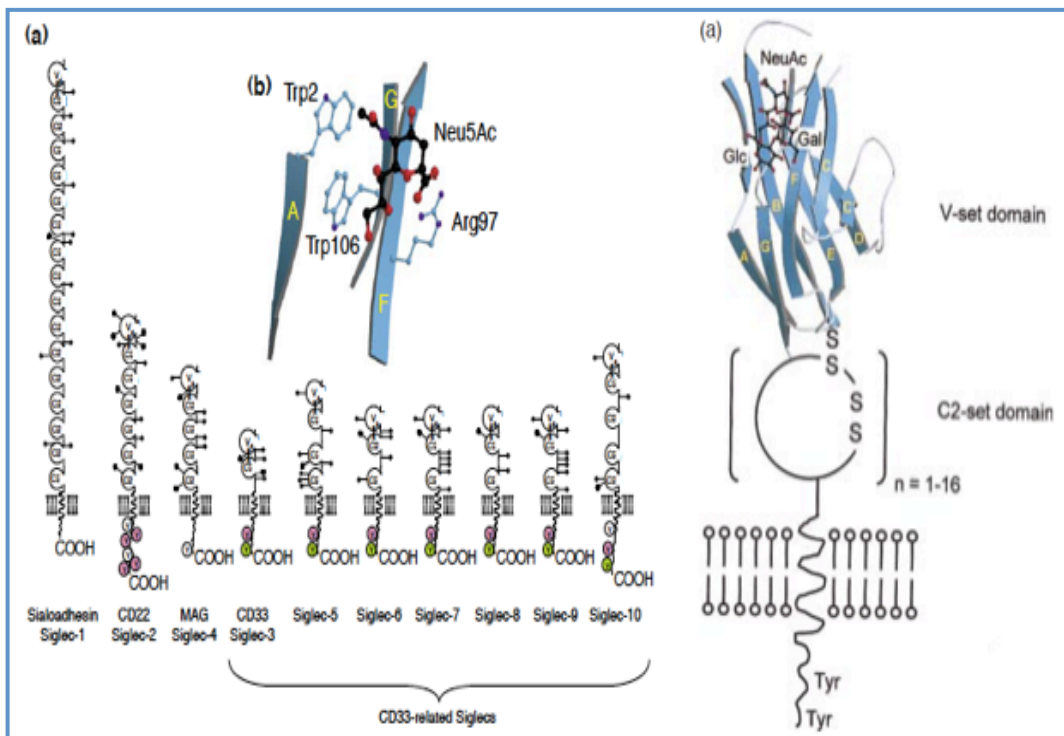


Figura 5 | Características estructurales de Siglecs. (a) Siglecs son proteínas de membrana con una región extracelular que contiene un dominio V y un dominios C2 semejante a las Ig (b) Principales residuos implicados en el reconocimiento del ácido siálico por los Siglecs. (Imagen publicada por Paul R. Crocker and Ajit Varki en TRENDS in Immunology 2001).⁵⁵

La función de CD33 es inhibir la activación de los monocitos durante las interacciones celulares y la ausencia o disminución de las moléculas CD33 en la superficie celular de los monocitos induce la producción de citocinas inflamatorias de forma espontánea. La disminución de CD33 y / o de su ligando resulta en la



secreción de IL-1 β , IL-8, y TNF- α (Figura 6). Debido a que la función de CD33 es inhibir la activación celular no específica, otros estímulos provenientes de la activación del receptor de las células T (TCR), del receptor de inmunoglobulina G (Fc γ R), o por productos bacterianos como el lipopolisácarido (LPS) están específicamente acompañados por disminución en la expresión de CD33 en superficie celular de los monocitos.

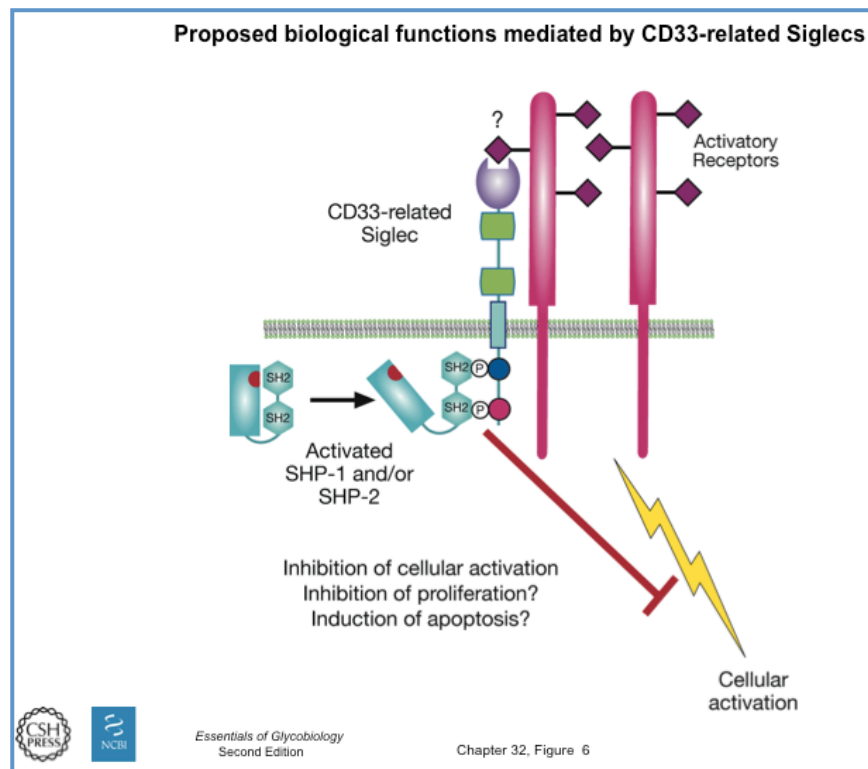


Figura 6 | Funciones biológicas mediadas por CD33. El entrecruzamiento de CD33 con receptores activadores (por ejemplo Fc γ RI) recluta las fosfatasas inhibitoras de tirosina SHP-1 y SHP-2 para inhibir la señalización de activación. (Imagen publicada por Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al. Essentials of Glycobiology. 2nd edition, 2009)



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

La actividad represora de CD33 es directamente dependiente de la interacción con su ligando, el ácido siálico. La disminución de CD33 en la superficie de la célula (por bloqueo con anticuerpos anti-CD33 o por el tratamiento con RNA interferente contra CD33) o por la disminución de su ligando el ácido siálico (con tratamiento con la enzima neuraminidasa), resulta en la activación celular.^{54, 59} En condiciones de reposo la molécula CD33 se expresa constitutivamente, sin embargo, bajo condiciones inflamatorias o patológicas la molécula CD33 es regulada por la molécula supresora de la señalización de citocinas 3 (SOCS3) (Figura 7). La familia de supresores de la señalización de citoquinas (SOCS), se ha implicado en el control de la respuesta inmune mediante la acción de las citocinas, actuando así en una manera inhibitoria. SOCS3 une a las tirosinas fosforiladas de CD33, compitiendo con SHP-1/2 y lleva a la degradación proteosomal del SOCS3 junto con CD33.^{60, 61} Así, SOCS y CD33 son degradados, la eliminación de CD33 es una vía de control de la inflamación. Este mecanismo es un vía importante de la respuesta de defensa del hospedero. Por otro lado, hay evidencias de que SOCS3 incrementa su expresión en monocitos de pacientes con diabetes tipo 2 por efecto de la hiperglucemia.⁶²

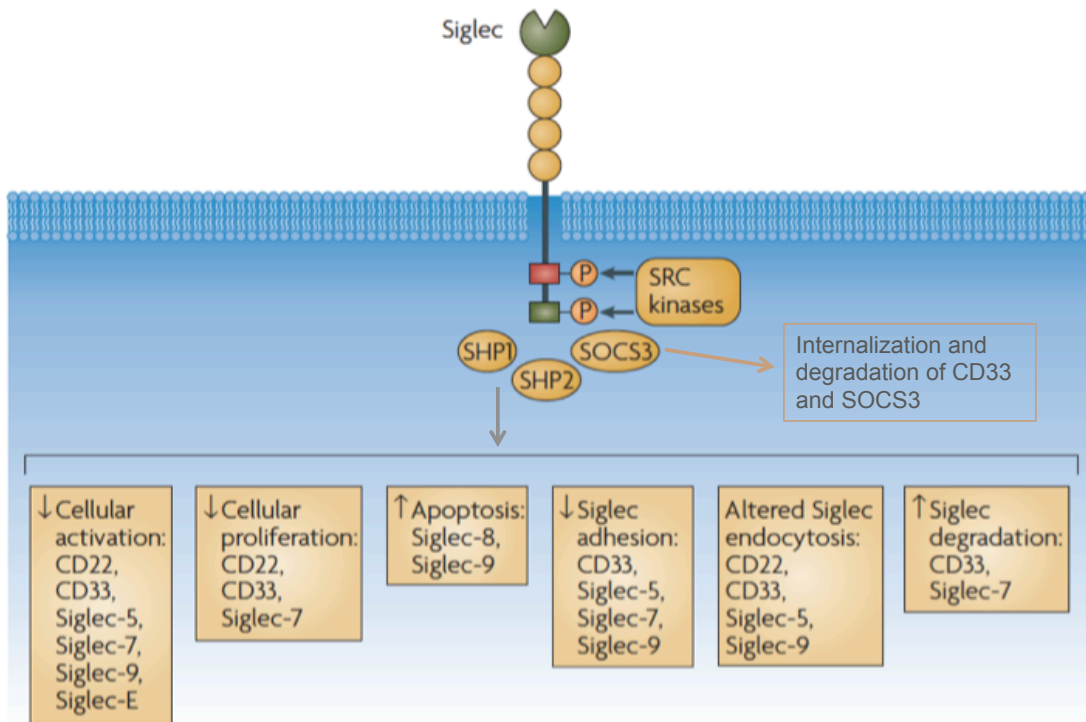


Figura 7 | Señalización mediada por los Siglecs relacionados a CD33. Los motivos de tirosinas fosforiladas reclutara las proteínas SHP ó SOCS3 (supresor de citocinas de señalización. El reclutamiento de SHP activa las funciones represoras de CD33, mientras que el reclutamiento de SOCS3 induce la degradación de CD33 junto con SOCS3. (Imagen modificada de: Siglecs and their roles in the immune system, de Paul R. Crocker, Nature Reviews Immunology, 2007)⁶³



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica que afecta a 150 millones de individuos en el mundo y se calcula que estas cifras se duplicarán en el 2030, lo que significa que la DM es ahora una epidemia. En México la DM afecta entre el 10 a 15% de la población adulta. En los pacientes con diabetes mellitus, la hiperglucemia está asociada al estado de inflamación crónica sistémica. El estado inflamatorio crónico está vinculado con la resistencia a la insulina, la apoptosis de las células β pancreáticas, y la disfunción de la respuesta inmune. Aunque se han descrito diferentes vías por las cuales la hiperglucemia induce inflamación, aún se desconoce que mecanismo contribuye a la inflamación sistémica crónica asociada a la hiperglucemia, por este motivo en el presente trabajo se evaluó el papel de la molécula CD33 en la secreción de citocinas inflamatorias por los monocitos de sangre periférica.



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

HIPÓTESIS

La hiperglucemia disminuye la expresión de CD33 en pacientes con DM2 y en monocitos de sujetos sanos expuestos a altas concentraciones de glucosa y esta disminución se asocia con el incremento en la producción de citocinas pro-inflamatorias.



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la expresión de CD33 y la producción de citocinas inflamatorias en monocitos de pacientes con diabetes tipo 2, y en un modelo *in vitro* de hiperglucemia en monocitos de sujetos sanos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1| Evaluar la expresión de CD33 en la superficie celular y la expresión del RNAm en monocitos de sangre periférica de pacientes con DM2 y sujetos sanos.
- 2| Cuantificar las citocinas inflamatorias IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 y TNF- α en el plasma de pacientes con DM2 y sujetos sanos.
- 3| En un modelo *in vitro* de hiperglucemia, evaluar la expresión de CD33 tanto en la superficie celular como la expresión del RNAm en monocitos de sangre periférica de sujetos sanos cultivados con diferentes concentraciones de D-glucosa.



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

4|En un modelo *in vitro* de hiperglucemia, cuantificar las citocinas inflamatorias IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 y TNF- α secretadas por monocitos de sujetos sanos cultivados en altas concentraciones de D-glucosa.

5|En un modelo *in vitro* de hiperglucemia, evaluar la participación de las especies reactivas de oxígeno y la expresión de SOCS3 en monocitos de sujetos sanos cultivados en altas concentraciones de D-glucosa.



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

MATERIAL Y MÉTODOS

GRUPOS DE ESTUDIO.

Este protocolo fue aprobado por el comité de ciencia y bioética institucional. Los pacientes con DM2 fueron invitados a participar y reclutados en la clínica de síndrome metabólico del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Se incluyeron 21 pacientes con diagnóstico de DM2 y 26 sujetos sanos, todos los participantes otorgaron su consentimiento informado por escrito. El diagnóstico de DM2 se realizó de acuerdo con los criterios de Asociación Americana de Diabetes (ADA).¹ Cuando el paciente presente: un valor de hemoglobina glucosilada (HbA1c) mayor a 6.5%, o glucosa plasmática en ayunas (FPG) mayor a 126 mg/dl (7.0 mmol/l) el ayuno se define como ausencia de ingesta calórica por lo menos durante 8 horas, o muestre una prueba de tolerancia a la glucosa mayor a 200 mg/dl (11.1 mmol/l) utilizando una carga de glucosa que contiene el equivalente de 75 g de glucosa, o en los casos que un paciente presente síntomas clásicos de crisis de hiperglucemia con una glucosa plasmática al azar mayor a 200 mg/dl (11.1 mmol/l).



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

SEPARACIÓN DE MONOCITOS.

De cada uno de los voluntarios se obtuvieron 60ml de sangre periférica heparinizada y se separaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por centrifugación sobre ficoll-Hypaque (Lymphoprep ®NycomedPharma, Oslo, Noruega).⁶⁴ Los monocitos se separaron por selección positiva utilizando microperlas magnéticas recubiertas con anticuerpo anti-CD14 utilizando el kit de Miltenyi por selección positiva (MACS ® Miltenyi Biotech, Auburn, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se reservó una muestra de 0.2×10^6 PBMC antes de realizar la tinción para el análisis de pureza.

Posteriormente las PBMC se incubaron con anticuerpos anti-CD14 acopladas a microesferas metálicas (MicroBeads) y se incubaron durante 15 minutos a 4°C, y se realizaron 3 lavados con amortiguador de fosfatos (PBS, Cambrex, Walkersville, MD), 0.5% de albúmina serica bovina (Sigma St. Louis, MO), 2 mM de EDTA (Sigma), a pH 7,2) y al final, las PBMC se resuspendieron en 1 ml de PBS. La separación se realizó con una columna (LS), y un magneto separador MACS. Se colocó la columna sobre el magneto y sobre la columna un microfiltro, se humedeció la columna y el filtro adicionando 3 ml de PBS, posteriormente se adicionó la suspensión celular, las células negativas pasan libremente y fueron colectadas en un tubo como fracción negativa, las células no adheridas que son retenidas en la columna se removieron adicionando 3 veces 1



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

ml de PBS, de esta fracción se extrajo una muestra de 0.2×10^6 células para el análisis de pureza. Por último, la fracción positiva de monocitos CD14⁺ fue colectada retirando la columna del separador, adicionando 3 ml de PBS y con ayuda del émbolo se empujó firmemente para obtener la fracción positiva. De la fracción positiva se extrajo una muestra de 0.2×10^6 de células CD14⁺ para el análisis de pureza por citometría de flujo.

ENSAYOS DE PUREZA CELULAR.

La pureza de los monocitos CD14⁺ se evaluó por citometría de flujo usando anticuerpos anti-humano CD14. Brevemente, 0.2×10^6 de las células totales, de las fracciones positiva y negativa fueron incubadas con anticuerpo monoclonal anti-CD14-FITC (BD Biosciences, San Jose, CA) durante 15 minutos a temperatura ambiente, y el exceso de anticuerpo se eliminó adicionando 1 ml de solución de lavado para FACS (PBS, 2% suero de bovino fetal), las células fueron resuspendidas en un volumen final de 200 μ l de Buffer para FACS y se adquirieron 10,000 eventos de cada fracción, la pureza se analizó con el programa CellQuest software versión 3,1 (BD biosciences) y los datos fueron reportados como porcentaje de células CD14⁺.



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

MEDIOS Y CULTIVOS CELULARES.

Las células fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Cambrex, Walkersville, MD) suplementado con 50 ug/ml de sulfato de gentamicina (Sigma, St. Louis, MO) , 2.0 mmol/l de L-glutamina (Sigma) y 10% de suero humano inactivado por calor (Gemini Bioproducts, Sacramento, CA) a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Para los cultivos de hiperglucemia *in vitro*, se utilizó medio RPMI 1640 sin glucosa (Sigma) y fue suplementado con D-glucosa (Sigma) a una concentración de 5,5 mmol/l (concentraciones de glucosa normal equivalente a 99 mg/dl), o suplementados con alta glucosa concentración final de D-glucosa de 15, 20, 30, ó 50 mmol/l.

EXPRESION DE CD33.

La expresión de CD33 en la superficie celular se evaluó en monocitos de sangre periférica recién obtenida de un grupo de pacientes con DM2 y un grupo de voluntarios sanos. Una concentración de 5×10^5 PBMC fueron incubadas con los anticuerpos monoclonales anti-CD33 humano acoplado a ficoeritrina (PE), anti-CD3 humano acoplado a PerCP y anti-CD14 acoplado a FITC (BD Biosciences) o con los respectivos controles de isotipo durante 15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se eliminó el exceso de anticuerpo con 1 ml de solución de lavado para FACS. Las células fueron resuspendidas en 200 µl de



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

paraformaldehído al 1% y se analizó la expresión de CD33 por citometría de flujo. Los resultados se expresan como la intensidad de fluorescencia media (IMF) de 20.000 eventos adquiridos en un citómetro de flujo FACS Calibur (BD Biosciences). Los datos fueron analizados con el programa CellQuest software versión 3,1 (BD Biosciences).

MODELO DE HIPERGLUCEMIA IN VITRO.

Para los ensayos de hiperglucemia *in vitro*, se utilizaron monocitos de voluntarios sanos purificados por la técnica de miltenyi a partir de sangre periférica. Los monocitos CD14⁺ a una concentración de 5×10^5 células/ml fueron resuspendidos en medio RPMI con diferentes concentraciones de glucosa 5.5 (90 mg/dL), 15 (270 mg/dL), 20 (360 mg/dL) y 30 (540 mg/dL) mmol/l, en placas de 24 pozos de baja adherencia, y se incubaron a 37° C y 5% CO₂ durante 7 días. Posteriormente las células fueron separadas mecánicamente por pipeteo, y se evaluó la viabilidad celular por el método de MTT.



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

VIABILIDAD CELULAR POR ENSAYOS DE MTT.

La viabilidad de los monocitos fue evaluada por el ensayo de reducción de 3 (4,5-dimetiltiazol) 2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma). Brevemente, 2×10^5 células / pozo fueron cultivados durante 3h en presencia de MTT (0,3 mg/ml), posteriormente se aspiró el medio y se adicionó isopropanol, se agitó suavemente durante 5 minutos para solubilizar los cristales de formazan. Se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas (Multiskan Accent, Thermo). Los datos fueron expresados como el porcentaje con respecto a 5.5 mmol/l de D-glucosa. La viabilidad celular se evaluó 7 días después de los tratamientos de glucosa.

