



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE LA HIPERGLICEMIA EN LA CAPACIDAD
INFLAMATORIA DE MONOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

ANEL ANAID RIVAS RAMOS



MÉXICO

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Enrique Ortega Soto
VOCAL: Dr. José Pedraza Chaverri
SECRETARIO: Dra. Lourdes Andrea Arriaga Pizano
1er. SUPLENTE: Dra. Laura Carmona Salazar
2° SUPLENTE: Dr. Gustavo Olvera García

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA, HOSPITAL DE
ESPECIALIDADES, CENTRO MÉDICO NACIONAL S. XXI**

ASESOR DEL TEMA: DRA. LOURDES ANDREA ARRIAGA PIZANO

SUPERVISOR TÉCNICO: M. EN C. ALEXIS PAULINA JIMÉNEZ URIBE

SUSTENTANTE: ANEL ANAID RIVAS RAMOS

Resumen

En la respuesta inflamatoria sistémica, así como en condiciones de estrés ocurren diversos cambios metabólicos como la alta liberación y bajo uso de glucosa, bajos niveles de insulina (lo que causa hiperglicemia), elevación de cortisol e hiperlipidemia. Patologías como diabetes, obesidad o aterosclerosis cursan con hiperglicemia crónica, lo que puede incrementar la migración de leucocitos hacia tejidos, así como el estrés oxidativo. En condiciones inflamatorias agudas sistémicas, como la sepsis, también existe hiperglicemia transitoria, sin embargo, la influencia de este cambio metabólico agudo sobre la respuesta inflamatoria ha sido poco explorada.

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de la hiperglicemia transitoria sobre la capacidad inflamatoria de monocitos. Con muestras de sangre periférica obtenida de sujetos sanos (n=10), se realizó un modelo de activación *ex vivo*, al agregar durante 4 h lipopolisacárido (LPS) (100 ng/mL), preincubadas (1 h) o no con altas concentraciones de glucosa (30mM). Después de 4 h se recuperan células para la identificación del antígeno leucocitario humano (HLA-DR, por *Human Leucocyte Antigen*) y el receptor de desencadenamiento expresado en células mieloides (TREM-1, por *Triggering Receptors Expressed on Myeloid cells*) en monocitos (CD14⁺). Después de 12 horas de estimulación se colectó el sobrenadante, que se dividió en alícuotas y congeló hasta la cuantificación de citocinas interleucina-8 (IL-8), IL-6, IL-12 y factor de necrosis tumoral α (TNF- α , por *Tumor Necrosis Factor α*). Se encontró que la condición de hiperglicemia aguda transitoria incrementa los niveles secretados de IL-8, así como disminuye los de IL-1 β e IL-6 en respuesta al LPS. Al analizar el inmunofenotipo de leucocitos no observamos cambios en la expresión de TREM-1 y HLA-DR. Al analizar la producción de citocinas por parte de los monocitos encontramos que la hiperglicemia incrementó significativamente la producción de las citocinas IL-8, IL-6 y TNF- α (p>0.05). Lo anterior sugiere que en estados de hiperglicemia transitoria los monocitos, aunque no incrementan la expresión de algunos marcadores de activación, sí incrementan su capacidad de respuesta a LPS.

Índice

Página

Introducción.....	1
• Inflamación.....	1
• Activación del sistema inmune innato.....	3
• Receptores tipo Toll.....	5
• Mediadores de la respuesta inflamatoria.....	7
• Cambios fenotípicos de los leucocitos durante la respuesta inflamatoria.....	9
• Cambios metabólicos que influyen en la respuesta inflamatoria.....	10
Justificación.....	15
Planteamiento del problema.....	15
Hipótesis.....	15
Objetivos.....	16
• Objetivo general.....	16
• Objetivos particulares.....	16
Materiales y métodos.....	17
• Obtención de la muestra.....	17
• Inmunofenotipificación.....	17
• Activación de sangre <i>ex vivo</i>	18
• Detección intracelular de citocinas.....	19
• Cuantificación de citocinas secretadas.....	20
Resultados.....	21
• Identificación de leucocitos.....	21
• La hiperglicemia aumenta la secreción IL-8 y disminuye IL-1 β e IL-6.....	23
• La hiperglicemia/hiperosmolaridad no modifica la expresión de HLA-DR y TREM-1 en monocitos humanos.....	24
• Los monocitos son las células productoras de citocinas proinflamatorias en condiciones de activación con LPS.....	26
• En condiciones de hiperglicemia se incrementa la producción de IL-8 por células mieloides humanas.....	27
• El estrés hiperosmolar incrementa la proporción de monocitos productores de IL-1 β	29

- La hiperosmolaridad incrementa la proporción de monocitos productores de TNF- α en respuesta a LPS.....30

Discusión.....31

Conclusión.....35

Referencias.....36

Índice de Figuras

Página

Figura 1. Cascada de señalización del TLR-4.....	7
Figura 2. Cambios metabólicos que ocurren durante la respuesta inflamatoria.....	11
Figura 3. Esquema general de estímulos celulares.....	19
Figura 4. Algoritmo para la identificación de monocitos por citometría de flujo.....	22
Figura 5. La condición tipo hiperglicemia e hiperosmolaridad incrementa la secreción de IL-8 y disminuye la de IL-1 β inducida por LPS en leucocitos humanos	24
Figura 6. La condición tipo hiperglicemia no modifica la expresión de HLA-DR ni de TREM-1 en monocitos.....	25
Figura 7. Los monocitos son los productores de IL-1 β y TNF- α ante el estímulo con LPS.....	27
Figura 8. La hiperglicemia potencia la producción de IL-8 en células mieloides humanas activadas con LPS.....	28
Figura 9. La hiperosmolaridad incrementa el porcentaje de monocitos, activados con LPS, productores de la producción IL-1 β intracelular.....	29

Figura 10. La hiperosmolaridad aumenta la proporción
de monocitos productores de TNF- α31

Índice de Tablas

Página

Tabla 1. PRRs y sus ligandos.....4

Tabla 2. Anticuerpos usados para identificación y
caracterización de células mediante citometría de flujo.....17

Tabla 3. Datos demográficos y valores de glicemia.....21

Abreviaturas

AGEs	Productos finales avanzados de la glicación
ANOVA	Análisis de varianza.
APC	Alofococianina.
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i> .
BMDMs	Macrófagos derivados de médula ósea de ratón.
CARD	Dominio de reclutamiento de caspasa.
CBA	Arreglo citométrico en perlas.
CD	Clúster de diferenciación.
CLR	Receptores de lectina tipo C.
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
FSC	Detector de dispersión frontal.
GLUT	Transportador de glucosa.
HG	Hiperglicemia.
HLA	Antígeno leucocitario humano.
HMC-1	Línea celular de mastocitos humanos.
HSP	Proteína de choque térmico.
IL	Interleucina.
IL-1R/Toll	Receptor Toll de IL-1.
IRAK	Cinasa asociada al receptor de IL-1.
I κ B	Proteína inhibidora κ B.
KDa	Kilodaltones.
LPS	Lipopolisacárido.
LRR	Repetición rica en leucina.
MAN	Manitol.
MCP	Proteína quimioatrayente de monocitos.
MD-2	Antígeno 96 de linfocitos.
MFI	Intensidad media de fluorescencia.
MINCLE	Lectina inducible de macrófagos tipo C.
MIP	Proteína inflamatoria de macrófagos.
MyD88	Factor 88 de diferenciación mieloide.
NaCl	Cloruro de Sodio.
NF- κ B	Factor transcripcional nuclear κ B.
NG	Normoglicemia.
NK	Natural killer.
NLR	Receptores tipo NOD.
NLRC4	Receptor C4 tipo NOD.
NLRP3	Receptor P3 tipo NOD.

NOD	Dominio central de enlazamiento de nucleótidos que media la oligomerización.
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos.
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos.
PE	Ficoeritrina.
PGE ₂	Prostaglandina E ₂ .
PMA	Acetato forbol miristato.
PRR's	Receptores de reconocimiento de patrón.
RLR	Receptores tipo Rig.
RNA	Ácido ribonucleico.
ROS	Especies reactivas de oxígeno.
rpm	Revoluciones por minuto.
SE	Sin estímulo.
SIRS	Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.
SSC-A	Detectores de dispersión lateral.
TAB	Proteínas de unión a TAK.
TAK	Cinasa activada de TGF- β .
TIR	Receptor Toll/IL-1.
TLR	Receptores tipo Toll.
TNF	Factor de necrosis tumoral.
TRAF	Factor asociado al receptor de TNF.
TREM	Receptor de desencadenamiento expresado en células mieloides.
TYR	Tirosina.
WT	<i>Wild-type</i> .

Introducción

Inflamación

El sistema inmune es capaz de discriminar entre lo propio de lo extraño y de montar diversos mecanismos que eliminen o, al menos, limiten estos componentes potencialmente dañinos. Las células y moléculas responsables de su ejecución constituyen el sistema inmunitario, y su reacción conjunta y coordinada frente a la entrada de sustancias ajenas o la detección de células anormales se denomina respuesta inmunitaria. Sin embargo, aquellos mecanismos que en condiciones normales protegen a los organismos de patógenos o células transformadas, si no son regulados también son capaces de provocar lesiones tisulares desarrollando patologías¹.

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa del hospedero contra los agentes extraños y es mediado por diversos tipos celulares como: células fagocíticas (neutrófilos, monocitos, macrófagos), células presentadoras de antígeno (por ejemplo, células dendríticas), mastocitos, células citotóxicas (como las células asesinas naturales (NK, por *Natural Killer*)), sistema de complemento y otros mediadores lipídicos y proteicos².

La inflamación local aguda, un componente esencial de la respuesta inmune innata, es la respuesta fisiológica de tejidos vascularizados ante el daño, que tiende a la recuperación de la homeostasis del tejido. Localmente, ésta se caracteriza por 4 signos cardinales definidos como calor, dolor, rubor y edema, manifestaciones que derivan del incremento del flujo sanguíneo, aumento de la permeabilidad vascular, acumulación de fluidos, reclutamiento de leucocitos y producción de mediadores inflamatorios como prostaglandinas, prostaciclina, tromboxano, leucotrienos, aminas vasoactivas, óxido nítrico, citocinas y quimiocinas^{3,4}. Todos estos mediadores, tanto solubles como celulares, favorecen el reclutamiento de leucocitos al sitio de daño para la eliminación de células anormales y/o de agentes infecciosos, y estimulan la coagulación local (que proporciona una barrera física contra la

diseminación de la infección en el torrente sanguíneo); finalmente, media la activación de los mecanismos encargados de la reparación de tejido lesionado⁵.

Por otro lado, la respuesta inflamatoria sistémica corresponde a la extensión de una respuesta inflamatoria localizada que no es contenida o bien se da por la liberación masiva hacia circulación de mediadores inflamatorios ante eventos abruptos como traumatismos o quemaduras extensas⁶. En la respuesta inflamatoria sistémica aguda, además de la activación masiva del endotelio y leucocitos circulantes, también se activan las vías de complemento y cascadas de coagulación⁷. Aunque con participantes comunes, la fisiopatología de la inflamación sistémica aguda es diferente a la de la localizada, y por ende, el cuadro clínico también varía. En el caso de inflamación aguda sistémica como sepsis, se encontrarán dos o más signos como: fiebre o hipotermia, taquicardia, taquipnea o hipoxia, leucocitosis o leucopenia, y/o falla de algún órgano en el caso de sepsis severa^{8, 9}.

En la respuesta sistémica, al igual que la respuesta inflamatoria local, se clasifica de acuerdo a su tiempo de evolución en: a) inflamación aguda, que suele presentarse abruptamente y dura segundos a horas (no más de 15 h) y b) inflamación crónica, que suele desarrollarse paulatinamente y puede durar días a años. Además de la duración del proceso inflamatorio, se puede diferenciar a estos procesos por sus características histopatológicas. Así, a nivel histológico, los tejidos con inflamación aguda muestran infiltración predominante de neutrófilos en las primeras 6 a 24 h, mientras que para las 24 a 48 h las células infiltrantes predominantes son células mononucleares (como los monocitos). Para aquellos tejidos con inflamación crónica, el infiltrado de neutrófilos es escaso y abundante el de linfocitos y macrófagos, los cuales son todavía más preponderantes en inflamación con formación de granulomas (o granulomatosa), en la cual hay también abundante presencia de fibroblastos organizados alrededor del material caseoso (que puede estar formado por microorganismos y macrófagos¹⁰).

Ejemplos de inflamación sistémica crónica y de bajo grado incluyen patologías como la obesidad, diabetes y dislipidemia¹¹.