EXTRACCIÓN DEL RNA.

En los grupos de pacientes con DM2 y de voluntarios sanos la extracción del RNA total se realizó a partir de 5×10^5 monocitos recién purificados de sangre periférica. En los cultivos de hiperglucemia *in vitro* 5×10^5 monocitos purificados de voluntarios sanos fueron cultivados en condiciones de hiperglucemia (15, 30, o 50 mmol/l de D-glucosa) o en condiciones normoglucémicas (5.5 mmol/l de D-glucosa) durante 7 días. En ambos experimentos el RNA total fue extraído de los monocitos utilizando el kit RNeasy Mini (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) como se describe: De las células en cultivo (5×10^5) se eliminó el medio de cultivo y se



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

adicionó la solución de lisis (RLT,) el lisado se transfirió a un tubo ependorff de 1.5 ml y se adicionó etanol al 70%. Se colocó una columna RNeasy Mini sobre un tubo de 2 ml, se adicionó en la columna la mezcla del lisado con etanol y se centrifugó. Posteriormente se adicionaron las soluciones de (RW1 y RPE, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) a la columna RNeasy centrifugando entre cada solución. Por último se adicionó agua libre de RNasas directamente a la membrana columna, y se centrifugó para obtener el RNA total.

SÍNTESIS DE DNA COMPLEMENTARIO.

El DNA complementario se sintetizó por transcripción reversa del RNA total utilizando el Kit SuperScript® III Reverse Transcriptase (Life Technologies, NY, USA). Brevemente, se mezcló el RNA total, los hexámeros aleatorios, la mezcla desoxirribonucleósidos-trifosfato (dTTP, dATP, dCTP dGTP) a un volumen de reacción de 25 μ l. Se incubó a 65°C durante 5 min, y 1min a 4°C. Posteriormente se adicionó 10 μ l de una mezcla que incluye el amortiguador para la reacción de transcripción, Dithiothreitol 25 mM, MgCl₂ 0,1 M, RNaseOUT (40 U/l) y la enzima SuperScript III RT (200 U/l) y se incubó 10 min a 25°C, seguido por 50 min a 50°C, y la reacción se terminó a 85°C durante 5 min y 1 minuto a 4°C. Por último se añadió 1 ml de RNasa H (Life Technologies, NY, USA) a cada tubo y se incubó durante 20 min a 37°C. El proceso de síntesis se realizó utilizando un termociclador (iCycler, Bio-Rad, Hercules, CA).



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA qPCR.

Se cuantificó la expresión del RNAm de CD33, IL 1 β , IL-6, TNF- α , y el gen constitutivo 18S ribosomal con las siguientes sondas pre-diseñadas: CD33(Hs00233544_m1), TNF- α (Hs01000485_m1), IL-1 β (IHs0174097_m1), IL-6(Hs00985639_m1), SOCS-3(Hs01000485_g1), y 18S (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Brevemente, se realizó una mezcla del DNA complementario (diluido 1:5), los iniciadores, las sondas pre-diseñadas, la enzima Taq polimerasa y el amortiguador para PCR Master Mix (Qiagen) [esta mezcla contiene la enzima DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq-Polimerasa), cloruro de magnesio (MgCl₂), los desoxirribonucleósidos-trifosfato dTTP, dATP, dCTP y dGTP,(dNTPs) en un amortiguador a concentraciones optimizadas]. Posteriormente se adicionó 25 μ l de esta mezcla por triplicado en una placa de reacción de 96 pozos, y se amplificaron en un termociclador ABI Prism 7700 (Applied Biosystems), las temperaturas de amplificación utilizadas fueron 50°C por 2 min, 95°C por 10 minutos iniciales y posteriormente 40 ciclos a 95°C por 30s y 62°C por un minuto. Los resultados se analizaron de acuerdo al método $\Delta\Delta$ Ct (el primer Δ ó incremento, se hace respecto al gen constitutivo 18s y el segundo Δ , respecto al control D-glucosa a 5.5 mmol/l) y se reportaron como el número de veces de incremento o decremento en con respecto a la condición de 5,5 mmol/l de D-glucosa.



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

CUANTIFICACION DE CITOCINAS INFLAMATORIAS.

Cultivos de monocitos (5×10^5 células/ml) de voluntarios sanos se cultivaron en condiciones de baja o alta glucosa (5,5 o 50 mmol/l D-glucosa) durante 7 días en placas de 24 pozos. Se colectaron los sobrenadantes y se congelaron a -20 °C. La IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 (Forma activa formado por un heterodímero de una cadena ligera de 35-kDa y una cadena pesada de 40-kDa) y TNF- α se cuantificaron en los sobrenadantes de las células cultivadas en condiciones hiperglicemia in vitro y en el plasma de pacientes con DM2 y sujetos sanos, utilizando el KIT de inflamación de CBA (BD Biosciences). Brevemente, 50 μ L de un cóctel de anticuerpos anti-, TNF- α , IL-1- β , IL-6, IL-8, IL-10, e IL-12 p70 acoplados a PE se mezclan con 20 μ L de una mezcla de perlas de captura para cada citocina con diferente intensidad media de fluorescencia (IMF) y 50 μ L de la muestra ó el coctel de citocinas para la curva estándar, la mezcla se agitó perfectamente y se incubaron durante 3h a temperatura ambiente protegidos de la luz, después se adicionó 1 ml de solución amortiguadora de lavado a cada tubo de ensayo para eliminar el exceso de anticuerpos o perlas y se centrifugó a 200 g durante 5 minutos. Posteriormente se adicionó a cada muestra 300 μ l de amortiguador PBS-BSA. Las muestras fueron adquiridas con el software CBA (BD) para 6 analitos en un FACsCalibur. Los resultados fueron cuantificados con base a la curva estándar y los resultados se expresan como pg/ml.



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

TRATAMIENTO CON TOCOFEROL.

El α -tocoferol se utilizó como antioxidante en cultivos de monocitos de voluntarios sanos. El stock de α -tocoferol disuelto en DMSO se diluyó protegido de la luz en pool de suero humano (PHS) a una concentración de 100 mM al momento del experimento. En placas de 24 pozos de baja adherencia se adicionaron los 5×10^5 monocitos CD14⁺ y se les adicionó 100 mmol/l de α -tocoferol o DMSO, se incubaron durante 20 minutos y se añadió las condiciones de hiperglucemia *in vitro* adicionando medio RPMI con D-glucosa a una concentración final de 5.5 o 50 mmol/l.

DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO.

El marcador fluorescente 5 - (y 6) carboxi-2 ,7-dichlorodihydrofluorescein diacetato (carboxi-HZDCF-DA, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregón, EE.UU.) se utilizó para evaluar la producción de ROS. Carboxi-HZDCF-DA entra en la célula y es desacetilada, oxidado por el oxígeno reactivo y especies de nitrógeno y se convierte en el compuesto fluorescente 5 - (y 6 -) carboxi-2 ,7-diclorofluoresceína (carboxi DCF). Después de la incubación con diferentes tratamientos, las células fueron incubadas con 10 mM carboxi-HZDCF-DA durante 30 min a 37° C con CO₂ al 5%. Posteriormente, las células fueron teñidas con PE-anticuerpos anti-CD33 humano y PerCP marcado anti-CD3



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

humanos o los controles de isotipo. Carboxi DCF fluorescencia se evaluó en CD33 células positivas por citometría de flujo. Los resultados se expresaron como la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en intensidad media de Fluorescencia (carboxi-DCF IMF), basado en 20.000 eventos adquiridos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Todos los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (SD). Para comparar dos grupos se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney para datos no paramétricos. Para múltiples comparaciones se utilizó la prueba de Friedman que evalúa la diferencia de las medianas seguida de la prueba de Dunnett que compara los tratamientos con un grupo control. Los datos fueron analizados utilizando el software graph pad prism (versión 5.0). Un valor de $P \leq 0,05$ se consideró como estadísticamente diferente.



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO.

Las características demográficas de participantes en el estudio se detallan en la Tabla 1. Se analizaron 21 pacientes con diagnóstico de DM2 y 26 sujetos sanos. El análisis no mostró diferencias significativas respecto al género, la edad, el índice de masa corporal (IMC), la creatinina, el colesterol, la LDL y HDL entre el grupo de pacientes con DM2 y el grupo control. Como se esperaba los niveles de glucosa y de hemoglobina glucosilada (HbA1c) fueron significativamente mayores en los pacientes con DM2 respecto a los voluntarios sanos. No se observó ninguna otra diferencia clínica entre los grupos, aunque cabe mencionar que el valor de triglicéridos se encontró incrementado en ambos grupos. Los pacientes con DM2 habían recibido tratamiento hipoglucemiante (metformina y / o glibenclamida) al momento de la toma de muestra, ninguno de los pacientes estaba recibiendo otro medicamento concomitante.



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

LA MOLÉCULA CD33 ESTA DISMINUIDA EN MONOCITOS DE PACIENTES CON DM2.

Para evaluar si la expresión de CD33 está disminuida en los monocitos de sangre periférica de los pacientes con DM2, se realizó un análisis de la expresión de CD33 en la superficie de los monocitos por citometría de flujo y se analizó la expresión de RNAm de CD33 por medio de ensayos por PCR en tiempo real (qPCR). Como se muestra en la Figura 1, se observó una disminución significativa de la expresión de CD33 en los monocitos obtenidos de pacientes con DM2 en comparación con voluntarios sanos ($P < 0,05$) (Figura 1A). Al analizar la expresión del RNAm de CD33 también se observó una disminución en el grupo de pacientes con DM2 (Figura 1B). Debido a que CD33 es un regulador positivo de la producción de citocinas, estos hallazgos sugieren que la baja expresión de CD33 podría estar involucrada con el incremento de citocinas inflamatorias observado en los pacientes con DM2.



Tabla 1. Características demográficas y clínicas de los grupos de estudio.

	DM2	Sanos	P
n	21	26	
Género (H/M)	8 / 13	6 / 20	0.0832
Edad (años)	51.16 (10.17)	48.48 (9.42)	0.1868
BMI (kg/m ²)	27.85 (4.64)	28.32 (2.22)	0.4579
Glucosa (mg/dl)	265.30 (79.71)	96.28 (9.19)	< 0.0001 *
Creatinina (mg/dl)	0.70 (0.24)	0.76 (0.12)	0.0757
Colesterol (mg/dl)	211.50 (37.15)	212.00 (43.44)	0.4547
Triglicéridos (mg/dl)	295.50 (297.10)	198.00 (116.80)	0.0171 *
LDL colesterol (mg/dl)	129.30 (37.29)	134.60 (34.26)	0.5
HDL colesterol (mg/dl)	45.16 (8.96)	46.08 (12.23)	0.4019
Hb1Ac (%)	10.42 (2.04)	5.58 (0.25)	< 0.0001 *
Tiempo desde el diagnóstico (años)	7	-	

Media de los datos con SD. *P corresponde a la diferencia entre DM2 y sanos.

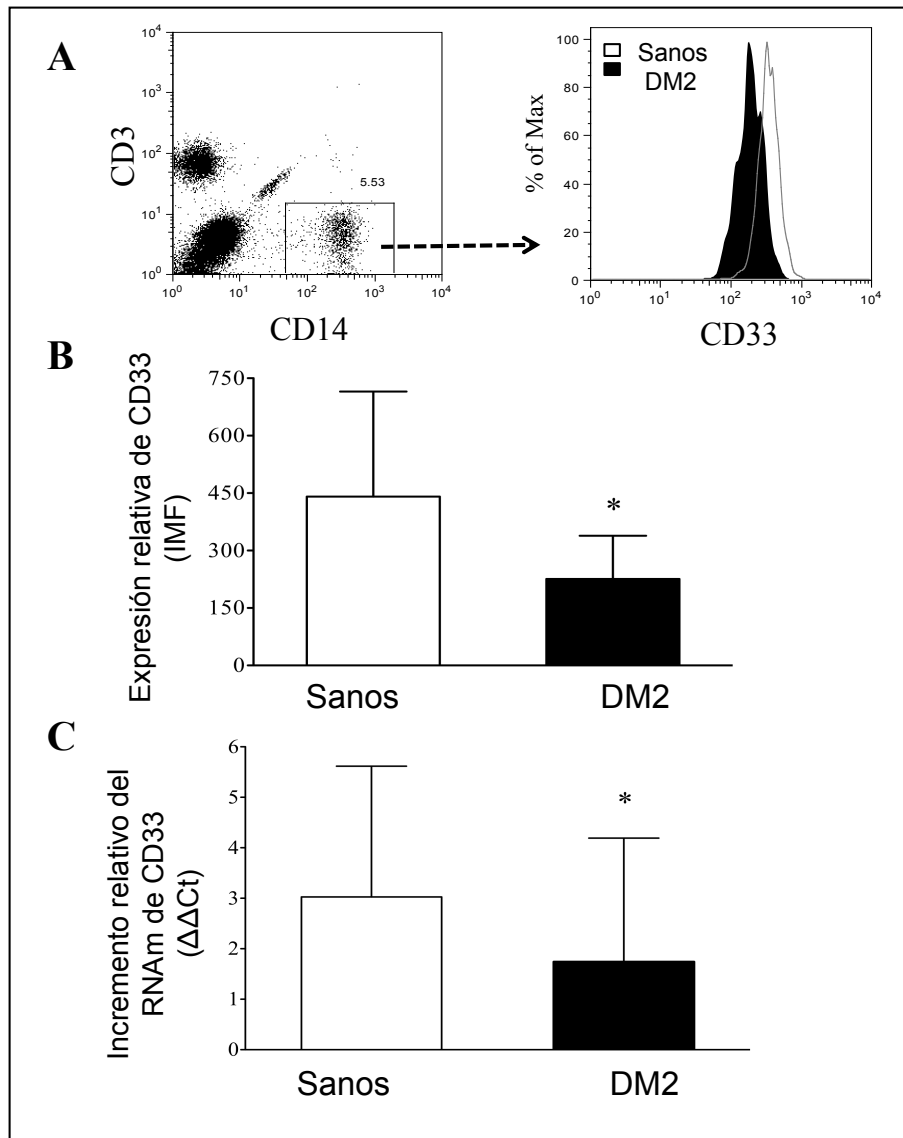


Figura 1 | Expresión de CD33 en monocitos de pacientes DM2. (A) La sangre recién aislada se incubó con anticuerpos anti-CD3, CD14 y CD33 para identificar la intensidad media de fluorescencia (IMF) de CD33 en los monocitos. El análisis se realizó en las células CD3⁺CD14⁺ (*dot plot*), y posteriormente se realizó un histograma de la expresión de CD33 en los pacientes con DM2 (histograma relleno) y de los sujetos sanos (histograma abierto). (B) Grafica de barras que muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF) de CD33 en los monocitos recién aislados de pacientes con DM2 (n=10) y los voluntarios sanos (n=10). Los datos se presentan como media \pm desviación estándar. El * indica una $P < 0,05$ en comparación con donantes sanos. (C) Análisis de expresión del ARNm de CD33, en los monocitos de pacientes con DM2 (n=9) y voluntarios sanos (n = 8). Los resultados se analizaron de acuerdo al método $\Delta\Delta Ct$, y los datos se presentan como media \pm desviación estándar. El * indica una $P < 0,05$ en comparación con los voluntarios sanos.



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

CITOCINAS INFLAMATORIAS EN PACIENTES CON DM2.

Para conocer si la reducción de CD33 en los monocitos de los pacientes con DM2 se asociaba con un incremento en la producción de citocinas pro-inflamatorias, se cuantificó los niveles de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, y TNF- α en el plasma de los pacientes con DM2 y en los voluntarios sanos por citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 2, todas las citocinas pro-inflamatorias evaluadas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, y TNF- α) se encontraron incrementadas en los pacientes con DM2, aunque este aumento fue significativo solo para TNF- α , la IL-8, y la IL-12p70 con respecto a los individuos sanos ($p < 0,05$) (Figura 2A). Posteriormente se evaluó la expresión del RNAm de la citocinas IL-1 β , IL-6, y de TNF- α en los monocitos de pacientes con DM2 y en voluntarios sanos por qPCR. En la Figura 2b se muestra la expresión del RNAm de TNF- α , donde se observa que los monocitos de pacientes con diabetes tipo 2 tenían significativamente más mensajero de esta citocina que los voluntarios sanos ($P < 0,05$), sin diferencias en la expresión de la IL-1 β y IL-6 (datos no presentados).



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

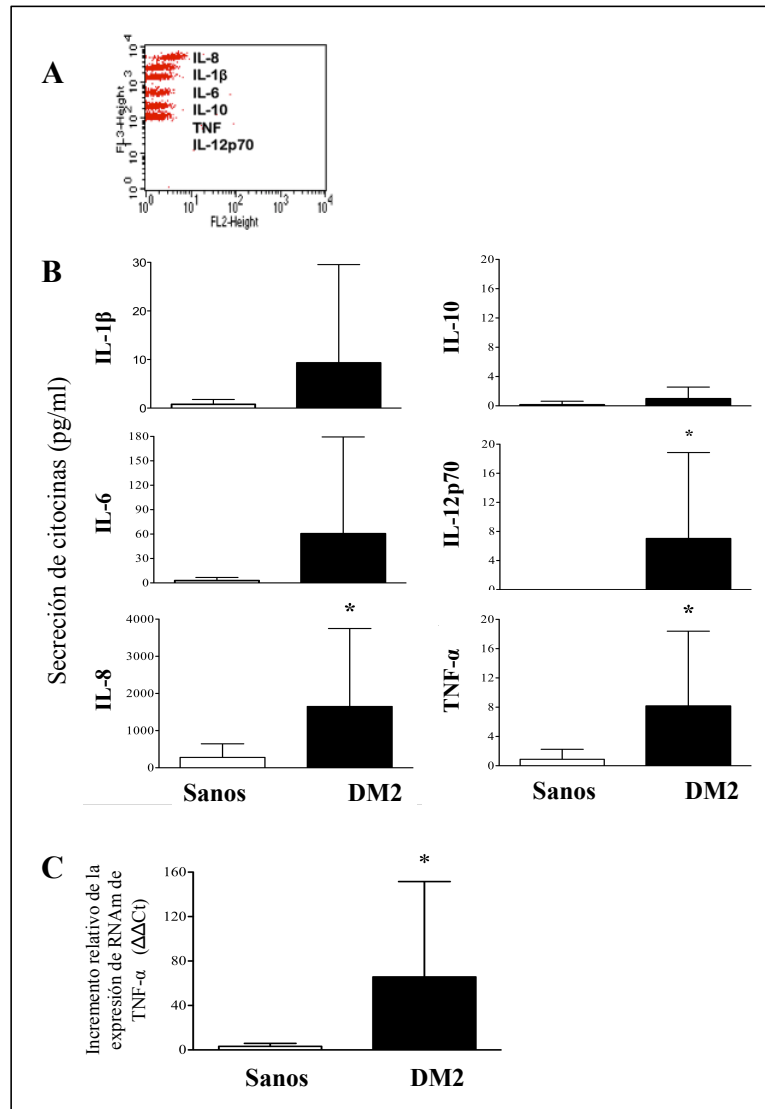


Figura 2 | Cuantificación de citocinas inflamatorias en pacientes con DM2. En el plasma de los pacientes con diabetes tipo 2 y controles sanos se evaluaron las citocinas inflamatorias IL-8, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12p70 y TNF-α utilizando el kit CBA. (A) Dot plot representativo de la cuantificación simultánea de citocinas por citometría de flujo. (B) Los gráficos de barras muestran la cuantificación de estas citocinas en los pacientes con DM2 (n=14) y controles sanos (n=10). Todos los datos se presentan como media ± desviación estándar. El * representa una P < 0,05 en comparación con los voluntarios sanos. (C) La expresión de RNAm de TNF-α se analizó en los monocitos obtenidos de pacientes con DM2 (n=7) y voluntarios sanos (n=9). Los resultados se expresan de acuerdo al método ΔΔCt, y los datos se presentan como la media ± DE. * P < 0,05 en comparación con voluntarios sanos.