Activación del sistema inmune innato

Para que la respuesta inflamatoria sea capaz de montarse, se requiere del reconocimiento de diversas moléculas expresadas en microorganismos o células anormales, en el caso de los microorganismos frecuentemente expresan patrones de repetición de estructura molecular sobre su superficie (PAMPs por sus siglas en inglés, *Pathogen Associated Molecular Patterns*); ejemplo de esto son la flagelina, CpG no metilado de ácido desoxirribonucleico (DNA, por *Deoxyribonucleic Acid*) bacteriano, ácido ribonucleico (RNA, por *Ribonucleic Acid*) bicatenario, ácidos lipoteicoicos de las paredes celulares de bacterias Gram positivas, y el lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa de las bacterias Gram negativas⁵. En el caso de células anormales o dañadas, pueden activar el sistema inmune por la presencia de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, por *Danger Associated Molecular Patterns*); éstos incluyen moléculas endógenas liberadas por células dañadas, conocidos como alarminas, entre las que se encuentran proteínas de choque térmico (HSPs, por *Heat Shock Proteins*), DNA mitocondrial o histonas en el medio extracelular. Estos DAMP's al igual que los PAMP's son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrón (PRR's, por *Pattern Recognition Receptor*) dispuestos de manera intracelular o en superficie (Tabla 1) en células de la respuesta inmune innata y otras células como endoteliales, epiteliales y fibroblastos. La familia de PRRs denominada receptores tipo Toll (TLR's por *Toll Like Receptor*) tiene hasta el momento 10 miembros conocidos en humanos y 12 en ratón¹².

Tabla 1. PRRs y sus ligandos.

PRR's	Localización	Ligando	Origen del ligando
TLR			
TLR 1	Membrana plasmática	Triacil lipoproteína	Bacteria
TLR 2	Membrana plasmática	Lipoproteína	Bacteria, virus, parásitos, propios
TLR 3	Endolisosoma	dsRNA	Virus
TLR 4	Membrana plasmática	LPS	Bacteria, virus, propios
TLR 5	Membrana plasmática	Flagelina	Bacteria
TLR 6	Membrana plasmática	Diacil lipoproteína	Bacteria, virus
TLR 7 / TLR 8	Endolisosoma	ssRNA	Virus, bacteria, propios
TLR 9	Endolisosoma	CpG-DNA	Virus, bacteria, protozoos, propios
TLR 10	Endolisosoma	Desconocido	Desconocido
TLR 11	Membrana plasmática	Moléculas tipo profilina	Protozoos
RLR			
RIG-1	Citoplasma	dsRNA corto, dsRNA 5'-trifosfato	Virus RNA, virus DNA
MDA5	Citoplasma	dsRNA largo	Virus RNA (Picornaviridae)
LGP2	Citoplasma	Desconocido	Virus RNA
NLR			
NOD1	Citoplasma	iE-DAP	Bacteria
NOD2	Citoplasma	MDP	Bacteria
CLR			
Dectina-1	Membrana plasmática	B-glucano	Hongos
Dectina-2	Membrana plasmática	B-glucano	Hongos
MINCLE	Membrana plasmática	SAP130	Propios, hongos

Otras familias de PRRs incluyen a los receptores RLR (por *RIG Like Receptors*), NLR (por *NOD Like Receptors*) y CLR (por *C-type Lectin Receptors*).

Receptores tipo Toll

Los TLRs son glicoproteínas integrales de membranas tipo I que se caracterizan por dominios extracelulares que contienen un número variable de dominios ricos en leucina (LRR) y un dominio citoplasmático homólogo al receptor de interleucina 1 (IL-1R), denominado dominio homólogo de IL-1R/Toll (TIR, por *Toll IL-1 Receptor*).

Los TLRs tienen un dominio LRR es esencial para el reconocimiento del ligando, ya que forma una estructura parecida a una herradura y el ligando se une a la superficie cóncava.

Los TLRs pueden ser clasificados en varias familias de acuerdo a los PAMPs que cada uno reconoce, la subfamilia del TLR1, TLR2 y TLR6 reconocen lípidos, mientras que el TLR7, TLR8 y TLR9 reconocen ácidos nucleicos. La expresión de TLRs no es estática, se modula de manera rápida en respuesta a patógenos, citocinas y estrés ambiental. Además pueden expresarse de manera extracelular o intracelular, por ejemplo los TLRs 1, 2, 4, 5 y 6 se expresan en la superficie celular mientras que los otros (TLRs 3, 7, 8 y 9) se encuentran casi exclusivamente en compartimentos intracelulares como endosomas¹².

Los TLRs activan las mismas moléculas de señalización que se involucran en la señalización del receptor de IL-1 ó IL-1R; la estimulación de células con un ligando de un TLR recluta proteínas adaptadoras que contienen un dominio TIR, como el factor 88 de diferenciación mieloide (MyD88, por *Myeloid Differentiation 88*), a la región citoplasmática del TLR a través de interacciones homofílicas con sus dominios TIR. Esto desencadena diversas cascadas de señalización y producción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas¹³.

Un TLR ampliamente reconocido en la respuesta a infecciones bacterianas por Gram(-) es el TLR-4, este receptor reconoce LPS bacteriano mediante la asociación con las moléculas cúmulo de diferenciación 14 (CD14, por *Cluster of Differentiation*

14) y el antígeno 96 de linfocitos (MD-2)⁵. Se encuentra de manera abundante en células dendríticas, macrófagos y de los leucocitos circulantes únicamente en monocitos.

En macrófagos y monocitos, se sabe que una vez que TLR4 ha reconocido al LPS, se activa una cascada de señalización que involucra la activación moléculas adaptadoras y de diferentes cinasas que culminarán en la fosforilación de las subunidades del factor transcripcional nuclear κ B (NF- κ B), el cual podrá inducir la transcripción de citocinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α , por *Tumor Necrosis Factor α*), IL-6, IL-8, IL-1 β , etc.

De manera general, y como se observa en la Figura 1, la cascada de transducción de señales comienza al unirse el LPS a su receptor TLR4 y correceptor iniciando el reclutamiento de MyD88 hacia el dominio TIR, promoviendo su interacción con la cinasa asociada al receptor de IL-1 (IRAK4, por *Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase*) que fosforila a IRAK1. IRAK1 entonces interactúa con el factor asociado al receptor de TNF (TRAF6, por *TNF Receptor-Associated Factor*) y se forma un complejo con la cinasa activada del factor de crecimiento transformante β (TAK1, por *Transforming growth factor beta-activated kinase*), la proteína de unión a TAK (TAB1, por *TAK1-Binding Protein*) y TAB2 que se transloca a la membrana plasmática. En el citoplasma, TRAF6 se ubiquitina y se activa TAK1, ocurre la fosforilación del inhibidor del factor transcripcional nuclear (NF- κ B, por *Nuclear Factor κ B*) ó proteína inhibidora de κ B (I κ B), lo que favorece su ubiquitinación y degradación por el proteasoma 26S. Este proceso deja libre a las subunidades de NF- κ B que se translocan al núcleo, donde activan, entre otras cosas, la transcripción de genes que codifican citocinas y quimiocinas proinflamatorias¹⁴.

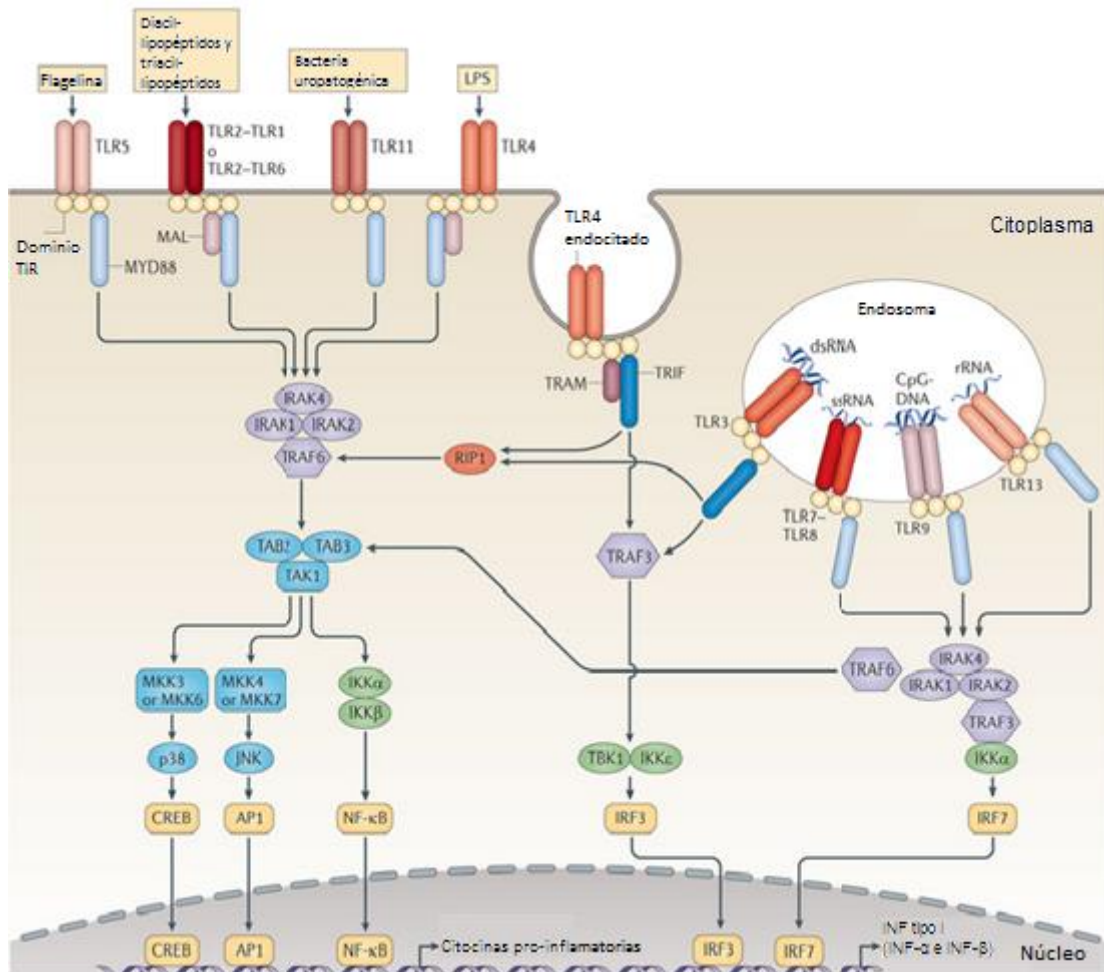


Figura 1. Cascada de señalización del TLR-4 (modificado de O'Neill, et al.¹⁵)

Mediadores de la respuesta inflamatoria

Los mediadores solubles de la inflamación incluyen citocinas y quimiocinas, proteasas en plasma (sistema de complemento, cininas, y proteínas fibrinolíticas), mediadores lipídicos (prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos), neuropéptidos, aminas vasoactivas (histamina y serotonina), especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, proteínas de fase aguda y leptinas. La producción de mediadores solubles y el reclutamiento de poblaciones celulares contienen y eliminan al agente etiológico y promueven la reparación del tejido⁴.

Las citocinas son glicoproteínas de alrededor de 25 kilodaltones (kDa) liberadas por diversas estirpes celulares en respuesta a un estímulo activador, como la activación

de TLRs, que funcionan como señales que regulan la activación, crecimiento o maduración de los diferentes tipos celulares que participan en el proceso inflamatorio e inducen respuestas mediante la unión a receptores específicos. Pueden actuar de manera autocrina, afectando la respuesta de las células que liberan la citocina, de forma paracrina al afectar la respuesta de células adyacentes, y algunas citocinas son suficientemente estables como para actuar de manera endócrina, afectando a células distantes. Por su parte, las quimiocinas, un subtipo de citocinas menor tamaño (8-10 KDa) y ricas en residuos de cisteína, también son importantes durante el proceso inflamatorio, ya que su acción principal es la de atraer a las células del sistema inmune al tejido dañado¹⁶.

Algunas citocinas relevantes para la respuesta inflamatoria incluyen al TNF, IL-1 e IL-6; las cuales son proteínas pleiotrópicas que regulan procesos como la muerte celular, respuesta inflamatoria en tejidos, modificación de la permeabilidad vascular, reclutamiento de leucocitos e inducción de proteínas de fase aguda.

Por ejemplo la IL-1 tiene sus principales fuentes celulares en fagocitos mononucleares, fibroblastos, queratinocitos y linfocitos B y T. Tanto la IL-1 β como la IL-1 α pueden desencadenar fiebre como efecto sistémico, además del incremento en la síntesis de la prostaglandina E₂ (PGE₂) por el endotelio vascular del hipotálamo e incrementar la permeabilidad vascular. El TNF- α es una citocina trimérica producida por macrófagos/monocitos, fibroblastos, mastocitos y algunas células T y NK, ésta se une a receptores en la superficie de células blanco y exhibe numerosas funciones como activar y aumentar la permeabilidad del endotelio vascular, también puede estimular la producción de proteínas de fase aguda por el hígado. A nivel sistémico causa fiebre y aumento del catabolismo. La IL-6 es una glicoproteína producida por los fagocitos mononucleares, células T y fibroblastos, a nivel sistémico estimula la síntesis de proteínas de fase aguda por el hígado y también puede causar fiebre. Actúa como factor de crecimiento para células B maduras e induce la maduración final de células plasmáticas.