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

LA HIPERGLUCEMIA IN VITRO DISMINUYE LA EXPRESIÓN DE CD33.

CD33 es una molécula reguladora de la producción de citocinas, y niveles bajos de su expresión ha sido asociada con la producción de citocinas inflamatorias. Por lo tanto, para evaluar si la hiperglucemia *in vitro* tiene un efecto sobre la expresión de CD33 en la superficie de monocitos de voluntarios sanos. Se realizó un cultivo de monocitos CD14⁺ en presencia de diferentes concentraciones de D-glucosa (desde 5.5 -50 mmol/l) y se evaluó la expresión de CD33 por citometría de flujo. La figura 3A y 3B muestra que la expresión de CD33 se disminuye significativamente en los monocitos de voluntarios sanos cultivados en presencia de 30 o 50 mmol/l glucosa con respecto a monocitos cultivados con concentraciones normales de glucosa (5,5 mmol/l D-glucosa) ($p < 0,05$).

Para investigar si la glucosa también afecta la transcripción del RNAm de CD33, se realizaron ensayos de monocitos en las condiciones previamente descritas (ensayos paralelos) y se evaluó la expresión del RNAm de CD33. Como se muestra en la figura 3C la expresión del ARNm de CD33 es significativamente menor en los monocitos cultivados en el 15, 30 ó 50 mmol/l de D-glucosa respecto a concentraciones normales de glucosa (5,5 mmol/l de D-glucosa) ($p < 0,05$).

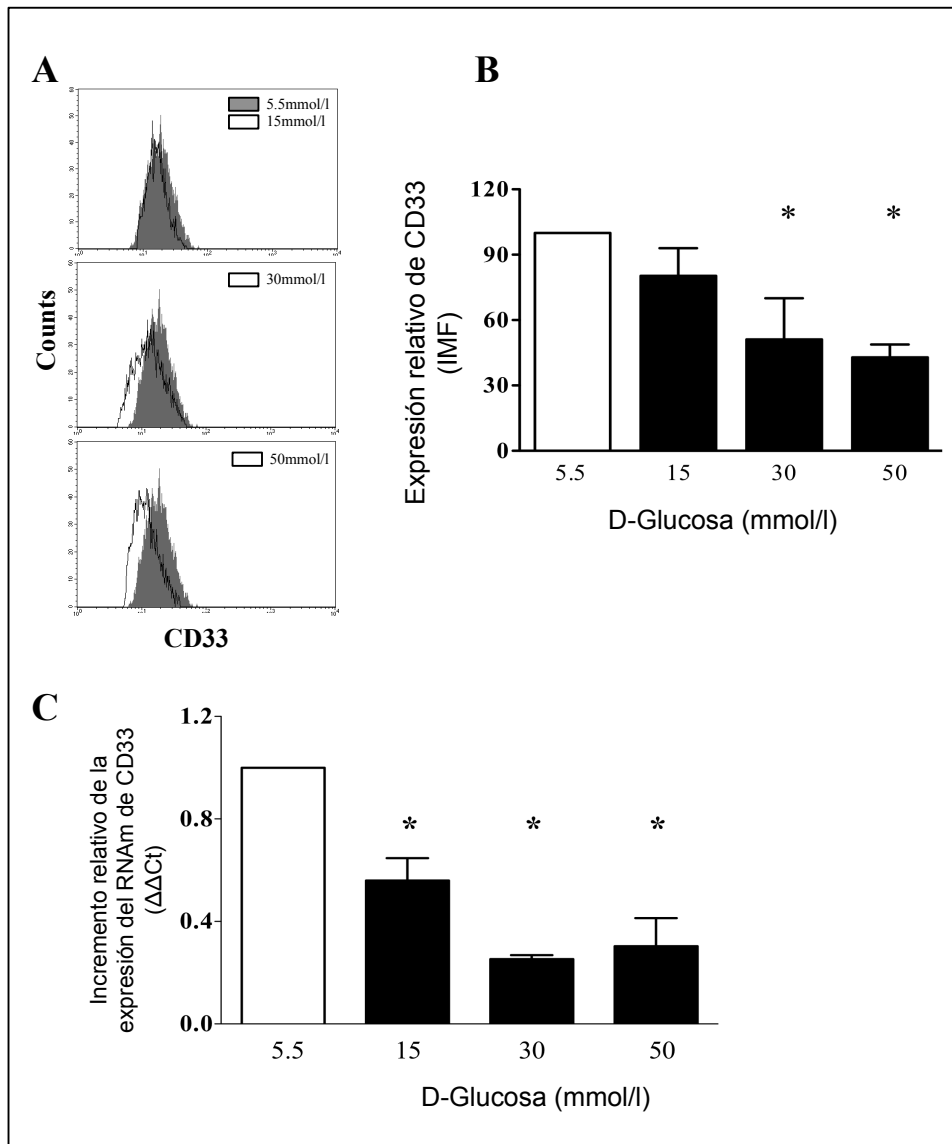


Figura 3 | Las altas concentraciones de glucosa disminuye la expresión de CD33. Los monocitos de voluntarios sanos se cultivaron en presencia de D-glucosa (5,5, 15, 30, o 50 mmol/l) durante 7 días. (A) histogramas representativos donde se muestra la expresión de CD33 en los monocitos cultivados con 5,5 mmol/l (histograma gris), 15, 30, ó 50 mmol/l D-glucosa (histograma abierto). (B) Gráficos de barras que muestra la intensidad media de fluorescencia de (IMF) de CD33 en monocitos cultivados en alta glucosa en comparación con aquellos cultivados con glucosa normal. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar (n=6). (C) Expresión del ARNm de CD33, los resultados fueron analizados según el método $\Delta\Delta Ct$ respecto al gen constitutivo 18S. Los datos se presentan como la media \pm SD (n=3). * P < 0,05 en comparación con 5,5 mmol/l de D-glucosa.



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

LA HIPERGLUCEMIA IN VITRO INDUCE LA PRODUCCIÓN ESPONTANEA DE TNF- α .

Para evaluar si la disminución de CD33 por la hiperglucemia *in vitro* se asocia con incremento en las citocinas inflamatorias. Se colectaron los sobrenadantes de cultivos de monocitos de voluntarios sanos con concentraciones normales (5.5 mmol/l) y con alta concentración de glucosa (50 mmol/l) después de 7 días y se evaluó la producción de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, y TNF- α usando citometría de flujo. Nuestros resultados mostraron que Las concentraciones de 15 y 30 mmol/l de D-glucosa no inducen una mayor producción de citocinas inflamatorias en comparación con los monocitos cultivados en 5,5 mmol/l de D-glucosa (datos no presentados). Por otro lado observamos que 50 mmol/l de D-glucosa induce un aumento significativo en la secreción espontánea de TNF- α (P <0,05). En ausencia de cambios en la secreción de otras citocinas como IL-1 β e IL-6, estos datos sugieren que la disminución de la expresión de CD33 asociada a altas concentraciones de D-glucosa no es el resultado de la producción autocrina de IL-1 β , IL-6, o IL-8. Finalmente para sustentar el incremento de la producción de TNF- α por la glucosa, se examinó la expresión del RNAm de TNF- α por la técnica de qPCR. Como se muestra en la figura 4B, la expresión de RNAm de TNF- α se incrementa en monocitos cultivados con 50 mmol/l en comparación con 5,5 mmol/l de D-glucosa (p <0,05).

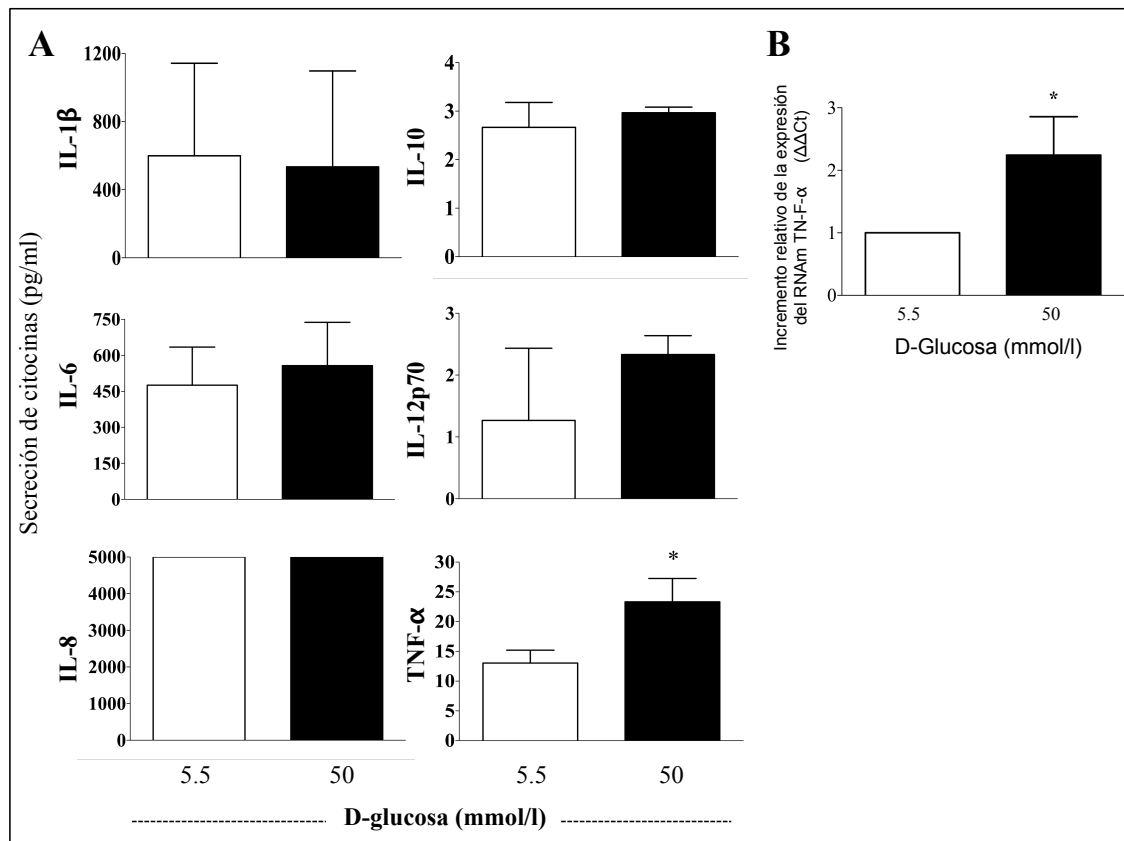


Figura 4 | Efecto de las altas concentraciones de glucosa en las producción de citocinas pro-inflamatoria. Los sobrenadantes de monocitos cultivados en presencia de 5,5 y 50 mmol/l D-glucosa durante 7 días fueron utilizados para la cuantificación de la proteína de IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70 y TNF- α . (A) Los gráficos de barras representan la cuantificación de la producción de citocinas (n=3). (B) La expresión del RNAm de TNF- α en monocitos cultivados en altas concentraciones de glucosa, los resultados analizaron de acuerdo al método $\Delta\Delta Ct$. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar para todos los gráficos (n=3). * P < 0,05 en comparación con el tratamiento con 5,5 mmol/l de D-glucosa.



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

LA HIPERGLUCEMIA IN VITRO INDUCE LA PRODUCCIÓN DE TNF- α EN MONOCITOS QUE EXPRESAN BAJOS NIVELES DE CD33.

Con el fin de investigar si la producción de TNF- α proviene de los monocitos que expresan bajos niveles de CD33. Se analizó la producción de TNF- α en monocitos que expresan bajos niveles de CD33 por citometría de flujo. Como se muestra en la figura 5, concentraciones de 50 mmol/l de D-glucosa disminuye la expresión de CD33 en monocitos e induce la producción espontánea de TNF- α . Interesantemente la glucosa no disminuye la expresión de CD33 en todos los monocitos y una subpoblación mantiene los niveles de CD33 altos y aunque estas células también producen TNF- α el porcentaje es significativamente menor. Por lo tanto, estos resultados indican que la hiperglucemia *in vitro* induce una producción espontánea de TNF- α principalmente en monocitos que expresan bajos niveles de CD33.

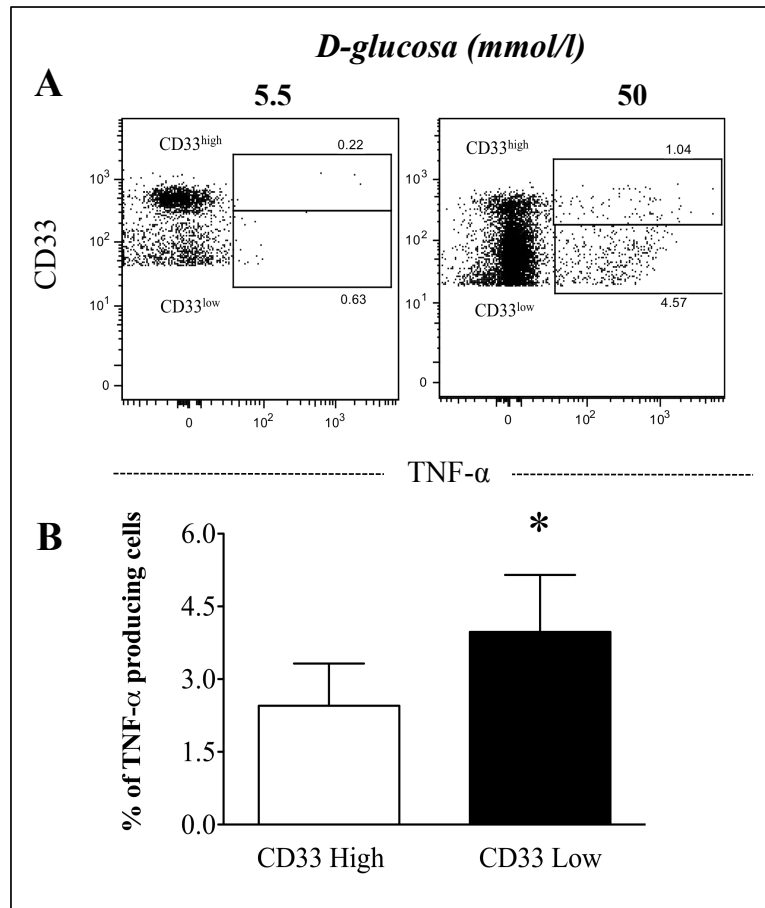


Figura 5 | Producción de TNF- α por monocitos expresando altos niveles de CD33 (*High*) o con baja expresión de CD33 (*Low*). Los monocitos de voluntarios sanos se cultivaron en presencia de alta glucosa durante 7 días y fueron teñidas con anticuerpos anti-CD33 y anti-TNF- α . (A) Grafica de puntos de los porcentajes monocitos produciendo TNF- α cultivados en 5,5 mmol/l (izquierda) o 50 mmol/l (derecha) de D-glucosa (B) El gráfico de barras resume los porcentajes de TNF- α producidos por los monocitos y CD33^{low} CD33^{high} en alta glucosa (50 mmol/l de D-glucosa) (n=4). Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. * P <0,05 en comparación con la producción de TNF- α por los monocitos CD33low y CD33high.



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

LA DISMINUCIÓN DE CD33 Y LA SECRECIÓN DE TNF- α ES PREVENIDA CON EL ANTIOXIDANTE α -TOCOFEROL.

Reportes previos han demostrado que la hiperglucemia induce la producción de TNF- α a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), y que el pre-tratamiento con el antioxidante α -tocoferol reduce la generación de ROS y la producción TNF- α ^{65, 66}. Por lo tanto, se evaluó si la generación de ROS está asociado con la disminución de CD33 y en la producción de TNF- α en monocitos cultivados en altas concentraciones de glucosa.

La figura 6A muestra que altas concentraciones de glucosa (50 mmol/l) induce la generación de ROS, y que el tratamiento previo con α -tocoferol previene la disminución de la superficie de CD33 en la superficie de los monocitos (Figura 6B), el incremento en la expresión del RNAm y la secreción de TNF- α inducida por las altas concentraciones de glucosa (Figura 6C). Estos resultados sugieren que la generación de ROS inducida por la alta glucosa conduce a la regulación negativa de la expresión CD33 y la producción espontánea de TNF- α .

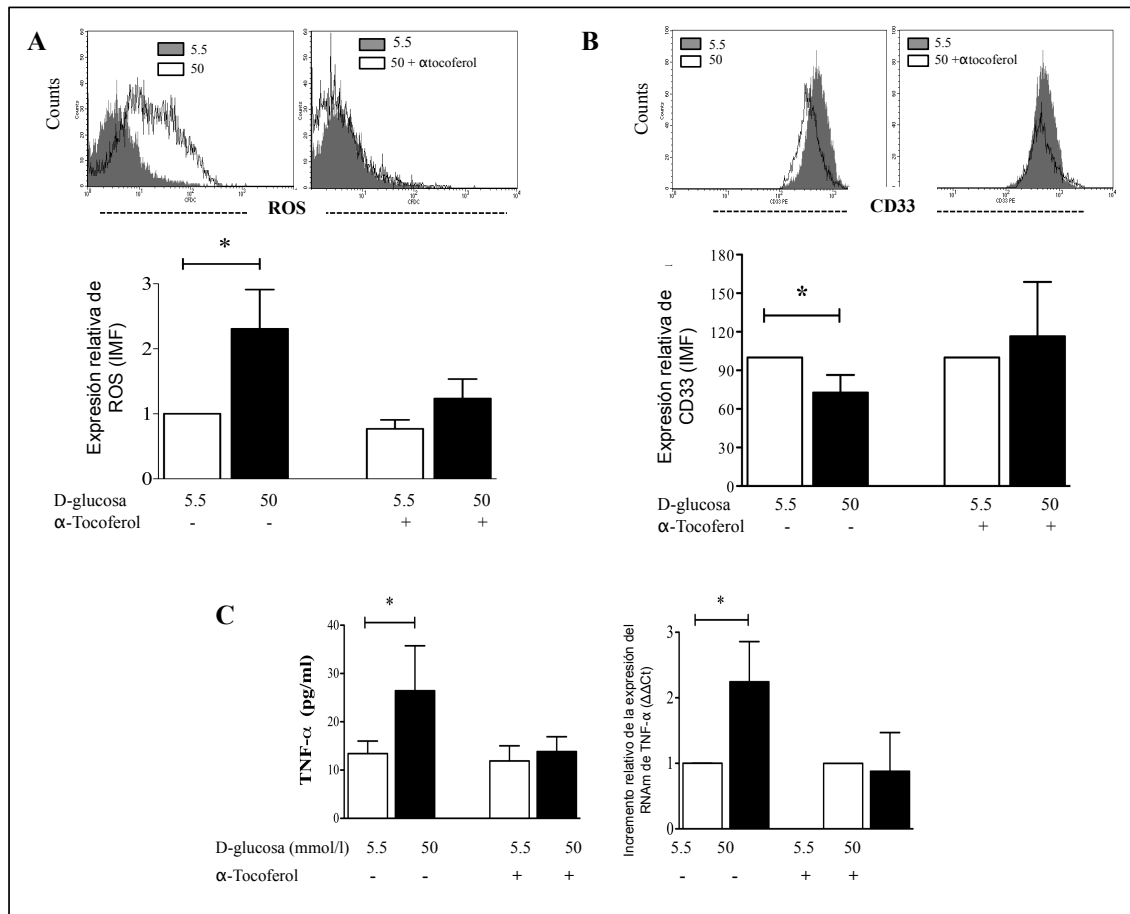


Figura 6 | El efecto de α -tocoferol en la expresión CD33 y la producción de TNF- α . Los monocitos de voluntarios sanos se cultivaron en 50 mmol/l de D-glucosa con o sin α -tocoferol durante 7 días. (A) Histograma representativo de la generación de ROS a partir de monocitos cultivados con 5,5 mmol/l (gris) o 50 mmol/l D-glucosa (histograma abierto) sin α -tocoferol (izquierda) o con α -tocoferol (derecha). El gráfico de barras muestra la generación relativa de ROS (n=6). (B) Histograma representativo que muestra la expresión de CD33 en monocitos cultivados sin (izquierda) o con α -tocoferol (derecha). Gráfica de barras que muestra los niveles de expresión relativos CD33 (n=3). (C) Gráfica de barras que muestra la producción de TNF- α (panel izquierdo), o la expresión del RNAm de TNF- α (panel de la derecha), con y sin α -tocoferol (n=3). Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. * P < 0,05 en comparación con con 5,5 mmol/l de D-glucosa.