Algunos de los efectos reguladores de la IL-6 son inhibición de producción de TNF y limitación de la respuesta inflamatoria aguda³.

Cambios fenotípicos de los leucocitos durante la respuesta inflamatoria.

La activación de las células del sistema inmune puede traducirse en procesos de la diferenciación, migración, producción de citocinas, estallido respiratorio, fagocitosis y/o incluso apoptosis. Todos estos procesos se relacionan con la expresión diferencial de “marcadores” en la superficie o interior de las células activadas y que corresponderán a receptores, proteínas efectoras, moléculas de adhesión y/o diferentes enzimas¹⁷. Existen un grupo de estos marcadores que se encuentran expresados de manera constitutiva y que suelen variar poco ante los procesos de activación. Al detectar estos marcadores estables o de identificación y variables de acuerdo a la activación o de caracterización, se pueden clasificar a los distintos tipos de células, con técnicas para inmunofenotipificación. Las proteínas presentes más representativas con las que se clasifica a los leucocitos humanos incluyen a CD45 (identifica leucocitos en general) CD3 para los linfocitos T, CD19 para los linfocitos B, CD14 para los monocitos^{18, 19} y CD16 para granulocitos, siempre y cuando sean células granulares y más grandes que los linfocitos²⁰, ya que las células NK pueden expresar también CD16, así como CD56. Entre los marcadores de caracterización se encuentran el receptor de desencadenamiento expresado en células mieloides (TREM, por *Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1*) para monocitos y neutrófilos, la expresión diferencial de la molécula del complejo principal de histocompatibilidad antígeno humano leucocitario DR (HLA-DR, por *Human Leukocyte Antigen DR*) y CD69 para linfocitos²¹, el cambio en la expresión en el caso de TREM-1 y HLA-DR, o su aparición en el caso de CD69 son indicadores complementarios a un estado de activación durante la respuesta inflamatoria.

Cambios metabólicos que influyen en la respuesta inflamatoria

Durante la respuesta inflamatoria, y más evidente cuando esta es exacerbada y/o crónica, así como en otras condiciones de estrés, ocurren diversos cambios metabólicos, como son: alta liberación y bajo uso de glucosa, aumento de aminoácidos y ácidos grasos libres, bajos niveles de insulina en suero, elevación de cortisol, etc. De manera simplista, el metabolismo puede ser visto como el manejo de la energía obtenida por catabolismo, para generar macromoléculas para el mantenimiento celular y crecimiento a través de las vías anabólicas. Las alteraciones en la regulación metabólica tienen gran importancia en patologías relacionadas a una respuesta inflamatoria exacerbada²².



Figura 2. Cambios metabólicos que ocurren durante la respuesta inflamatoria. La activación de leucocitos y otras células como hepatocitos, células endoteliales y fibroblastos, así como el reconocimiento de algunos mediadores solubles por el sistema nervioso central, favorecen las vías catabólicas por lo que aumentan las concentraciones séricas de varios metabolitos.

Poco se sabe acerca de los mecanismos que censan el estrés dentro del microambiente en los tejidos, es por eso que se han realizado estudios acerca de la respuesta celular ante el estrés en un gran número de condiciones inflamatorias crónicas como la diabetes tipo II, aterosclerosis, enfermedad inflamatoria intestinal y patologías neurodegenerativas.

Un estudio hecho por el grupo de investigación del Dr. Medzhitov, sugiere que los cambios hiperosmolares del cloruro de sodio (NaCl) en el ambiente de macrófagos derivados de médula ósea de ratón (BMDMs, por *Bone Marrow Derived Macrophages*) induce respuestas de adaptación morfológica conforme pasa el tiempo, de igual manera, se demostró que el estrés hiperosmótico activa a la caspasa-1, que es necesaria para el procesamiento y secreción de la IL-1 β . La adición de NaCl, glucosa o sorbitol al medio de cultivo induce la escisión de la caspasa-1 para generar la subunidad activa p10 y promoviendo así el procesamiento de IL-1 β ²³.

Se observó también mediante modelos de BMDMs deficientes del receptor P3 tipo NOD (NLRP3, por *NOD Like Receptor P3*), de la molécula adaptadora ASC (por *Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD domain*) o del receptor C4 tipo NOD (NLRC4, por *NOD Like Receptor C4*), que los complejos multiprotéicos inflamasomas NLRP3 y NLR4 son responsables de censar el estrés hiperosmótico en estas células, ya que estas células modificadas tienen mínima o reducida activación de las caspasa-1 en comparación con los BMDMs de ratones sin modificaciones. En el mismo estudio se demostró la hipótesis de que este tipo de estrés induce la generación de ROS mitocondriales, ya que éste contribuye a la activación del inflamasoma por estrés hiperosmolar²³.

Se sabe que existen cambios metabólicos que pueden afectar o agravar enfermedades crónicas y agudas tales como la diabetes mellitus o la sepsis respectivamente, pues tienen efectos sobre la respuesta inflamatoria, de importancia para el progreso de ambas patologías, pues promueve producción de citocinas proinflamatorias e inducir disfunción fagocítica²².

Una condición de este tipo es la hiperglicemia, fenómeno común en pacientes diabéticos y pacientes no diabéticos, en los cuales se asocia al daño o estrés severo en tejidos, una cirugía mayor o estado de anestesia.

La hiperglicemia se define como una concentración de glucosa mayor a 110 mg/dL (5.55 mM) en sangre, la cual puede tener efectos deletéreos en el organismo. Por ejemplo, se ha demostrado esta condición incrementa el rodamiento, adhesión y

transmigración de leucocitos en venas mesentéricas de rata *in vivo*, contribuyendo a incrementar la respuesta inflamatoria a nivel local; adicionalmente se demostró que estos efectos son independientes de cambios en la osmolaridad²⁴.

La hiperglicemia en enfermedades críticas, como la sepsis, se define como un marcador de severidad de la enfermedad y predictor de mal pronóstico²⁵ y por ello, el manejo con insulina se ha implementado en las unidades de cuidados intensivos después de que se reportara la efectividad del control glicémico, ya que mantener la glicemia entre 80-110 mg/dL se asocia con menor morbilidad y mortalidad²⁵.

En otros reportes, contrariamente, la hiperglicemia se ha asociado con efectos adversos como la inducción de estrés oxidativo²⁶, promover la secreción de citocinas proinflamatorias e inducir disfunción fagocítica debido a que el alto nivel de azúcares en sangre disminuye la adhesión, quimiotaxis, fagocitosis y capacidad microbicida de neutrófilos en modelos animales²². En un trabajo realizado en 2006 se demostró que comparando macrófagos de fluidos de lavados abdominales de ratones Akita, que son ratones que se caracterizan por tener hiperglicemia, polidipsia y poliuria, contra células de ratones silvestres (WT, por *Wild-Type*), activadas por zimosán, existe un aumento en la respuesta inflamatoria de los ratones Akita modificados, incluyendo a citocinas y quimiocinas como TNF- α , IL-6, IL-10, la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1, por *Monocyte Chemoattractant Protein-1*) y la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1 α , *Macrophage Inflammatory Protein*). También se observó que la quimiotaxis por la estimulación del tripéptido formilado MLP y el pentapéptido WKYMV, fue notablemente menor en células polimorfonucleares aisladas de ratones Akita en comparación con las células de los ratones WT, adicionalmente la producción del radical superóxido fue estadísticamente mayor en células polimorfonucleares derivadas de médula ósea de ratones Akita en comparación con los ratones WT²⁷.

Otro efecto deletéreo de la hiperglicemia es la contribución a las complicaciones vasculares en diabetes. La formación de productos finales avanzados de la glicación (AGEs) es una importante anomalía bioquímica que acompaña a la diabetes e inflamación en general, debido a que los AGEs promueven a largo plazo la

aterosclerosis²⁸. Se ha demostrado, en líneas celulares monocíticas U937 o THP-1 estimuladas con forbol miristato acetato (PMA, por *Phorbol Myristate Acetate*), que la glucosa elevada de manera crónica correlaciona con la producción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas, la proteína cinasa activada por mitógenos p38, especies reactivas de oxígeno (ROS, por *Reactive Oxygen Species*) y con la actividad de NF- κ B²⁹.

Distintas líneas de investigación evidencian el hecho del papel que tiene el estrés oxidativo en el desarrollo de las complicaciones en diabetes. Pacientes diabéticos tienen incrementos en la producción de O₂⁻ en monocitos y neutrófilos, sin embargo, el mecanismo de las interacciones entre estos mediadores aún es poco claro³⁰.

La aterosclerosis acelerada es de las mayores complicaciones de la diabetes, constituyendo la mayor causa de morbilidad y mortalidad en este desorden metabólico común. El factor causal principal que permite las alteraciones fisiopatológicas en la vasculatura diabética es la exposición crónica a hiperglicemia²⁸.

Hasta el momento se han estudiado los efectos de la hiperglicemia como una anomalía crónica en patologías como diabetes, obesidad o aterosclerosis, sin embargo en condiciones inflamatorias agudas, como el síndrome de respuesta inflamatorio sistémico (SIRS, por *Systemic Inflammatory Response Syndrome*) o la sepsis también existe hiperglicemia transitoria y la influencia de este cambio metabólico agudo sobre la respuesta inmune innata y principalmente sobre la respuesta inflamatoria, ha sido poco explorada.

Justificación

Los pacientes con estados inflamatorios sistémicos agudos y crónicos presentan altas frecuencias de padecer infecciones como gingivitis o neumonía, y son más susceptibles a complicaciones por influenza.

Debido a que en diferentes condiciones de estrés como en la sepsis o diabetes hay concomitancia entre la respuesta inflamatoria y cambios metabólicos como el aumento de glucosa en sangre, nos preguntamos si los niveles elevados de glucosa modifican las capacidades de activación de leucocitos de sangre periférica de humanos, y en particular de los monocitos, orquestadores junto con otras células mieloides, de la respuesta inflamatoria.

Planteamiento del problema

Durante la respuesta inflamatoria se ha reportado que existen cambios metabólicos a nivel celular, de tejidos y órganos. En patologías inflamatorias como la sepsis o diabetes mellitus, la hiperglicemia es una alteración metabólica constante, y aunque se ha asociado a efectos deletéreos en dichas patologías, hasta el momento se desconoce si esta anomalía clínica tiene un efecto directo sobre la capacidad de respuesta de monocitos de sangre periférica de humano.

Hipótesis

Los monocitos estimulados y llevados a condiciones de estrés hiperglicémico aumentarán la proporción de células productoras y los niveles de producción de citocinas proinflamatorias, así como diferencias en la expresión de proteínas asociadas a activación como TREM-1 y HLA-DR.

Objetivos

Objetivo general

- Evaluar el efecto de concentraciones altas y transitorias de glucosa sobre la capacidad inflamatoria de células mieloides circulantes.

Objetivos particulares

- Evaluar el fenotipo de activación de monocitos de sangre periférica estimulada *ex vivo* en condiciones tipo hiperglicemia.
- Cuantificar citocinas solubles de sangre periférica estimulada *ex vivo* en condiciones tipo hiperglicemia.
- Determinar si en sangre periférica estimulada *ex vivo* en condiciones tipo hiperglicemia se modifica la capacidad de producción de citocinas en los monocitos.

Materiales y métodos

Obtención de la muestra

Se tomó muestra de 10 voluntarios sanos, sexo indistinto y edad de 18 a 30 años, de cada individuo y con previa asepsia y antisepsia del área de toma de muestra, se obtuvieron por venopunción de la vena mediana 3 mL de sangre recolectados en tubo vacutainer con heparina de sodio (16 UI/mL).

Inmunofenotipificación

De cada voluntario se evaluaron los niveles de glicemia utilizando el glucómetro FreeStyle Optimus, para determinar si cumplían con la características de normoglicémicos, posteriormente se pre-acondicionó la muestra por 1 hora en condiciones de hiperglicemia (30 mM de glucosa) o control osmolar (30 mM de manitol), posteriormente se estimuló o no por 2 horas con 100 ng/mL de lipopolisacárido de *E. coli* cepa O111:B4, que previamente fue homogenizado por 30 min.

Posteriormente se realizó la inmunofenotipificación colocando en tubos previamente etiquetados, los anticuerpos mencionados en la Tabla 2.

Tabla 2. Anticuerpos usados para identificación y caracterización de células mediante citometría de flujo.

Anticuerpo	Identificación	Caracterización/Fenotipo de activación
Anti CD45/Pacific Orange Clona HI30 Marca Invitrogen	Leucocitos	-
Anti CD14/ PECy7 Clona M5E2 Marca BD Bioscience	Monocitos	-
AntiCD3/ Pacific Blue Clona UCHT1 Marca BD Bioscience	Linfocitos T	-
Anti TREM-1/ PE Clona 193015 Marca R&D Systems		Incrementa en monocitos activados ²⁰
Anti HLA-DR/PECy5 Clona G46-6 Marca BD Bioscience	Monocitos	Disminuye en monocitos de individuos con inflamación sistémica ³¹

Después se colocaron 50 μ L de la muestra en su tubo correspondiente; cada tubo, incluyendo la autofluorescencia, se homogenizó con vórtex durante 3 segundos. Todas las muestras se mantuvieron en incubación a temperatura ambiente y protegidas de la luz durante 15 minutos.