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

LA HIPERGLUCEMIA IN VITRO INDUCE LA EXPRESIÓN DEL SUPRESOR DE LA SEÑALIZACIÓN DE CITOCINAS 3 (SOCS3).

Aunque previamente demostramos que la generación de ROS participa en la disminución de CD33 en la superficie de los monocitos, la molécula encargada de internalizar y degradar a CD33 es la proteína supresora de la señalización de citocinas 3 (SOCS3)⁶¹. Estudios recientes han documentado que concentraciones altas de glucosa incrementan la expresión del RNAm de SOCS3 en células mononucleares^{62, 67}. Por tal motivo, se evaluó la expresión SOCS3 en monocitos cultivados con 50mmol/l de glucosa durante 2, 24, 48 h y 7 días de cultivo. En la figura 7 se muestra que la expresión del RNAm de SOCS3 aumentó después de 48 h de cultivo en presencia de concentraciones altas de glucosa (50 mmol/l). Aunque los niveles de RNAm de la SOCS3 disminuyeron a los 7 días, los niveles en el día siete son aún más altos que los detectados en los monocitos cultivados en una concentración de 5,5 mmol/l de D-glucosa. Este resultado sugiere que la disminución de la expresión CD33 en la superficie celular de monocitos puede ser regulada por el incremento de SOCS3 inducido bajo condiciones de hiperglucemia.

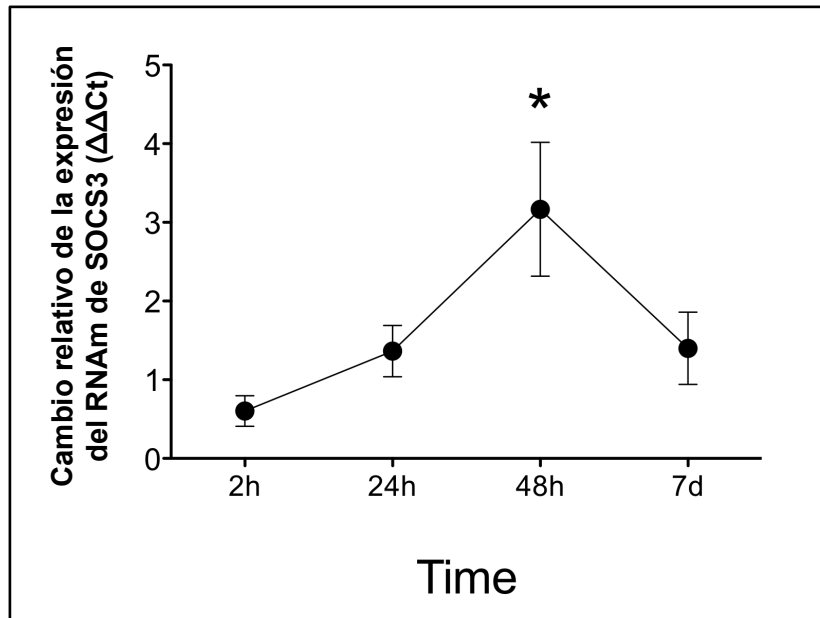


Figura 7 | Expresión de RNAm de SOCS3 en monocitos. Los monocitos de voluntarios sanos fueron cultivados en 5,5 o 50 mmol/l de D-glucosa por 2, 24, o 48 horas o 7 días, y los niveles de expresión de RNAm de SOCS3 se evaluó utilizando el ensayo Taqman. La expresión génica se normalizó con el gen 18S, y los resultados se expresan según el método $\Delta\Delta C_t$ como cambio relativo de la expresión con respecto a las células tratadas con 5,5 mmol/l de D-glucosa. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar (n=3). * P <0,05.



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

DISCUSIÓN

El principal hallazgo de nuestro estudio es que la expresión de CD33 en superficie y el RNAm se redujo significativamente en los monocitos de los pacientes con DM2. Las citocinas IL-8, IL-12 y TNF- α en el plasma de pacientes con DM2 se encontraban incrementadas en comparación con voluntarios sanos. Estos resultados sugieren que la elevación de citocinas pro-inflamatorias en el suero de pacientes con DM2 podría estar relacionado con la disminución en la expresión de CD33.

Los resultados concuerdan con reportes previos donde se observó que la inhibición de la expresión de CD33 induce la producción espontánea de TNF- α , IL-6 y IL-8 en los monocitos humanos,⁵⁴ y que en el plasma de pacientes con DM2 se observó aumento de las citocinas pro-inflamatorias.^{32, 45, 68} A pesar de que diversos mecanismos se han descrito en relación al incremento de citocinas inflamatorias en pacientes con diabetes, este es el primer estudio que describe una asociación entre CD33 y el perfil de citocinas inflamatorias en pacientes con DM2.



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

Adicionalmente en este estudio se demostró que la hiperglucemia *in vitro* disminuye la expresión de la proteína en la superficie celular y el RNAm de CD33 en monocitos humanos de voluntarios sanos y un incremento significativo en la producción de TNF- α , pero no de otras citocinas inflamatorias. Estudios previos, han mostrado resultados inconsistentes. Por ejemplo, en monocitos cultivados con 33 mmol/l de glucosa se observó un incremento del RNAm de TNF- α ⁶⁹.

Además, en una línea de monocitos como la THP-1 se observó que la hiperglucemia aumenta la producción de IL-1 β e IL-6, y en monocitos humanos primarios la hiperglucemia inducen la producción de IL-6. ^{70, 71} Mientras que otros estudios demostraron una reducción de los niveles de IL-1 β en macrófagos murinos RAW264 expuestos a 8.20 mmol/l de D-glucosa.⁷² Estas diferencias podrían estar relacionadas con el uso de diferentes tipos de células, las concentraciones de glucosa o los tiempos de cultivo utilizados para determinar las citocinas. Nuestro estudio mostró que las alta concentración de glucosa en tiempos largos induce en monocitos primarios la producción de TNF- α .

Por otro lado, también se observó que la alta concentración de glucosa aumentan la proporción de monocitos con baja expresión de CD33 que producen TNF- α . Interesantemente, nuestros resultados muestran una subpoblación de monocitos que no son afectados por la glucosa y mantienen la expresión de CD33 alta, aunque estas células también producen TNF- α es significativamente



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

menor el porcentaje de células productoras de citocinas. Estos resultados apoyan la idea de que la hiperglucemia conduce a un aumento de la producción TNF- α a través de un mecanismo mediado por CD33. En este contexto, previamente se había reportado la producción espontánea de IL-6 en células dendríticas CD33⁺ y en células dendríticas plasmocitoides que expresan CD33⁻/dim en pacientes con diabetes sin complicaciones⁷³ Estos hallazgos sugieren que un incremento en la producción de citocinas pro-inflamatorias en pacientes con DM2 puede estar parcialmente asociado a la subpoblación de monocitos CD33^{low}.

Para dilucidar el mecanismo por el cual la hiperglucemia disminuye la expresión de CD33 e incrementa la producción de TNF- α en los monocitos, se exploró el papel de las especies reactivas de oxígeno (ROS), ya que en estudios previos se había descrito que la producción de ROS generadas por las altas concentraciones de glucosa contribuye en la inflamación.^{50, 62, 66} Los resultados mostraron que el tratamiento con α -tocoferol disminuyó la generación de ROS e impidió el efecto de la glucosa sobre la expresión CD33.

Este resultado apoya la idea de que el estrés oxidativo generado en concentraciones altas de glucosa *in vitro* contribuye a la disminución de CD33, adicionalmente, se observó que los monocitos que fueron tratados con α -tocoferol y cultivados en concentraciones altas de glucosa no produjeron TNF- α . Este resultado indica que la generación de ROS induce la producción de TNF- α en



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

monocitos humanos cultivados en concentraciones altas de glucosa. Por lo tanto, la baja expresión de CD33 y la inhibición de TNF- α por los monocitos se relacionan con la generación de ROS. Estos datos sugieren que la generación de ROS inducida por altas concentraciones de glucosa participa en la desregulación de la expresión de CD33. Por otra parte, la generación de ROS puede inducir la producción de citocinas pro-inflamatorias que a su vez regulan la expresión de CD33. Shamsasenjan et al. describieron previamente que la producción de IL-6 regula la expresión CD33 en células de mieloma.⁷⁴ Sin embargo, no se observó incremento de la producción de IL-6 en los sobrenadantes de monocitos en nuestras condiciones experimentales, por lo que es probable que esta citocina no participe en el mecanismo de desregulación de CD33. Adicionalmente encontramos un incremento en la expresión del RNAm de SOCS3 en monocitos cultivados en las condiciones de hiperglucemia *in vitro*, lo que sugiere que esta molécula podría estar regulando los niveles de expresión de CD33 en los monocitos. Esta hipótesis es consistente con resultados previos donde se observó que SOCS3 induce la degradación de CD33 en monocitos.⁶¹ Recientemente, se ha reportado que la ingesta de altas concentraciones de glucosa induce *in vivo* la expresión de SOCS3 en monocitos periféricos.^{62, 67, 75} Interesantemente, la expresión SOCS3 es inducida por el TNF- α y, por lo tanto, podría ser un mecanismo de retroalimentación en la inflamación por un mecanismo a través de CD33.^{76, 77}



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO.

Cabe mencionar que se requieren más estudios para dilucidar el efecto de TNF- α sobre la expresión de SOCS3 y su efecto en la disminución de CD33 en la superficie celular. Por otro lado, también es necesario evaluar en estudios futuros las implicaciones clínicas de la disminución CD33 en la superficie celular de los monocitos de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

CONCLUSIÓN.

La hiperglucemia *in vitro* induce la disminución de la expresión de CD33 lo que desencadena la secreción de la citocina inflamatoria TNF- α por un mecanismo que involucra la generación de estrés oxidativo y de la expresión de SOCS3.



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

REFERENCIAS

1. American Diabetes, A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **34 Suppl 1**, S62-69 (2011).
2. 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* **27**, 1047-1053 (2004).
3. Song, E.C., Chu, K., Jeong, S.W., Jung, K.H., Kim, S.H., Kim, M. *et al.* Hyperglycemia exacerbates brain edema and perihematomal cell death after intracerebral hemorrhage. *Stroke* **34**, 2215-2220 (2003).
4. Habib, G.S., Bashir, M. & Jabbour, A. Increased blood glucose levels following intra-articular injection of methylprednisolone acetate in patients with controlled diabetes and symptomatic osteoarthritis of the knee. *Ann Rheum Dis* **67**, 1790-1791 (2008).
5. Porte, D., Jr. Mechanisms for hyperglycemia in the metabolic syndrome. The key role of beta-cell dysfunction. *Ann N Y Acad Sci* **892**, 73-83 (1999).
6. Jellinger, P.S. Metabolic consequences of hyperglycemia and insulin resistance. *Clin Cornerstone* **8 Suppl 7**, S30-42 (2007).
7. Pansuria, M., Xi, H., Li, L., Yang, X.F. & Wang, H. Insulin resistance, metabolic stress, and atherosclerosis. *Front Biosci (Schol Ed)* **4**, 916-931 (2012).
8. Luft, R. Oskar Minkowski: discovery of the pancreatic origin of diabetes, 1889. *Diabetologia* **32**, 399-401 (1989).
9. Shulman, G.I. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* **106**, 171-176 (2000).
10. American Diabetes, A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **33 Suppl 1**, S62-69 (2010).



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

11. Giugliano, D., Ceriello, A. & Esposito, K. Glucose metabolism and hyperglycemia. *Am J Clin Nutr* **87**, 217S-222S (2008).
12. Shulman, G.I. Cellular mechanisms of insulin resistance in humans. *Am J Cardiol* **84**, 3J-10J (1999).
13. Ikemoto, S., Thompson, K.S., Takahashi, M., Itakura, H., Lane, M.D. & Ezaki, O. High fat diet-induced hyperglycemia: prevention by low level expression of a glucose transporter (GLUT4) minigene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3096-3099 (1995).
14. Kitabchi, A.E., Umpierrez, G.E., Miles, J.M. & Fisher, J.N. Hyperglycemic crises in adult patients with diabetes. *Diabetes Care* **32**, 1335-1343 (2009).
15. Nugent, B.W. Hyperosmolar hyperglycemic state. *Emerg Med Clin North Am* **23**, 629-648, vii (2005).
16. Stoner, G.D. Hyperosmolar hyperglycemic state. *Am Fam Physician* **71**, 1723-1730 (2005).
17. Pickup, J.C. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* **27**, 813-823 (2004).
18. Wellen, K.E. & Hotamisligil, G.S. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* **115**, 1111-1119 (2005).
19. Feghali, C.A. & Wright, T.M. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci* **2**, d12-26 (1997).
20. Wu, J., Zhang, R., Torreggiani, M., Ting, A., Xiong, H., Striker, G.E. *et al.* Induction of diabetes in aged C57B6 mice results in severe nephropathy: an association with oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and inflammation. *Am J Pathol* **176**, 2163-2176 (2010).
21. Barton, B.E. IL-6-like cytokines and cancer cachexia: consequences of chronic inflammation. *Immunol Res* **23**, 41-58 (2001).
22. Bistrian, B. Systemic response to inflammation. *Nutr Rev* **65**, S170-172 (2007).



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

23. Pickup, J.C., Mattock, M.B., Chusney, G.D. & Burt, D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* **40**, 1286-1292 (1997).
24. Garcia, C., Fève, B., Ferre, P., Halimi, S., Baizri, H., Bordier, L. *et al.* Diabetes and inflammation: fundamental aspects and clinical implications. *Diabetes Metab* **36**, 327-338 (2010).
25. Devaraj, S. & Jialal, I. Increased secretion of IP-10 from monocytes under hyperglycemia is via the TLR2 and TLR4 pathway. *Cytokine* **47**, 6-10 (2009).
26. Satoh, N., Shimatsu, A., Himeno, A., Sasaki, Y., Yamakage, H., Yamada, K. *et al.* Unbalanced M1/M2 phenotype of peripheral blood monocytes in obese diabetic patients: effect of pioglitazone. *Diabetes Care* **33**, e7 (2010).
27. Gacka, M., Dobosz, T., Szymaniec, S., Bednarska-Chabowska, D., Adamiec, R. & Sadakierska-Chudy, A. Proinflammatory and atherogenic activity of monocytes in type 2 diabetes. *J Diabetes Complications* **24**, 1-8 (2010).
28. Cao, H. & Crocker, P.R. Evolution of CD33-related siglecs: regulating host immune functions and escaping pathogen exploitation? *Immunology* **132**, 18-26 (2011).
29. McMillan, S.J. & Crocker, P.R. CD33-related sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins in health and disease. *Carbohydrate research* **343**, 2050-2056 (2008).
30. Devaraj, S., Cheung, A.T., Jialal, I., Griffen, S.C., Nguyen, D., Glaser, N. *et al.* Evidence of increased inflammation and microcirculatory abnormalities in patients with type 1 diabetes and their role in microvascular complications. *Diabetes* **56**, 2790-2796 (2007).



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

31. Banerjee, M. & Saxena, M. Interleukin-1 (IL-1) family of cytokines: Role in Type 2 Diabetes. *Clin Chim Acta* **413**, 1163-1170 (2012).
32. Giulietti, A., van Etten, E., Overbergh, L., Stoffels, K., Bouillon, R. & Mathieu, C. Monocytes from type 2 diabetic patients have a pro-inflammatory profile. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) works as anti-inflammatory. *Diabetes Res Clin Pract* **77**, 47-57 (2007).
33. Demircan, N., Safran, B.G., Soylu, M., Ozcan, A.A. & Sizmaz, S. Determination of vitreous interleukin-1 (IL-1) and tumour necrosis factor (TNF) levels in proliferative diabetic retinopathy. *Eye (Lond)* **20**, 1366-1369 (2006).
34. Iwata, H., Soga, Y., Meguro, M., Yoshizawa, S., Okada, Y., Iwamoto, Y. et al. High glucose up-regulates lipopolysaccharide-stimulated inflammatory cytokine production via c-jun N-terminal kinase in the monocytic cell line THP-1. *J Endotoxin Res* **13**, 227-234 (2007).
35. Weinstein, M.P., Reller, L.B., Mirrett, S. & Wang, W.L. Controlled evaluation of hypertonic sucrose medium for detection of bacteremia and fungemia in supplemented peptone broth. *J Clin Microbiol* **16**, 490-494 (1982).
36. Basta, G., Schmidt, A.M. & De Caterina, R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc Res* **63**, 582-592 (2004).
37. Forbes, J.M., Cooper, M.E., Oldfield, M.D. & Thomas, M.C. Role of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* **14**, S254-258 (2003).
38. Crocker, P.R., McMillan, S.J. & Richards, H.E. CD33-related siglecs as potential modulators of inflammatory responses. *Ann N Y Acad Sci* **1253**, 102-111 (2012).



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

39. Shanmugam, N., Reddy, M.A., Guha, M. & Natarajan, R. High glucose-induced expression of proinflammatory cytokine and chemokine genes in monocytic cells. *Diabetes* **52**, 1256-1264 (2003).
40. Morohoshi, M., Fujisawa, K., Uchimura, I. & Numano, F. The effect of glucose and advanced glycosylation end products on IL-6 production by human monocytes. *Ann N Y Acad Sci* **748**, 562-570 (1995).
41. Hamed, S., Brenner, B., Abassi, Z., Aharon, A., Daoud, D. & Roguin, A. Hyperglycemia and oxidized-LDL exert a deleterious effect on endothelial progenitor cell migration in type 2 diabetes mellitus. *Thromb Res* **126**, 166-174 (2010).
42. Brownlee, M., Cerami, A. & Vlassara, H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* **318**, 1315-1321 (1988).
43. Albert, T.S., Duchateau, P.N., Deeb, S.S., Pullinger, C.R., Cho, M.H., Heilbron, D.C. *et al.* Apolipoprotein L-I is positively associated with hyperglycemia and plasma triglycerides in CAD patients with low HDL. *J Lipid Res* **46**, 469-474 (2005).
44. Mendez, J.D., Xie, J., Aguilar-Hernandez, M. & Mendez-Valenzuela, V. Trends in advanced glycation end products research in diabetes mellitus and its complications. *Mol Cell Biochem* **341**, 33-41 (2010).
45. Duncan, B.B., Schmidt, M.I., Pankow, J.S., Ballantyne, C.M., Couper, D., Vigo, A. *et al.* Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes* **52**, 1799-1805 (2003).
46. Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414**, 813-820 (2001).
47. Collier, B., Dossett, L.A., May, A.K. & Diaz, J.J. Glucose control and the inflammatory response. *Nutr Clin Pract* **23**, 3-15 (2008).



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

48. Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X.L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y. *et al.* Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* **404**, 787-790 (2000).
49. Ichikawa, K., Yoshinari, M., Iwase, M., Wakisaka, M., Doi, Y., Iino, K. *et al.* Advanced glycosylation end products induced tissue factor expression in human monocyte-like U937 cells and increased tissue factor expression in monocytes from diabetic patients. *Atherosclerosis* **136**, 281-287 (1998).
50. Orié, N.N., Zidek, W. & Tepel, M. Increased intracellular generation of reactive oxygen species in mononuclear leukocytes from patients with diabetes mellitus type 2. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **108**, 175-180 (2000).
51. Davis, B.K. & Ting, J.P. NLRP3 has a sweet tooth. *Nature immunology* **11**, 105-106 (2010).
52. Lukens, J.R., Dixit, V.D. & Kanneganti, T.D. Inflammasome activation in obesity-related inflammatory diseases and autoimmunity. *Discov Med* **12**, 65-74 (2011).
53. Schroder, K., Zhou, R. & Tschopp, J. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? *Science* **327**, 296-300 (2010).
54. Lajaunias, F., Dayer, J.M. & Chizzolini, C. Constitutive repressor activity of CD33 on human monocytes requires sialic acid recognition and phosphoinositide 3-kinase-mediated intracellular signaling. *Eur J Immunol* **35**, 243-251 (2005).
55. Crocker, P.R. & Varki, A. Siglecs, sialic acids and innate immunity. *Trends Immunol* **22**, 337-342 (2001).
56. Lorenz, U. SHP-1 and SHP-2 in T cells: two phosphatases functioning at many levels. *Immunol Rev* **228**, 342-359 (2009).
57. Ulyanova, T., Blasioli, J., Woodford-Thomas, T.A. & Thomas, M.L. The sialoadhesin CD33 is a myeloid-specific inhibitory receptor. *Eur J Immunol* **29**, 3440-3449 (1999).



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

58. Varki, A. & Crocker, P.R. I-type Lectins, Essentials of Glycobiology. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. (2009).
59. Crocker, P.R. Siglecs: sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins in cell-cell interactions and signalling. *Curr Opin Struct Biol* **12**, 609-615 (2002).
60. Crocker, P.R. & Redelinghuys, P. Siglecs as positive and negative regulators of the immune system. *Biochem Soc Trans* **36**, 1467-1471 (2008).
61. Orr, S.J., Morgan, N.M., Elliott, J., Burrows, J.F., Scott, C.J., McVicar, D.W. *et al.* CD33 responses are blocked by SOCS3 through accelerated proteasomal-mediated turnover. *Blood* **109**, 1061-1068 (2007).
62. Deopurkar, R., Ghanim, H., Friedman, J., Abuaysheh, S., Sia, C.L., Mohanty, P. *et al.* Differential effects of cream, glucose, and orange juice on inflammation, endotoxin, and the expression of Toll-like receptor-4 and suppressor of cytokine signaling-3. *Diabetes Care* **33**, 991-997 (2010).
63. Crocker, P.R., Paulson, J.C. & Varki, A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nature reviews. Immunology* **7**, 255-266 (2007).
64. Boyum, A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol Suppl* **5**, 9-15 (1976).
65. Muller, T., Grandbarbe, L., Morga, E., Heuschling, P. & Luu, B. Tocopherol long chain fatty alcohols decrease the production of TNF-alpha and NO radicals by activated microglial cells. *Bioorg Med Chem Lett* **14**, 6023-6026 (2004).
66. Wu, J.H., Ward, N.C., Indrawan, A.P., Almeida, C.A., Hodgson, J.M., Proudfoot, J.M. *et al.* Effects of alpha-tocopherol and mixed tocopherol supplementation on markers of oxidative stress and inflammation in type 2 diabetes. *Clin Chem* **53**, 511-519 (2007).



67. Ghanim, H., Sia, C.L., Upadhyay, M., Korzeniewski, K., Viswanathan, P., Abuaysheh, S. *et al.* Orange juice neutralizes the proinflammatory effect of a high-fat, high-carbohydrate meal and prevents endotoxin increase and Toll-like receptor expression. *Am J Clin Nutr* **91**, 940-949 (2010).
68. Lee, J.H., Lee, W., Kwon, O.H., Kim, J.H., Kwon, O.W., Kim, K.H. *et al.* Cytokine profile of peripheral blood in type 2 diabetes mellitus patients with diabetic retinopathy. *Ann Clin Lab Sci* **38**, 361-367 (2008).
69. Morohoshi, M., Fujisawa, K., Uchimura, I. & Numano, F. Glucose-dependent interleukin 6 and tumor necrosis factor production by human peripheral blood monocytes in vitro. *Diabetes* **45**, 954-959 (1996).
70. Devaraj, S., Venugopal, S.K., Singh, U. & Jialal, I. Hyperglycemia induces monocytic release of interleukin-6 via induction of protein kinase c- α and - β . *Diabetes* **54**, 85-91 (2005).
71. Dasu, M.R., Devaraj, S. & Jialal, I. High glucose induces IL-1 β expression in human monocytes: mechanistic insights. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**, E337-346 (2007).
72. Hill, J.R., Kwon, G., Marshall, C.A. & McDaniel, M.L. Hyperglycemic levels of glucose inhibit interleukin 1 release from RAW 264.7 murine macrophages by activation of protein kinase C. *J Biol Chem* **273**, 3308-3313 (1998).
73. Otto, N.M., Schindler, R., Lun, A., Boenisch, O., Frei, U. & Oppert, M. Hyperosmotic stress enhances cytokine production and decreases phagocytosis in vitro. *Crit Care* **12**, R107 (2008).
74. Shamsasenjan, K., Otsuyama, K., Abroun, S., Iqbal, M.S., Mahmoud, M.S., Asaoku, H. *et al.* IL-6-induced activation of MYC is responsible for the down-regulation of CD33 expression in CD33+ myeloma cells. *Int J Hematol* **89**, 310-318 (2009).



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

75. Hancu, N., Netea, M.G. & Baciú, I. High glucose concentrations increase the tumor necrosis factor-alpha production capacity by human peripheral blood mononuclear cells. *Rom J Physiol* **35**, 325-330 (1998).
76. Corrales, J.J., Almeida, M., Burgo, R.M., Hernandez, P., Miralles, J.M. & Orfao, A. Decreased production of inflammatory cytokines by circulating monocytes and dendritic cells in type 2 diabetic men with atherosclerotic complications. *J Diabetes Complications* **21**, 41-49 (2007).
77. Ghanim, H., Abuaysheh, S., Sia, C.L., Korzeniewski, K., Chaudhuri, A., Fernandez-Real, J.M. *et al.* Increase in plasma endotoxin concentrations and the expression of Toll-like receptors and suppressor of cytokine signaling-3 in mononuclear cells after a high-fat, high-carbohydrate meal: implications for insulin resistance. *Diabetes Care* **32**, 2281-2287 (2009).



TESIS DE DOCTORADO 2012
YOLANDA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Efecto de la hiperglucemia sobre la activación y función de CD33 en monocitos de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

ANEXOS.

Artículos publicados:

Yolanda Gonzalez-Hernandez, Eduardo Sada Diaz, Alejandro Escobar-Gutierrez, Marcela Munos Torrico, Martha Torres Rojas. Asociación de tuberculosis y diabetes mellitus: Mecanismos inmunológicos involucrados en la susceptibilidad. **Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Mexico. 2009**, vol. 22 – num. 1, pag: 48-55.

Yolanda Gonzalez, M Teresa Herrera, Gloria Soldevila, Lourdes Garcia-Garcia, E Martha Perez-Armendariz, Guadalupe Fabian, Karen Bobadilla, Silvia Guzman-Beltran, Eduardo Sada and Martha Torres. High glucose concentrations induce TNF-alpha production through the down-regulation of CD33 in primary human monocytes. **BMC Immunology 2012**.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

High glucose concentrations induce TNF- α production through the down-regulation of CD33 in primary human monocytes

Yolanda Gonzalez¹, M Teresa Herrera¹, Gloria Soldevila³, Lourdes Garcia-Garcia⁴, Guadalupe Fabián², E Martha Pérez-Armendariz⁵, Karen Bobadilla¹, Silvia Guzmán-Beltrán¹, Eduardo Sada¹ and Martha Torres^{1*}

Abstract

Background: CD33 is a membrane receptor containing a lectin domain and a cytoplasmic immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) that is able to inhibit cytokine production. CD33 is expressed by monocytes, and reduced expression of CD33 correlates with augmented production of inflammatory cytokines, such as IL-1 β , TNF- α , and IL-8. However, the role of CD33 in the inflammation associated with hyperglycemia and diabetes is unknown. Therefore, we studied CD33 expression and inflammatory cytokine secretion in freshly isolated monocytes from patients with type 2 diabetes. To evaluate the effects of hyperglycemia, monocytes from healthy donors were cultured with different glucose concentrations (15-50 mmol/l D-glucose), and CD33 expression and inflammatory cytokine production were assessed. The expression of suppressor of cytokine signaling protein-3 (SOCS-3) and the generation of reactive oxygen species (ROS) were also evaluated to address the cellular mechanisms involved in the down-regulation of CD33.

Results: CD33 expression was significantly decreased in monocytes from patients with type 2 diabetes, and higher levels of TNF- α , IL-8 and IL-12p70 were detected in the plasma of patients compared to healthy donors. Under high glucose conditions, CD33 protein and mRNA expression was significantly decreased, whereas spontaneous TNF- α secretion and SOCS-3 mRNA expression were increased in monocytes from healthy donors. Furthermore, the down-regulation of CD33 and increase in TNF- α production were prevented when monocytes were treated with the antioxidant α -tocopherol and cultured under high glucose conditions.

Conclusion: Our results suggest that hyperglycemia down-regulates CD33 expression and triggers the spontaneous secretion of TNF- α by peripheral monocytes. This phenomenon involves the generation of ROS and the up-regulation of SOCS-3. These observations support the importance of blood glucose control for maintaining innate immune function and suggest the participation of CD33 in the inflammatory profile associated with type 2 diabetes.

Keywords: Antioxidant, Cytokines, Monocytes, ROS, Siglec-3, Type 2 diabetes

Background

Both acute and chronic hyperglycemia are associated with inflammation [1]. Patients with newly diagnosed or established diabetes mellitus (DM) have significantly higher levels of acute-phase proteins and pro-inflammatory cytokines compared to control subjects without

DM [2-5]. Monocytes isolated from patients with type 1 diabetes produce increased levels of IL-6, IL-1 β and chemokines of the CXC family including IL-8 and interferon gamma-induced protein 10 (IP-10) [6]. Furthermore, monocytes from patients with DM produce higher levels of TNF- α and IL-8 in comparison to control monocytes [7-9].

TNF- α production is thought to play a role in the generation of microvascular complications associated with diabetes, e.g., by enhancing chronic eye

* Correspondence: marthatorres98@yahoo.com

¹Departamento de Investigación en Microbiología, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Calzada de Tlalpan 4502, Sección XVI, Ciudad de México, 14080, México

Full list of author information is available at the end of the article

inflammation [10,11]. In addition to triggering acute and chronic inflammation, TNF- α regulates glucose and lipid metabolism and inhibits insulin production in pancreatic beta cells [12]. TNF- α is also produced in adipose tissue.

In both clinical and experimental conditions, hyperglycemia has been shown to alter many cellular parameters. This metabolic state leads to the generation of reactive oxygen species (ROS), the activity of protein kinase C (PKC), and the expression of p38 mitogen-activated protein kinase, nuclear factor κ B (NF- κ B), inflammatory cytokines, and chemokines [13-15].

Diverse mechanisms have been proposed to explain how hyperglycemia contributes to inflammation. For example, PKC activity may be increased secondarily to a poorly reversible, non-enzymatic protein glycation process, which could lead to the irreversible production of advanced glycation end products (AGEs). AGEs are known to stimulate the production of inflammatory cytokines in monocytes and macrophages through the activation of a specific receptor for AGEs (RAGE) [16,17]. Additionally, hyperglycemia may stimulate the production of inflammatory cytokines by increasing the levels of peroxides and free radicals. High serum concentrations of glucose can lead to enhanced glycolysis and mitochondrial overproduction of superoxide anion (O₂⁻) and other reactive oxygen species (ROS), which directly induce the activation of protein kinase C (PKC) and nuclear factor κ B (NF- κ B) [18,19]. Indeed, these transcription factors have been shown to induce the release of IL-1 β and IL-6 by human monocytes cultured under high glucose conditions [20]. The secondary effects of PKC and NF- κ B activation resulting from hyperglycemia can further amplify the inflammatory response, resulting in the production of the chemokine IP-10 and the up-regulated expression of TLR2 and TLR4 [6].

Although these mechanisms can partially explain the high levels of inflammatory cytokines observed under acute hyperglycemic conditions, the effects of high glucose on other regulatory molecules involved in the control of inflammatory cytokine production have not yet been identified. Low membrane expression levels of CD33 have been associated with higher levels of inflammatory cytokine production, and CD33 is expressed by myeloid progenitor cells of the bone marrow as well as peripheral blood monocytes and lymphocytes [21,22]. CD33, which is also referred to as human sialic acid-binding Ig superfamily lectin (hSiglec-3), is a member of the Siglec family that includes 11 human proteins of I-type (Ig-type) lectins with a V-set Ig-like domain and varying numbers of C2-set Ig-like domains, such as sialoadhesins (Siglec-1 and CD169), CD22 (Siglec-2), myelin-associated glycoprotein (MAG; Siglec-4), and additional members from a subgroup that

contains CD33 (Siglec-3) and CD33-related Siglecs (Siglec-5 to -11) [22-25].

The regulation of cytokine production via CD33 is believed to depend on two putative conserved tyrosine-based signaling motifs contained within the cytosolic tail of CD33. These signaling motifs, known as immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIMs), act as regulatory elements that inhibit signaling [22]. CD33 activity is regulated by SOCS3, which is a member of the suppressor of cytokine signaling (SOCS) protein family. The binding of SOCS3 to the phosphorylated ITIM of CD33 induces the proteosomal degradation of both molecules [26], and the reduction of CD33 surface expression on monocytes by silencing with small interfering RNA (siRNA) or antibody blockade results in the increased secretion of IL-1 β , IL-8, and TNF- α [27].

Interestingly, the role of CD33 in the production of pro-inflammatory cytokines secondary to hyperglycemia has not yet been explored. Thus, the aim of the current study was to examine the effects of high glucose concentrations on the expression of CD33 and the production of cytokines in human monocytes from healthy individuals. Additionally, from patients with type 2 diabetes, the levels of CD33 expression on freshly obtained monocytes and serum cytokine levels were evaluated and compared to those from healthy individuals. Our results show that under hyperglycemic conditions, monocytes CD33 mRNA and surface protein expression was decreased, whereas TNF- α production was increased. These changes were inhibited by antioxidant pre-treatment, suggesting that the hyperglycemic-dependent decrease in CD33 expression involves the generation of oxidative stress.

Results

The clinical characteristics of the studied subjects are summarized in Table 1. There were no significant differences in gender, age, BMI, or the levels of creatinine or LDL or HDL cholesterol between the control group and the type 2 diabetes group. The levels of glucose, HbA1c and triglycerides were significantly higher among type 2 diabetes subjects than control subjects. Most patients with type 2 diabetes had received metformin and Glibenclamide. Only one of the diabetes patients had received metoprolol, and another had been administered clonazepam and levopromazine. None of the patients had been prescribed angiotensin receptor blockers, insulin, or statins. Healthy donors did not have any infections or inflammatory diseases and did not take any medications during the study period.

Diminished CD33 expression in monocytes from patients with type 2 diabetes

To determine whether CD33 expression is decreased in freshly isolated peripheral monocytes from type 2

Table 1 Demographic characteristics and clinical data of the groups

	Type 2 diabetes	Healthy	P value
n	21	26	
Gender (M/F)	8/13	6/20	0.0832
Age (years)	51.16 (10.17)	48.48 (9.42)	0.1868
BMI (kg/m ²)	27.85 (4.64)	28.32 (2.22)	0.4579
Glucose (mg/dl)	265.30 (79.71)	96.28 (9.19)	< 0.0001 *
Creatinine (mg/dl)	0.70 (0.24)	0.76 (0.12)	0.0757
Cholesterol (mg/dl)	211.50 (37.15)	212.00 (43.44)	0.4547
Triglycerides (mg/dl)	295.50 (297.10)	198.00 (116.80)	0.0171 *
LDL cholesterol (mg/dl)	129.30 (37.29)	134.60 (34.26)	0.5
HDL cholesterol (mg/dl)	45.16 (8.96)	46.08 (12.23)	0.4019
Hb1Ac (%)	10.42 (2.04)	5.58 (0.25)	< 0.0001 *
Time since diagnosis (years)	7	-	

Data are means SD. *P values correspond to the differences between healthy and type 2 diabetes

diabetes patients relative to healthy control subjects, flow cytometry and qPCR studies were performed. As shown in Figure 1, a significant decrease in the cell surface expression of CD33 was detected in monocytes obtained from patients with type 2 diabetes, as compared to those from healthy volunteers ($P < 0.05$) (Figure 1A and 1B).

In addition, CD33 mRNA expression was also reduced in monocytes from type 2 diabetes patients (Figure 1C). Because CD33 is a regulator of cytokine production, these findings suggest that low levels of CD33 expression could be involved in the elevated inflammatory cytokine production observed in patients with type 2 diabetes.

Increased pro-inflammatory cytokine levels in plasma from patients with type 2 diabetes

We next measured the levels of pro-inflammatory cytokines in the blood plasma of type 2 diabetes patients and healthy subjects. As shown in Figure 2, all of the pro-inflammatory cytokines evaluated (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, and TNF- α) were increased in patients with type 2 diabetes, although only the increases in TNF- α , IL-8, and IL-12 p70 were statistically significant in comparison to healthy individuals ($P < 0.05$) (Figure 2A). In addition, TNF- α production by monocytes was assessed by quantitative real time PCR (qPCR), and monocytes from patients with type 2 diabetes had significantly elevated levels of TNF- α mRNA than controls ($P < 0.05$) (Figure 2B).

High glucose conditions down-regulate the surface expression of CD33 in cultured monocytes

CD33 is known to play a role in the regulation of cytokine production, and low levels of CD33 expression have been associated with high levels of inflammatory cytokine production. Therefore, using flow cytometry, we measured the relative levels of CD33 surface expression on peripheral monocytes that were isolated from healthy volunteers and cultured in the presence of low or high concentrations of D-glucose. As shown in Figures 3A and 3B, culturing monocytes with 30 or 50 mmol/l D-glucose for 7 days induced a significant decrease in CD33 expression on the cell surface, compared to culture conditions containing 5.5 mmol/l D-glucose ($P < 0.05$). CD33 mRNA expression was also decreased in monocytes cultured for 7 days under high glucose conditions. As shown in Figure 3C, CD33 mRNA expression was significantly reduced in monocytes cultured in 15, 30 or 50 mmol/l D-glucose, compared to those cultured under normal glucose conditions (5.5 mmol/l D-glucose) ($P < 0.05$).