Posterior a este tiempo, se agregaron 300 μ L de FACS Lysing Solution™ 1x, con esta solución se dejaron incubar a temperatura ambiente, protegidos de la luz por 10 minutos.

Se detuvo la lisis celular añadiendo a cada tubo 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS, por *Phosphates Buffer Solution*) 1x y se centrifugaron los tubos a 1500 rpm por 5 min, este lavado también se realizó a las fenotipificación de células aisladas. Se decantó el sobrenadante, y se adquirieron en el citómetro de flujo FACS Canto II (BD Bioscience, San José, California).

Activación de sangre *ex vivo*

A partir de la muestra de sangre, se colocaron por pozo 300 μ L, posteriormente, a los pozos correspondientes a hiperglicemia se les adicionó glucosa 30 mM (HG) y a los controles manitol 30 mM (MAN), éste funciona como control de osmolaridad y se pre-incubaron por 1 hora.

Posteriormente las células se activaron con 100 ng/mL de LPS de *E. coli* cepa O111:B4, que previamente fue homogenizado por 30 min, se agregó también 1 μ L Brefeldina A (5 μ g/mL) sólo en el caso de las determinaciones intracelulares de citocinas, y se incubaron durante 4 horas para el inmunofenotipo y detección de citocinas intracelulares, y 12 horas para el caso de citocinas solubles.

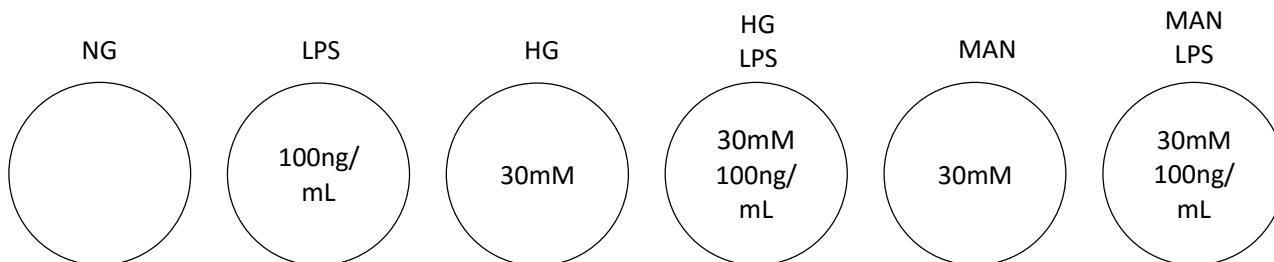


Figura 3. Esquema general de estímulos celulares. Las condiciones de estimulación corresponden a concentraciones fisiológicas de glucosa (<30 mM) normoglicémico (NG), de 30 mM o hiperglicemia (HG) y 30 mM manitol (MAN) como control de osmolaridad, estimulados o no con LPS (100 ng/mL).

Detección intracelular de citocinas

Después de la incubación, se obtuvieron 50 μ L de cada condición y se realizó el lisado de eritrocitos con 300 μ L de una solución de cloruro de amonio al 8%, posteriormente las células se lavaron, al botón se le adicionó el anticuerpo de identificación, en este caso se utilizó anti-CD14/PECy7 Clona M5E2 (BD Bioscience), como marcador de monocitos y se incubaron durante 15 minutos en oscuridad. Pasado este tiempo, las células se lavaron con PBS a 1500 rpm durante 5 minutos, y se resuspendió nuevamente el botón celular.

Se fijaron y permeabilizaron las células utilizando el kit Fix/Perm (Invitrogen) Posteriormente se agregaron los anticuerpos de detección de las citocinas TNF- α /PE Clona Mab11 (Biolegend), IL-1 β /Pacific Blue Clona H1b-98 (Biolegend) e IL-8/APC Clona E8N1 (Biolegend) y se incubaron durante 30 a 45 minutos en oscuridad, se realizó un último lavado con PBS a 1500 rpm durante 5 minutos, se decantó y resuspendió el botón celular.

Por último, se adquirieron en el citómetro de flujo FACS Canto II (BD Bioscience).

Cuantificación de citocinas secretadas

La cuantificación de citocinas solubles se realizó con el estuche de arreglo citométrico en perlas (CBA, por *Cytometric Bead Array*) de BD®. El fundamento de esta prueba es que 6 poblaciones de perlas con distintas intensidades de fluorescencia de alofocianina (APC) están unidas covalentemente, cada cual, a diferentes anticuerpos de captura específicos para las proteínas IL-8, IL-6, IL-12 y TNF- α ; los anticuerpos secundarios que reconocen a cada citocina se encuentran acoplados a ficoeritrina (PE), por lo que pueden, mediante la generación de una curva de referencia, cuantificarse las diferentes citocinas por las variaciones en los valores de intensidad media de fluorescencia (MFI, por *Mean Fluorescence Intensity*) para PE de cada perla. Las 6 poblaciones de perlas se mezclan juntas para formar el sistema que se analiza en un citómetro de flujo.

A partir del sobrenadante de las células, estimuladas como se mencionó anteriormente, se realizaron alícuotas de 200 μ L por triplicado de cada condición, cada muestra se diluyó 1:2 con diluyente antes de procesarlas, según recomendación del proveedor.

Se reconstituyeron los estándares de las citocinas mencionadas arriba, en el diluyente de ensayo y se dejaron incubar 15 minutos. De cada suspensión de citocinas, se tomaron 10 μ L y se mezclaron en un tubo de citometría, realizando así el mix de perlas.

Se realizó una curva estándar con diluciones seriadas del mix de perlas, teniendo los siguientes puntos: Concentrado y diluciones 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:36, 1:64, 1:138, 1:256 y 0.

A cada muestra, incluida la curva estándar, se le adicionaron 50 μ L del reactivo de detección y se incubaron 3 h a temperatura ambiente en oscuridad, al término de ese tiempo se lavaron con 1 mL del amortiguador de lavado a 1000 rpm por 5 minutos, luego se retiraron 800 μ L de sobrenadante y se resuspendió la muestra. Finalmente se adquirieron las muestras en el citómetro.

Resultados

Para el presente estudio se incluyeron muestra de diez voluntarios sanos cuyas características demográficas y glicemia se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Datos demográficos y valores de glicemia.