High glucose conditions induce pro-inflammatory cytokine production

Previous studies have shown that high glucose concentrations *in vitro* induce the production of greater amounts of IL-6 [20], which is a cytokine that can regulate CD33 expression [28]. Therefore, we evaluated the long-term effects (7 days) of high glucose conditions on the levels of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), interleukin-10 (IL10), interleukin-12p70 (IL-12p70), and tumor necrosis factor (TNF- α) released into the supernatants of cultured monocytes using flow cytometry. In addition, we examined the levels of cytokine mRNA using qPCR. Concentrations of 15 and 30 mmol/l D-glucose did not induce the production of pro-inflammatory cytokines (data not shown). However, 50 mmol/l D-glucose significantly induced both TNF- α secretion ($P < 0.05$) and TNF- α mRNA expression, compared to 5.5 mmol/l D-glucose ($P < 0.05$) (Figure 4A and 4B). In addition, an increase in IL-12 p70 expression was observed, although it did not reach statistical significance. The levels of IL-1 β , IL-6 and IL-10 were not increased under these conditions. These results suggest that the low levels of CD33 expression observed in monocytes cultured in high concentrations of D-glucose were not the result of autocrine IL-1 β , IL-6, IL-8 or IL-10 production. Nonetheless, the reduction in CD33 mRNA and cell surface protein expression may be associated with high levels of TNF- α production.

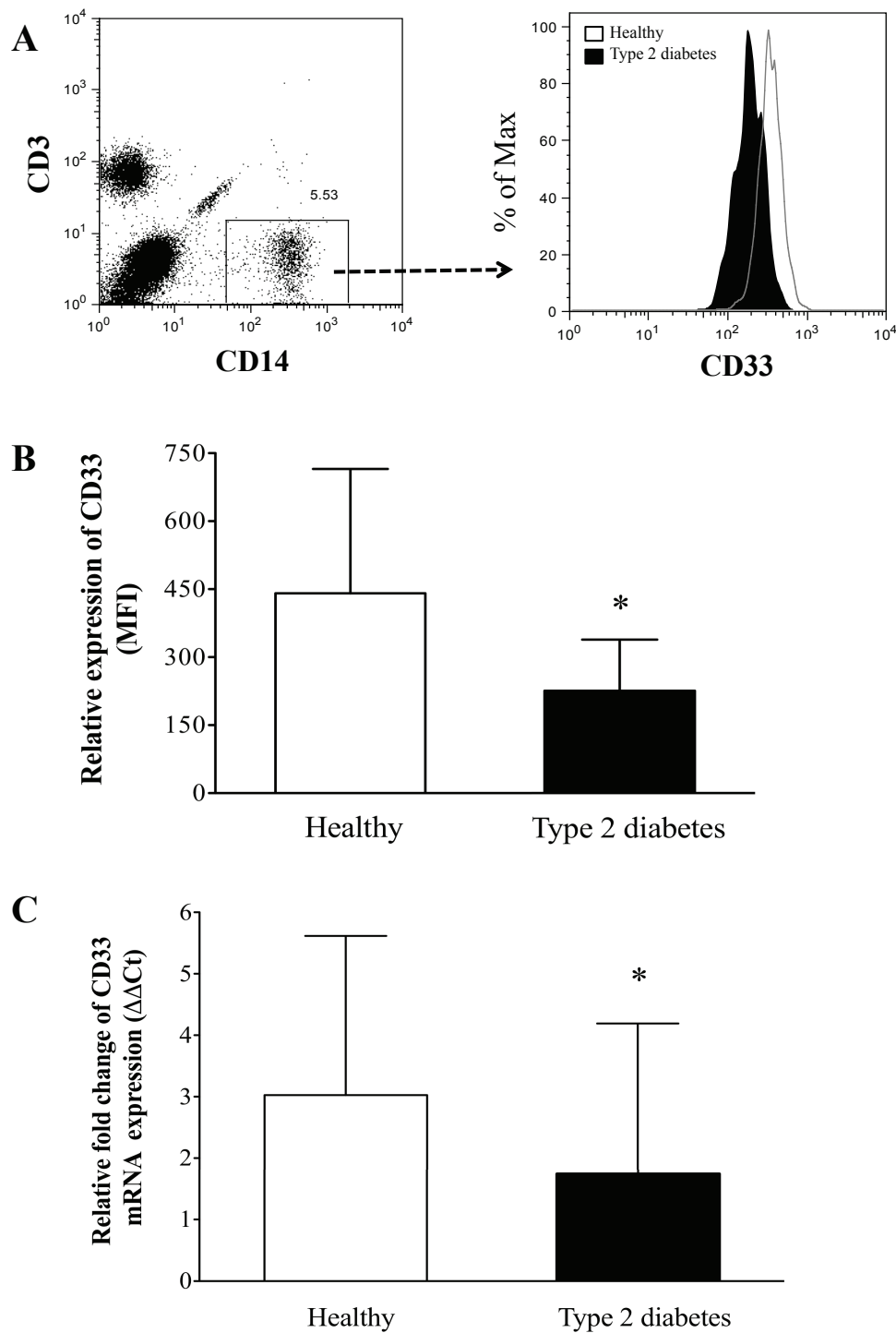


Figure 1 CD33 expression in human monocytes from type 2 diabetes patients. (A) Monocytes were stained with anti-CD3, CD14 and CD33 mAbs. At least 50,000 events were acquired for the flow cytometry analysis. CD33 expression is shown after gating for the CD3-CD14⁺ cells, and a histogram of CD33 expression was plotted for type 2 diabetes patients (tinted histogram) and healthy subjects (open histogram). (B) A bar graph showing the mean intensity fluorescence (MFI) data for CD33 expression in freshly isolated monocytes from patients with type 2 diabetes (n = 10) and healthy donors (n = 10). The data are presented as the mean \pm SD. * P < 0.05 compared to healthy donors. (C) Monocytes from type 2 diabetes patients (n = 9) and healthy donors (n = 8) were evaluated using Taqman gene expression analysis for CD33 mRNA expression. The results were analyzed according to the $\Delta\Delta Ct$ method, and the data are presented as the mean \pm SD. * P < 0.05 compared to healthy donors.

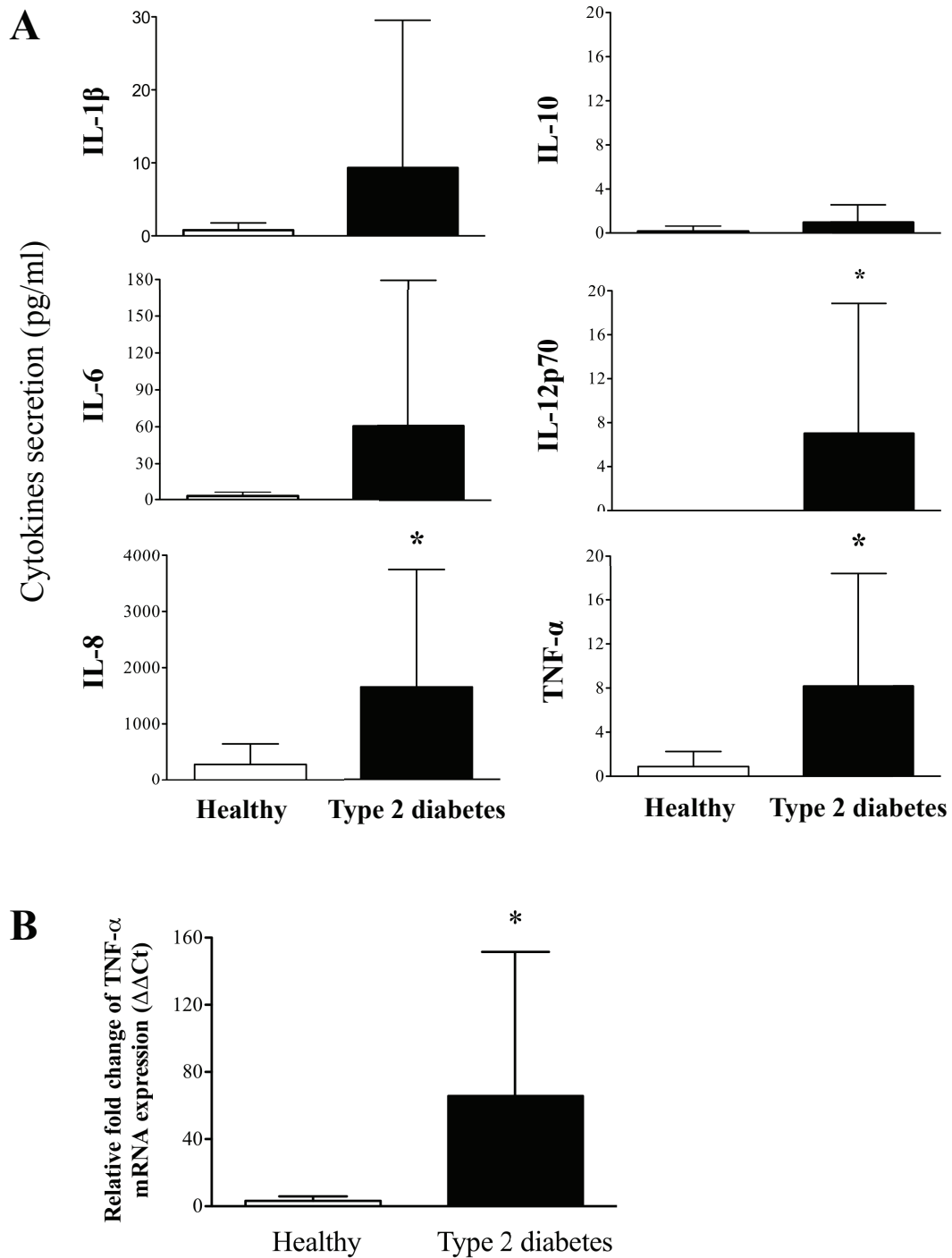


Figure 2 Pro-inflammatory cytokine production in type 2 diabetes patients. Plasma from type 2 diabetes patients and healthy controls was tested for the presence of pro-inflammatory cytokines using the CBA kit for IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70 and TNF- α . (A) The bar graphs show the quantification of these cytokines for type 2 diabetes patients (n = 14) and healthy controls (n = 10). All data are presented as the mean \pm SD. * P < 0.05 compared to healthy donors. (B) The expression of TNF- α mRNA and 18 S ribosomal RNA was analyzed for monocytes collected from type 2 diabetes patients (n = 7) and healthy subjects (n = 9). The results are expressed according to the $\Delta\Delta C_t$ method, and the data are presented as the mean \pm SD. * P < 0.05 compared to healthy donors.

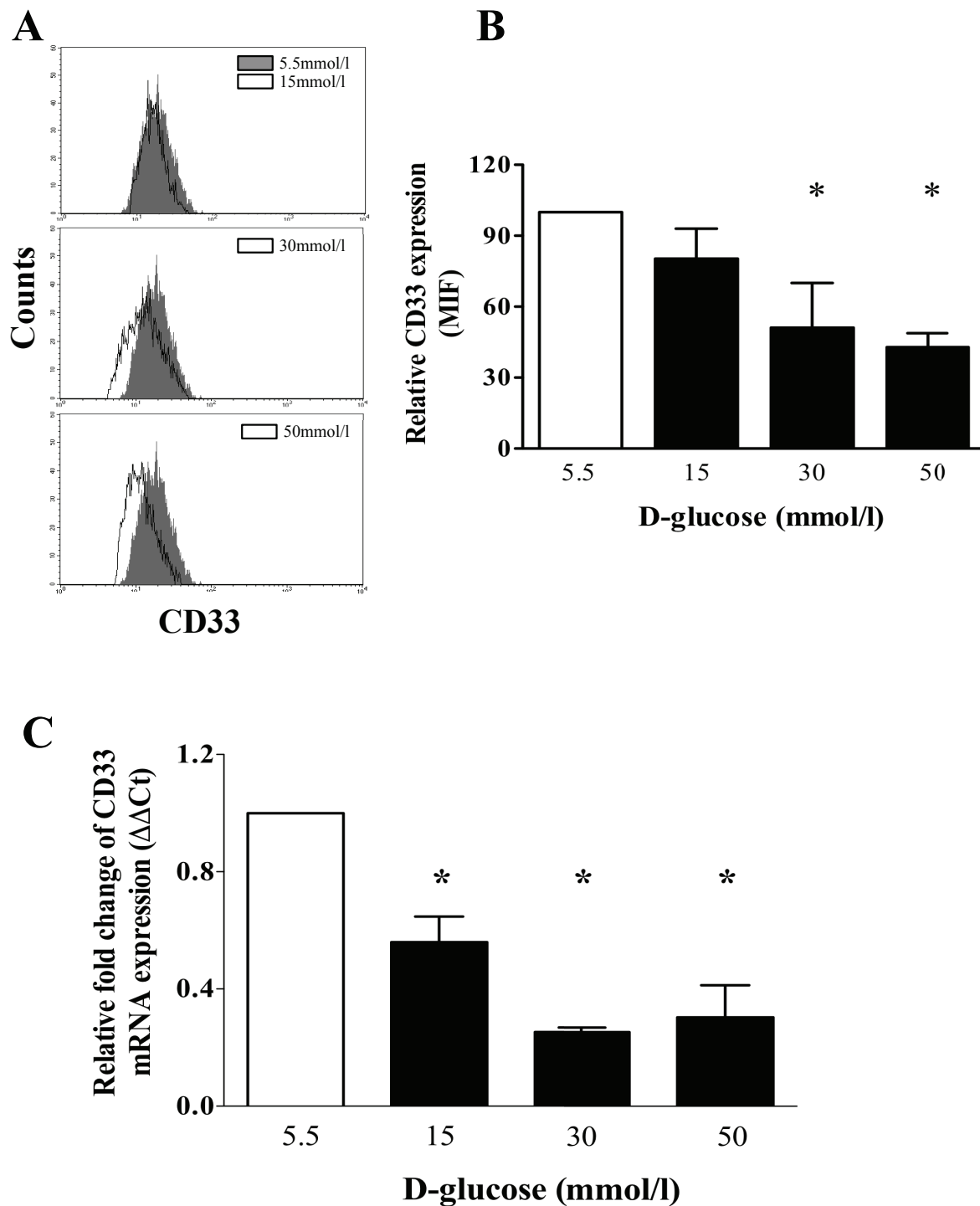


Figure 3 High glucose concentrations down-regulate CD33 expression in human monocytes. Monocytes from healthy donors were cultured in the presence of D-glucose (5.5, 15, 30, or 50 mmol/l) for 7 days. (A) Representative histograms show the expression of CD33 in monocytes cultured with 5.5 mmol/l (gray), 15, 30, or 50 mmol/l (open histogram) D-glucose. (B) Bar graphs show the MFI of CD33 in monocytes cultured under high glucose compared to those cultured in normal medium. The data are presented as the mean \pm SD (n = 6). (C) Taqman gene expression mRNA analysis of CD33 and 18 S ribosomal RNA expression. The results were analyzed according to the $\Delta\Delta Ct$ method, and all data are presented as the mean \pm SD (n = 3). * P < 0.05 compared to 5.5 mmol/l D-glucose.

TNF- α production is increased in monocytes cultured under high glucose conditions

To investigate whether the observed increase in TNF- α production was mediated by an effect of high glucose concentrations on CD33 expression in monocytes, we assessed the production of TNF- α in monocytes expressing low or high levels of CD33. As shown in Figure 5A, 50 mmol/l D-glucose increased the relative percentage of CD33^{low} monocytes, thereby decreasing the fraction of CD33^{high} cells. However, both populations demonstrated increased TNF- α production. Thus, these results indicate that *in vitro* hyperglycemia induces the overproduction of TNF- α in both CD33^{low} and CD33^{high} monocytes. However, the frequency of TNF- α -producing cells was significantly higher in the CD33^{low} subset (Figure 5B).

CD33 down-regulation and TNF- α production is prevented by α -tocopherol treatment

The generation of ROS resulting from high concentrations of glucose is believed to contribute to hyperglycemia-induced inflammatory responses. Thus, we

assessed whether ROS generation was involved in the production of TNF- α and CD33 expression by human monocytes cultured under high glucose conditions. As shown in Figure 6A, the generation of ROS by glucose was dose-dependent, and this effect was prevented by co-incubation with α -tocopherol, a compound known to reduce ROS generation and TNF- α production [29,30]. Additionally, α -tocopherol treatment prevented the decrease in surface CD33 expression by monocytes (Figure 6B), the up-regulation of TNF- α mRNA expression, and the secretion of TNF- α induced by high glucose conditions (Figure 6C). Thus, these results suggest that ROS generation induced by high glucose concentrations is responsible for the down-regulation of CD33 expression and spontaneous production of TNF- α .

High glucose concentrations induce the expression of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) in monocytes

Recent studies have demonstrated that high glucose concentrations increase the expression of SOCS3

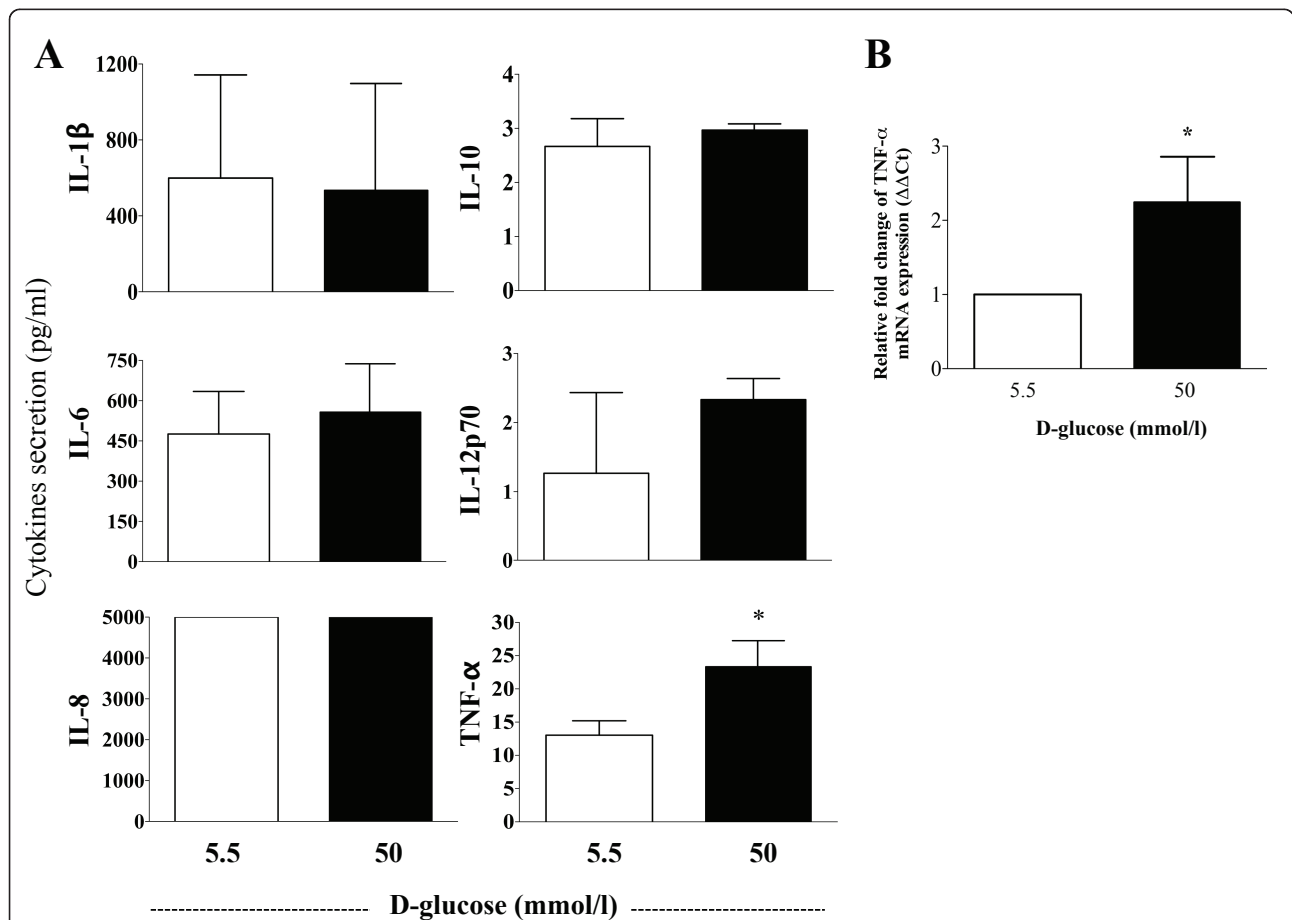


Figure 4 Effect of high glucose concentrations on pro-inflammatory cytokine production. Supernatants from monocytes cultured in the presence of 5.5 and 50 mmol/l D-glucose for 7 days were used for the quantification of IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70 and TNF- α protein levels. (A) The bar graphs represent the quantification of cytokine production (n = 3). (B) The expression of TNF- α mRNA from monocytes cultured in high glucose. TNF- α mRNA and 18 S ribosomal RNA expression was analyzed by qPCR, and the results are expressed according to the $\Delta\Delta C_t$ method. The data are presented as the mean \pm SD for all graphics (n = 3). * P < 0.05 compared to treatment with 5.5 mmol/l D-glucose.

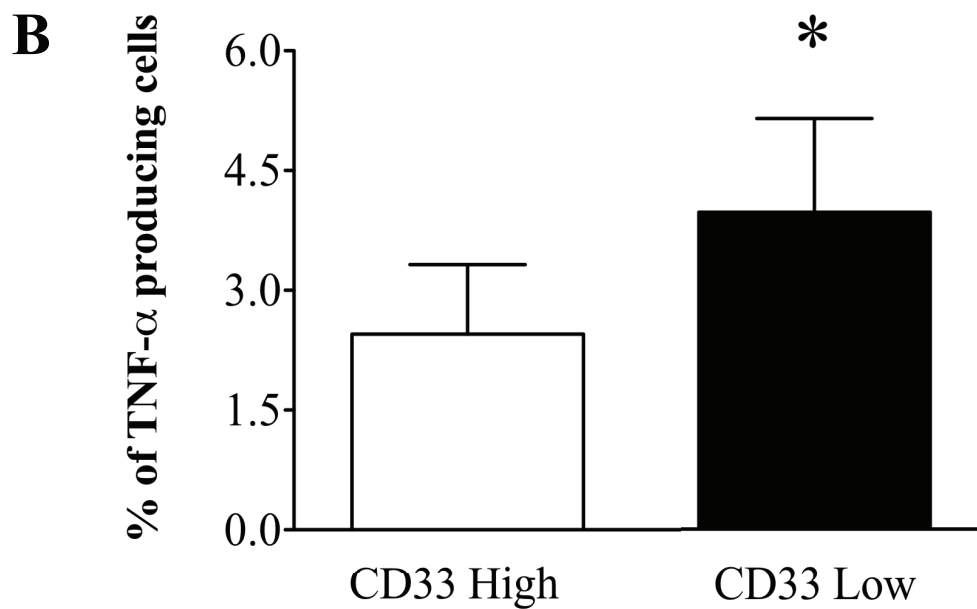
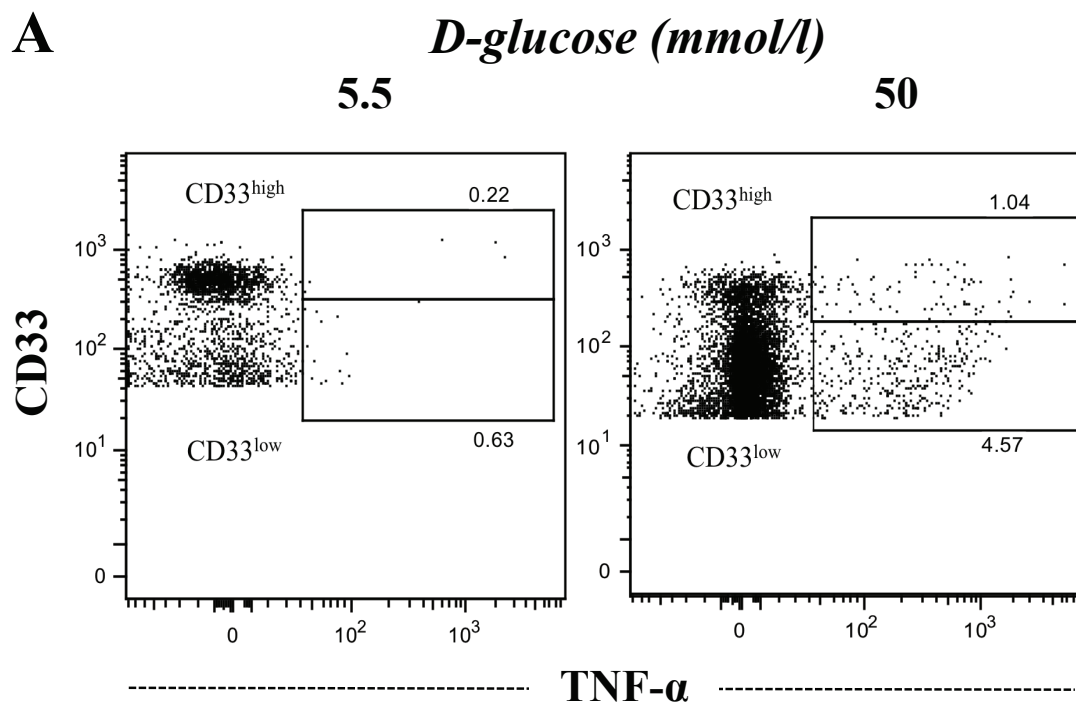
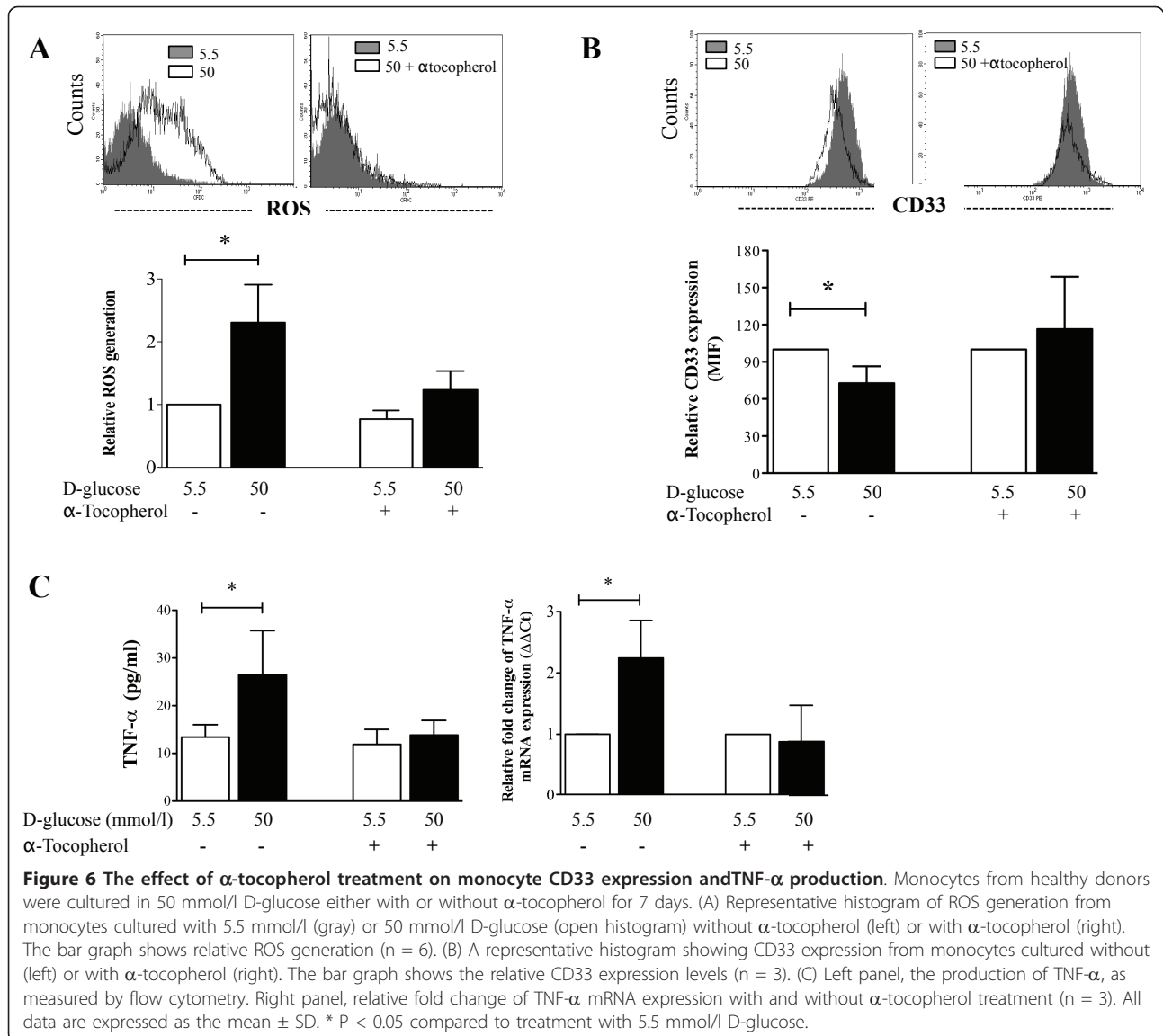


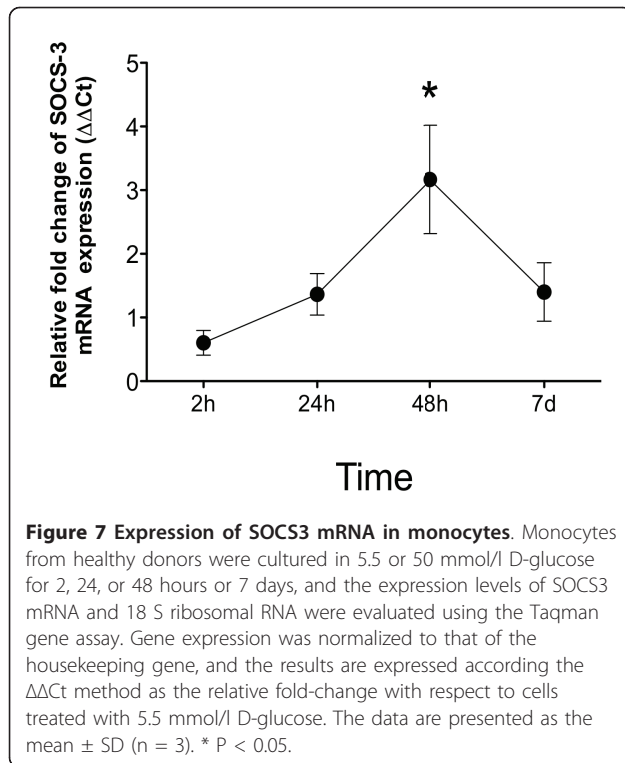
Figure 5 TNF- α production in CD33^{low} and CD33^{high} monocytes. Monocytes from healthy donors were cultured in the presence of glucose for 7 days and were then stained with anti-human CD33 and anti-human TNF- α antibodies. (A) Representative dot-plots show the percentages of TNF- α -producing CD33^{low} and CD33^{high} monocytes that were cultured with either 5.5 mmol/l (left) or 50 mmol/l (right) D-glucose (B) The bar graph summarizes the levels of TNF- α production by CD33^{low} (white) and CD33^{high} (black) monocytes cultured with 50 mmol/l D-glucose (n = 4). The data are expressed as the mean \pm SD. * P < 0.05 as compared to the TNF- α production by CD33^{low} and CD33^{high}



mRNA in mononuclear cells [31,32]. Furthermore, SOCS3 has been shown to induce proteosomal degradation of CD33 in adherent monolayers of human cells [26]. Thus, we evaluated SOCS3 mRNA expression in monocytes cultured under hyperglycemic conditions for 2, 24, 48 h and 7 days. As shown in Figure 7, the levels of SOCS3 mRNA increased after 48 h of culture in the presence of high glucose concentrations (50 mmol/l). Although the levels of SOCS3 mRNA had decreased after 7 days of culture, the levels detected at this time remained greater than those in monocytes cultured in 5.5 mmol/l D-glucose. These results suggest that the down-regulation of cell surface CD33 expression mediated by high glucose concentrations may be regulated by increased levels of SOCS3 protein.

Discussion

The primary finding of our study is that CD33 cell surface protein and mRNA expression levels are significantly reduced in monocytes from patients with type 2 diabetes. The analysis of the plasma cytokine profile of patients with type 2 diabetes showed that pro-inflammatory cytokine levels were increased, although only the levels of IL-8, IL-12, and TNF- α were significantly increased when compared to healthy volunteers. These results suggest that the elevated levels of pro-inflammatory cytokines in the serum of patients with type 2 diabetes could be related to the down-regulated expression of CD33. Increased levels of pro-inflammatory cytokines in the plasma of patients with type 2 diabetes have been widely reported [5,9,33]. On the other hand, spontaneous production of TNF- α , IL-6, and IL-8 was



observed in human monocytes treated with anti-CD33 or by decreasing CD33 surface expression by RNA interference [27]. Although diverse mechanisms have been proposed to explain the increase of inflammatory cytokines in patients with type 2 diabetes, to our knowledge, this is the first study to describe an association between CD33 and the inflammatory cytokine profile in type 2 diabetes patients.

This study also demonstrated that high glucose concentrations *in vitro* resulted in decreased expression of CD33 protein and mRNA in human monocytes from healthy donors.

In addition, we observed a significant increase in levels of TNF- α present in the supernatants of monocytes cultured under high glucose conditions (50 mmol/l D-glucose), although this increase was not observed for other cytokines. Increased levels of TNF- α mRNA from monocytes cultured with 33 mmol/l glucose have previously been described for healthy individuals [3]. In addition, we did not detect an effect of high glucose concentrations on the production of IL-1 β or IL-6 in monocytes. However, previous studies have reported inconsistent results; some have shown that hyperglycemia increases the production of IL-1 β and IL-6 in the THP-1 cell line, whereas others have shown that hyperglycemia only induces the production of IL-6 in primary human monocytes [20,34]. In addition, other studies have demonstrated reduced IL-1 β levels in RAW264

murine macrophages exposed to 8-20 mmol/l D-glucose [35]. These differences may be related to differences in the cell types, glucose concentrations or lengths of culture time used to measure cytokine levels. Other authors reported that high glucose concentration and LPS treatment act synergistically for stimulate the secretion of inflammatory cytokines in peripheral mononuclear cells from humans [36,37]. Consistent with the formerly mentioned data from other authors, our results presented here serve to extend previous knowledge of the role of high glucose concentrations on the promotion of inflammation by demonstrating the *in vitro* effects of high glucose concentrations on TNF- α production by human monocytes.

We also presented evidence demonstrating that high glucose concentrations *in vitro* could increase the proportion of CD33^{low} monocytes and reduce the proportion of CD33^{high} monocytes, although TNF- α production was increased in both cell populations. These results support the idea that hyperglycemia leads to an increase in TNF- α production through a CD33-mediated mechanism, although there are likely additional mechanisms involved in production of TNF- α that are beyond the scope of this study. Furthermore, the spontaneous production of IL-6 by CD33^{low} plasmacytoid dendritic cells from patients with diabetes without atherosclerotic complications has been reported [38]. These findings suggest that the increased production of pro-inflammatory cytokines in patients with type 2 diabetes may be partially associated with the subpopulation of CD33^{low} monocytes.

The precise mechanisms by which hyperglycemia down-regulates CD33 expression have not yet been elucidated, although the generation of ROS by high glucose concentrations is believed to contribute to hyperglycemia-induced inflammatory responses [19,29,30]. Thus, we explored the association between ROS generation and CD33 expression in monocytes cultured under high glucose concentrations and treated with α -tocopherol. The results showed that α -tocopherol decreased ROS generation and prevented the effect of high glucose on CD33 expression. This result supports the idea that the oxidative stress generated by high glucose concentrations contributes to the down-regulation of CD33.

We observed an inhibition of TNF- α production in monocytes that were cultured under conditions of high glucose and were treated with α -tocopherol. This result indicates that ROS generation is involved in the TNF- α production by human monocytes cultured under high glucose conditions. Thus, the low expression of CD33 and the inhibition of TNF- α production in monocytes cultured under high glucose concentrations are primarily related to ROS generation. Therefore, we propose that ROS generation induced by high glucose conditions

directly induces the down-regulation of CD33 expression. Alternatively, ROS generation could induce the production of pro-inflammatory cytokines that could then regulate the expression of CD33. A study by Shamsanjan et al. postulated that IL-6 down-regulates CD33 expression in myeloma cells [28]. However, in the current study, IL-6 production was not increased in the supernatants of monocytes cultured under high glucose conditions, and therefore, IL-6 is likely not the mechanism responsible for CD33 regulation under hyperglycemic conditions.

In this study, we also showed that high glucose concentrations could up-regulate the expression of SOCS3 mRNA in human monocytes, suggesting that this molecule may regulate the levels of monocyte CD33 expression. This hypothesis is consistent with results showing that SOCS3 could contribute to CD33 degradation in peripheral monocytes [26]. Recently, it was reported that glucose ingestion induces the over-expression of SOCS3 in peripheral monocytes [31,32,39]. Interestingly, SOCS3 expression is induced by TNF- α and could therefore represent a feedback mechanism for inflammation associated with CD33 regulation [40,41]. However, further studies are needed to assess whether TNF- α production regulates SOCS3 expression and its effect on CD33 expression.

Our study had limitations, the most critical of which was the limited ability of our *in vitro* model to recapitulate what occurs in patients with type 2 diabetes. Nonetheless, we demonstrated that a significant increase in TNF- α production and decrease in CD33 protein and mRNA expression were induced by high concentrations of glucose (30-50 mmol/l). A concentration of 50 mmol/l is equivalent to 900 mg/dl of blood glucose, which is a concentration that is rarely attained in type 2 diabetes patients is much greater than the mean value found in the diabetes patients included in this study (265.3 ± 79.71 mg/dl or 14.73 ± 4.42 mmol/l blood glucose). Hence, it is possible that the glucose sensitivity of TNF- α production associated with CD33 expression is greater *in vivo* than *in vitro*. However, this increased level of sensitivity may occur if other factors *in vivo* could potentiate glucose-induced ROS generation. Further studies are required to examine this possibility. The increase in TNF- α associated with the down-regulation of CD33 expression presented here constitutes an interesting *in vitro* model to further investigate the molecular processes involved in the modulation of inflammation by glucose.

Conclusion

We conclude that hyperglycemic conditions induce the down-regulation of CD33, which triggers the secretion of the pro-inflammatory cytokine TNF- α by monocytes.

The mechanisms underlying the regulation of the TNF- α release induced by CD33 down-regulation may involve the generation of oxidative stress and the over-expression of SOCS3.

Methods

Participants

Twenty-one patients with type 2 diabetes and twenty-six healthy subjects were enrolled in this study. Type 2 diabetes patients were invited to participate in the study at the metabolic syndrome clinic of the National Institute of Respiratory Diseases (INER) in Mexico City. Patients with type 2 diabetes were diagnosed according to the criteria of the American Diabetes Association (diagnosis and classification of diabetes mellitus) [42]. Sixty milliliters of heparinized human peripheral venous blood was obtained from consenting individuals. The study was approved by the Institutional Review Board of the National Institute of Respiratory Diseases.

Monocyte isolation

Mononuclear cells (PBMCs) were obtained from whole blood by centrifugation using Lymphoprep[®] (Nycomed-Pharma, Oslo, Norway) [43]. Monocytes were enriched by adherence and positive selection using MACS[®] magnetic beads coupled to anti-human CD14 antibodies (Miltenyi Biotech, Auburn, CA), according to the manufacturer's recommendations. Purity was assessed by conventional flow cytometry using anti-human CD14 antibodies; the cell preparations were routinely > 95% monocytes. Monocyte viability was evaluated using the (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay [44], and cell viability was typically above 95%.

Media and cell culture

Monocytes were cultured in RPMI 1640 (Cambrex, Walkersville, MD) supplemented with 50 μ g/ml gentamicin sulfate, 2.0 mmol/l L-glutamine and 10% heat-inactivated pooled human serum (Gemini Bioproducts, Sacramento, CA) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Control medium contained 5.5 mmol/l D-glucose, and high glucose conditions were achieved by supplementation with D-glucose (Sigma, St. Louis, MO) to obtain final concentrations of 15, 20, 30, or 50 mmol/l D-glucose. CD33 expression at the cell surface was examined using flow cytometry. Monocytes from healthy volunteers were cultured with or without high concentrations of glucose (15, 20, 30, or 50 mmol/l) for 7 days at 37°C and 5% CO₂ in ultra-low adherence 24-well cell culture plates. Cells were then mechanically detached by pipetting, and cell viability was typically greater than 95%, as assessed by the MTT assay. The cells were then stained using phycoerythrin (PE)-labeled anti-human CD33 and

PerCP-labeled anti-human CD3 antibodies (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) or isotype controls. Fresh monocytes from type 2 diabetes patients were also stained. Cells were fixed with 1% paraformaldehyde, and CD33 surface expression was analyzed by flow cytometry. The results are expressed as the mean fluorescence intensity (MFI) of 20,000 acquired events. CellQuest software version 3.1 (BD Biosciences) was used for the analysis of the samples.

Total RNA extraction, cDNA synthesis and gene expression analysis by qPCR

Monocytes from healthy volunteers were cultured with 5.5, 15, 30, or 50 mmol/l D-glucose for 7 days, and the supernatants were collected and stored at -20°C for the cytokine measurements. Cell viability was routinely above 95%, as assessed by the MTT assay. Monocytes (5×10^5 cells) were lysed in RTL buffer (Qiagen, Germantown, MD), and total RNA was column-isolated according to the manufacturer's recommendations (RNase mini kit, Qiagen). RNA was also purified from freshly isolated monocytes of patients with type 2 diabetes. cDNA was prepared using a SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Briefly, RNA was mixed with 10 mM dNTPs and random hexamers and incubated at 65°C for 5 minutes. The samples were then mixed with a Reverse Transcriptase Mix (10× Reverse Transcriptase buffer, 25 mM MgCl₂, RNaseOUT recombinant ribonuclease inhibitor and 0.1 M DTT). cDNA was synthesized using the SuperScript II RT enzyme, and samples were placed in an iCycler (Bio-Rad, Hercules, CA) with the following cycling conditions: 25°C for 10 min, 42°C for 50 min and 70°C for 10 min. The samples were also treated with RNaseH.

The levels of CD33, IL-1 β , IL-6 and TNF- α mRNA were measured and normalized to that of the 18 S ribosomal RNA housekeeping gene. Real-time PCR reactions were performed in duplicate wells, according to the protocols for Taqman gene assays for CD33 (Hs00233544_m1), TNF- α (Hs01000485_m1), IL-1 β (IHs0174097_m1), IL-6 (Hs00985639_m1), SOCS-3 (Hs01000485_g1), and 18 S ribosomal RNA (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Briefly, a universal master mix was added to the target gene primers and probes (CD33, SOCS3, IL-1 β , IL-6, TNF- α , and 18 S ribosomal RNA), DEPC water and cDNA samples (diluted 1:5), and 25 μ l from each reaction was added to a single well of a 96-well optical reaction plate, which was then sealed with optical adhesive film. Amplification reactions were performed using an ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) with the following conditions: 2 minutes at 50°C, 10 minutes at 95°C, and 40 cycles consisting of 30 seconds at 95°C and one

minute at 62°C. Gene expression was normalized to that of 18 S ribosomal RNA, and the results were analyzed according to the $\Delta\Delta$ Ct method and reported as the fold-change in comparison to samples treated with 5.5 mmol/l D-glucose.

Pro-inflammatory cytokine production

Monocytes from healthy volunteers were cultured under low or high glucose conditions (5.5 and 50 mmol/l D-glucose, respectively) for 7 days at 5×10^5 cells/well in 24-well cell culture plates. Supernatants were collected and frozen at -20°C for cytokine quantification. Secreted cytokines were measured in the supernatants using a pro-inflammatory cytometric bead array (CBA) kit (BD Biosciences), according to the manufacturer's recommendations. Cytokine concentrations were also quantified in the blood plasma of patients with type 2 diabetes. The cytokines measured included IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 TNF- α . Cell Quest software was used for the sample acquisition, and the data were analyzed using the Cytometric Bead Array software (CBA, BD Biosciences). Values were extrapolated from a standard concentration curve and are expressed as pg/ml.

Monocyte culture in the presence of high glucose concentrations and α -tocopherol

α -tocopherol was used as an antioxidant treatment in monocyte cultures from healthy volunteers. α -tocopherol was diluted in pooled human serum (PHS) at a concentration of 100 μ mol/l and was protected from light. Monocytes (5×10^5 cells) were pre-incubated for 20 minutes with 100 μ mol/l α -tocopherol. Culture medium with the high glucose concentration (50 mmol/l D-glucose) was then added to simulate hyperglycemic conditions *in vitro*. Cells were cultured for 7 days and were then assessed for the production of reactive oxygen species (ROS) and the expression of CD33.

Determination of reactive oxygen species (ROS) generation

The fluorescent marker 5-(and 6-) carboxy-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy-HZDCF-DA; Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) was used to assess ROS production. Carboxy-HZDCF-DA enters the cell and is deacetylated, oxidized by reactive oxygen and nitrogen species and converted to the fluorescent compound 5-(and-6-) carboxy-2,7-dichlorofluorescein (carboxy-DCF). Following incubation under high glucose or high glucose plus α -tocopherol conditions, the cells were loaded with 10 μ M carboxy-HZDCF-DA for 30 min at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. The cells were then stained using PE-labeled anti-human CD33 and PerCP-labeled anti-human CD3 antibodies or isotype controls. Carboxy-DCF fluorescence was evaluated in

CD33-positive cells by flow cytometry. The results for ROS production are expressed as the carboxy-DCF mean fluorescence intensity (MFI) of 20,000 acquired events.

Statistical analysis

The data are expressed as the means \pm SD. Nonparametric data were analyzed using the Mann Whitney test. For multiple conditions and repeated measures, the Friedman test and Dunn's test were performed. The data were analyzed using Prism software (GraphPad Prism Software version 5.0), and statistical significance was set at $P < 0.05$.

Acknowledgements

This study was supported by the Mexican Secretariat of Health and the Mexican Council of Science and Technology (CONACYT) Grant CB 2008-101948, Salud 2004-C01-4749, Salud 2005-C02-14475, and DGAPA IN231011, CONACYT-SEP, 51243Q.

YG was the recipient of Doctoral Fellowship CONACYT No. 96404 at Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

Author details

¹Departamento de Investigación en Microbiología, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Calzada de Tlalpan 4502, Sección XVI, Ciudad de México, 14080, México. ²Clinica del Síndrome Metabólico, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Calzada de Tlalpan 4502, Sección XVI, Ciudad de México, 14080, México. ³Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria 04510, Ciudad de México, 70228, México. ⁴Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Av. Universidad 655, Cuernavaca, 62508, México. ⁵Departamento de Medicina Experimental, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria 04510, Ciudad de México, 70228, México.

Authors' contributions

YG performed the experiments, data analysis and interpretation and wrote the manuscript. MTH, KB and SGB collected the data. GS, LGG and EMPA made valuable contributions to the study design, analysis and interpretation of data and the written manuscript. GF performed the clinical analysis/discussion, and ES participated in the study design and the interpretation of the data. MT participated in the study design and wrote the manuscript. All authors reviewed and approved the final manuscript.

Received: 8 December 2011 Accepted: 14 April 2012

Published: 14 April 2012

References

- Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, Quagliari L, Ceriello A, Giugliano D: **Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress.** *Circulation* 2002, **106**:2067-2072.
- Temelkova-Kurktschiev T, Henkel E, Koehler C, Karrei K, Hanefeld M: **Subclinical inflammation in newly detected Type II diabetes and impaired glucose tolerance.** *Diabetologia* 2002, **45**:151.
- Morohoshi M, Fujisawa K, Uchimura I, Numano F: **Glucose-dependent interleukin 6 and tumor necrosis factor production by human peripheral blood monocytes in vitro.** *Diabetes* 1996, **45**:954-959.
- Stentz FB, Umpierrez GE, Cuervo R, Kitabchi AE: **Proinflammatory cytokines, markers of cardiovascular risks, oxidative stress, and lipid peroxidation in patients with hyperglycemic crises.** *Diabetes* 2004, **53**:2079-2086.
- Duncan BB, Schmidt MI, Pankow JS, Ballantyne CM, Couper D, Vigo A, Hoogeveen R, Folsom AR, Heiss G: **Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study.** *Diabetes* 2003, **52**:1799-1805.
- Devaraj S, Jialal I: **Increased secretion of IP-10 from monocytes under hyperglycemia is via the TLR2 and TLR4 pathway.** *Cytokine* 2009, **47**:6-10.
- 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.
- Gacka M, Dobosz T, Szymaniec S, Bednarska-Chabowska D, Adamiec R, Sadakierska-Chudy A: **Proinflammatory and atherogenic activity of monocytes in type 2 diabetes.** *J Diabetes Complications* 2010, **24**:1-8.
- Giulietti A, van Etten E, Overbergh L, Stoffels K, Bouillon R, Mathieu C: **Monocytes from type 2 diabetic patients have a pro-inflammatory profile. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) works as anti-inflammatory.** *Diabetes Res ClinPract* 2007, **77**:47-57.
- Demircan N, Safran BG, Soyulu M, Ozcan AA, Sizmaz S: **Determination of vitreous interleukin-1 (IL-1) and tumour necrosis factor (TNF) levels in proliferative diabetic retinopathy.** *Eye (Lond)* 2006, **20**:1366-1369.
- Devaraj S, Cheung AT, Jialal I, Griffen SC, Nguyen D, Glaser N, Aoki T: **Evidence of increased inflammation and microcirculatory abnormalities in patients with type 1 diabetes and their role in microvascular complications.** *Diabetes* 2007, **56**:2790-2796.
- Pickup JC: **Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes.** *Diabetes Care* 2004, **27**:813-823.
- Iwata H, Soga Y, Meguro M, Yoshizawa S, Okada Y, Iwamoto Y, Yamashita A, Takashiba S, Nishimura F: **High glucose up-regulates lipopolysaccharide-stimulated inflammatory cytokine production via c-jun N-terminal kinase in the monocytic cell line THP-1.** *J Endotoxin Res* 2007, **13**:227-234.
- Wuensch T, Thilo F, Krueger K, Scholze A, Ristow M, Tepel M: **High glucose-induced oxidative stress increases transient receptor potential channel expression in human monocytes.** *Diabetes* 2010, **59**:844-849.
- Shanmugam N, Reddy MA, Guha M, Natarajan R: **High glucose-induced expression of proinflammatory cytokine and chemokine genes in monocytic cells.** *Diabetes* 2003, **52**:1256-1264.
- Morohoshi M, Fujisawa K, Uchimura I, Numano F: **The effect of glucose and advanced glycosylation end products on IL-6 production by human monocytes.** *Ann N Y AcadSci* 1995, **748**:562-570.
- Ichikawa K, Yoshinari M, Iwase M, Wakisaka M, Doi Y, Iino K, Yamamoto M, Fujishima M: **Advanced glycosylation end products induced tissue factor expression in human monocyte-like U937 cells and increased tissue factor expression in monocytes from diabetic patients.** *Atherosclerosis* 1998, **136**:281-287.
- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, et al: **Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage.** *Nature* 2000, **404**:787-790.
- Orie NN, Zidek W, Tepel M: **Increased intracellular generation of reactive oxygen species in mononuclear leukocytes from patients with diabetes mellitus type 2.** *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000, **108**:175-180.
- Devaraj S, Venugopal SK, Singh U, Jialal I: **Hyperglycemia induces monocytic release of interleukin-6 via induction of protein kinase c- α and - β .** *Diabetes* 2005, **54**:85-91.
- Nakamura Y, Noma M, Kidokoro M, Kobayashi N, Takei M, Kurashima S, Mukaiyama T, Kato S: **Expression of CD33 antigen on normal human activated T lymphocytes.** *Blood* 1994, **83**:1442-1443.
- Crocker PR: **Siglecs in innate immunity.** *Curr Opin Pharmacol* 2005, **5**:431-437.
- Munday J, Floyd H, Crocker PR: **Sialic acid binding receptors (siglecs) expressed by macrophages.** *J Leukoc Biol* 1999, **66**:705-711.
- Cao H, Crocker PR: **Evolution of CD33-related siglecs: regulating host immune functions and escaping pathogen exploitation?** *Immunology* 2011, **132**:18-26.
- Avril T, Attrill H, Zhang J, Raper A, Crocker PR: **Negative regulation of leucocyte functions by CD33-related siglecs.** *Biochem Soc Trans* 2006, **34**:1024-1027.
- Orr SJ, Morgan NM, Elliott J, Burrows JF, Scott CJ, McVicar DW, Johnston JA: **CD33 responses are blocked by SOCS3 through accelerated proteasomal-mediated turnover.** *Blood* 2007, **109**:1061-1068.
- Lajaunias F, Dayer JM, Chizzolini C: **Constitutive repressor activity of CD33 on human monocytes requires sialic acid recognition and phosphoinositide 3-kinase-mediated intracellular signaling.** *Eur J Immunol* 2005, **35**:243-251.

28. Shamsasenjan K, Otsuyama K, Abroun S, Iqbal MS, Mahmoud MS, Asaoku H, Kawano MM: IL-6-induced activation of MYC is responsible for the down-regulation of CD33 expression in CD33+ myeloma cells. *Int J Hematol* 2009, **89**:310-318.
29. Wu JH, Ward NC, Indrawan AP, Almeida CA, Hodgson JM, Proudfoot JM, Puddey IB, Croft KD: Effects of alpha-tocopherol and mixed tocopherol supplementation on markers of oxidative stress and inflammation in type 2 diabetes. *Clin Chem* 2007, **53**:511-519.
30. Muller T, Grandbarbe L, Morga E, Heuschling P, Luu B: Tocopherol long chain fatty alcohols decrease the production of TNF-alpha and NO radicals by activated microglial cells. *Bioorg Med Chem Lett* 2004, **14**:6023-6026.
31. Deopurkar R, Ghanim H, Friedman J, Abuaysheh S, Sia CL, Mohanty P, Viswanathan P, Chaudhuri A, Dandona P: Differential effects of cream, glucose, and orange juice on inflammation, endotoxin, and the expression of Toll-like receptor-4 and suppressor of cytokine signaling-3. *Diabetes Care* 2010, **33**:991-997.
32. Ghanim H, Sia CL, Upadhyay M, Korzeniewski K, Viswanathan P, Abuaysheh S, Mohanty P, Dandona P: Orange juice neutralizes the proinflammatory effect of a high-fat, high-carbohydrate meal and prevents endotoxin increase and Toll-like receptor expression. *Am J Clin Nutr* 2010, **91**:940-949.
33. Lee JH, Lee W, Kwon OH, Kim JH, Kwon OW, Kim KH, Lim JB: Cytokine profile of peripheral blood in type 2 diabetes mellitus patients with diabetic retinopathy. *Ann Clin Lab Sci* 2008, **38**:361-367.
34. Dasu MR, Devaraj S, Jialal I: High glucose induces IL-1beta expression in human monocytes: mechanistic insights. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007, **293**:E337-E346.
35. Hill JR, Kwon G, Marshall CA, McDaniel ML: Hyperglycemic levels of glucose inhibit interleukin 1 release from RAW 264.7 murine macrophages by activation of protein kinase C. *J Biol Chem* 1998, **273**:3308-3313.
36. Otto NM, Schindler R, Lun A, Boenisch O, Frei U, Oppert M: Hyperosmotic stress enhances cytokine production and decreases phagocytosis in vitro. *Crit Care* 2008, **12**:R107.
37. Hancu N, Netea MG, Baciuc I: High glucose concentrations increase the tumor necrosis factor-alpha production capacity by human peripheral blood mononuclear cells. *Rom J Physiol* 1998, **35**:325-330.
38. Corrales JJ, Almeida M, Burgo RM, Hernandez P, Miralles JM, Orfao A: Decreased production of inflammatory cytokines by circulating monocytes and dendritic cells in type 2 diabetic men with atherosclerotic complications. *J Diabetes Complications* 2007, **21**:41-49.
39. Ghanim H, Abuaysheh S, Sia CL, Korzeniewski K, Chaudhuri A, Fernandez-Real JM, Dandona P: Increase in plasma endotoxin concentrations and the expression of Toll-like receptors and suppressor of cytokine signaling-3 in mononuclear cells after a high-fat, high-carbohydrate meal: implications for insulin resistance. *Diabetes Care* 2009, **32**:2281-2287.
40. Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Chavey C, Freidinger K, Hilton DJ, Hotamisligil GS, Van Obberghen E: SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor-alpha in the adipose tissue of obese mice. *J Biol Chem* 2001, **276**:47944-47949.
41. Ehrling C, Lai WS, Schaper F, Brenndorfer ED, Matthes RJ, Heinrich PC, Ludwig S, Blakeshear PJ, Gaestel M, Haussinger D, Bode JG: Regulation of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) mRNA stability by TNF-alpha involves activation of the MKK6/p38MAPK/MK2 cascade. *J Immunol* 2007, **178**:2813-2826.
42. American Diabetes A: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2011, **34**:S62-S69, Suppl 1.
43. Boyum A: Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol* 1976, Suppl 5:9-15.
44. Denizot F, Lang R: Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 1986, **89**:271-277.

doi:10.1186/1471-2172-13-19

Cite this article as: Gonzalez et al.: High glucose concentrations induce TNF- α production through the down-regulation of CD33 in primary human monocytes. *BMC Immunology* 2012, **13**:19.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