	Voluntarios incluidos: 10	
	Femeninos (n=7)	Masculinos (n=3)
Edad (años)	18-30	18-30
Glicemia (mg/dL)	106±5.5	92±6.1
Nivel normal glicémico (mg/dL)	<110	<110

Identificación de leucocitos

La estrategia de análisis para la identificación de las poblaciones celulares se realizó, determinando los eventos sencillos con los parámetros de tamaño (FSC, por *Forward Scatter*) con la señal integral (A) y altura (H), posteriormente se seleccionaron las células con tamaño (FSC-A) y complejidad (SSC-A, por *Side Scatter*) correspondiente a leucocitos. Se realizó el marcaje de CD45 a fin de confirmar las poblaciones (Figura 4a, b, c).

Posteriormente se realizó una identificación con el marcador CD14, y con ayuda de los patrones de tamaño y complejidad, así como de marcaje negativo para CD3, y así se identificaron las poblaciones de monocitos de sangre periférica, donde se evaluó la expresión de los marcadores TREM y HLA-DR (Figura 4d).

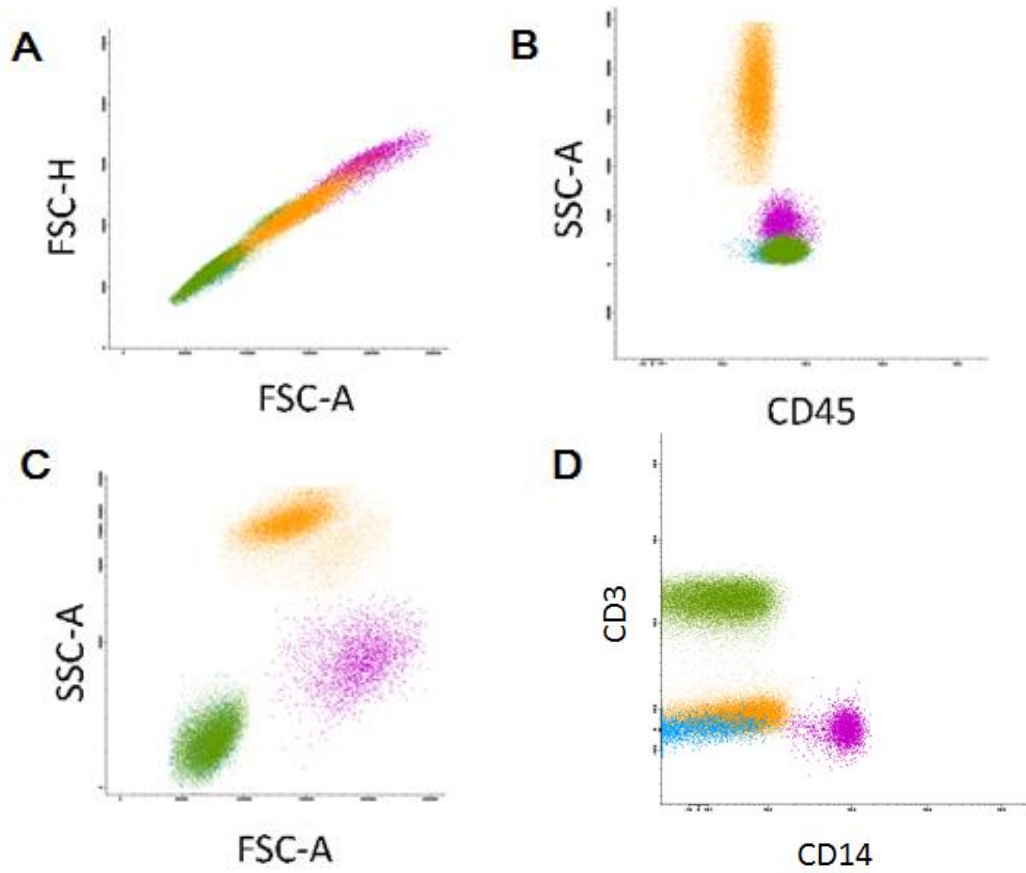


Figura 4. Algoritmo para la identificación de monocitos por citometría de flujo. A partir de la población de células correspondientes a eventos “singulares” o individuales (A) delimitados de acuerdo a una gráfica de puntos de parámetro tamaño señal área (FSC-A) vs parámetro tamaño señal pico (FSC-H) se identificaron a los leucocitos como las células CD45⁺ (B). De esta población de leucocitos, en otra gráfica de puntos de tamaño y complejidad (FSC-A vs SSC-A) se identificaron las principales poblaciones leucocitarias: pequeñas y poco granulares correspondiente a linfocitos●, grandes y granulares correspondiente a granulocitos● y células de tamaño y granularidad intermedia correspondiente a monocitos● (C). La selección de monocitos se terminó de identificar por la expresión de CD14● (D).

La hiperglicemia aumenta la secreción de IL-8 y disminuye IL-1 β e IL-6.

Se evaluó la expresión de citocinas proinflamatorias secretadas con el objetivo de saber si la hiperglicemia afectaba la producción por parte de las células activadas con LPS durante 12 horas. Al realizar el análisis estadístico se encontró que en la condición tipo hiperglicemia, aumenta significativamente la producción de IL-8 ante la estimulación con LPS (LPS 1013.14 \pm 528.61 pg/mL vs HG/LPS 13549.8 \pm 3033.33 pg/mL; $p < 0.001$). Este mismo comportamiento se encontró para la condición de hiperosmolaridad (LPS 1013.14 \pm 528.61 pg/mL vs MAN/LPS 10929.6 \pm 3443.1 pg/mL; $p < 0.001$) (Figura 5a).

La secreción de TNF e IL-10 inducidas por LPS no se modificó por las condiciones tipo hiperglicemia o de hiperosmolaridad ($p > 0.05$) (Figuras 5b y 5c).

La secreción de IL-1 β inducida por LPS disminuye significativamente en las condiciones tipo hiperglicemia y de hiperosmolaridad (LPS 3574.35 \pm 732.8 pg/mL $p > 0.05$ vs HG/LPS 3116.99 \pm 685.072 pg/mL $p > 0.01$ vs MAN/LPS 2265.4 \pm 1231.82 pg/mL $p > 0.001$) (Figura 5d). Este fenómeno se observó también en la producción de IL-6 en respuesta a LPS en la condición hiperosmolar (LPS 23258.6 \pm 1368.89 pg/mL vs MAN/LPS 19518.7 \pm 2255.62 pg/mL $p > 0.05$) (Figura 5e).

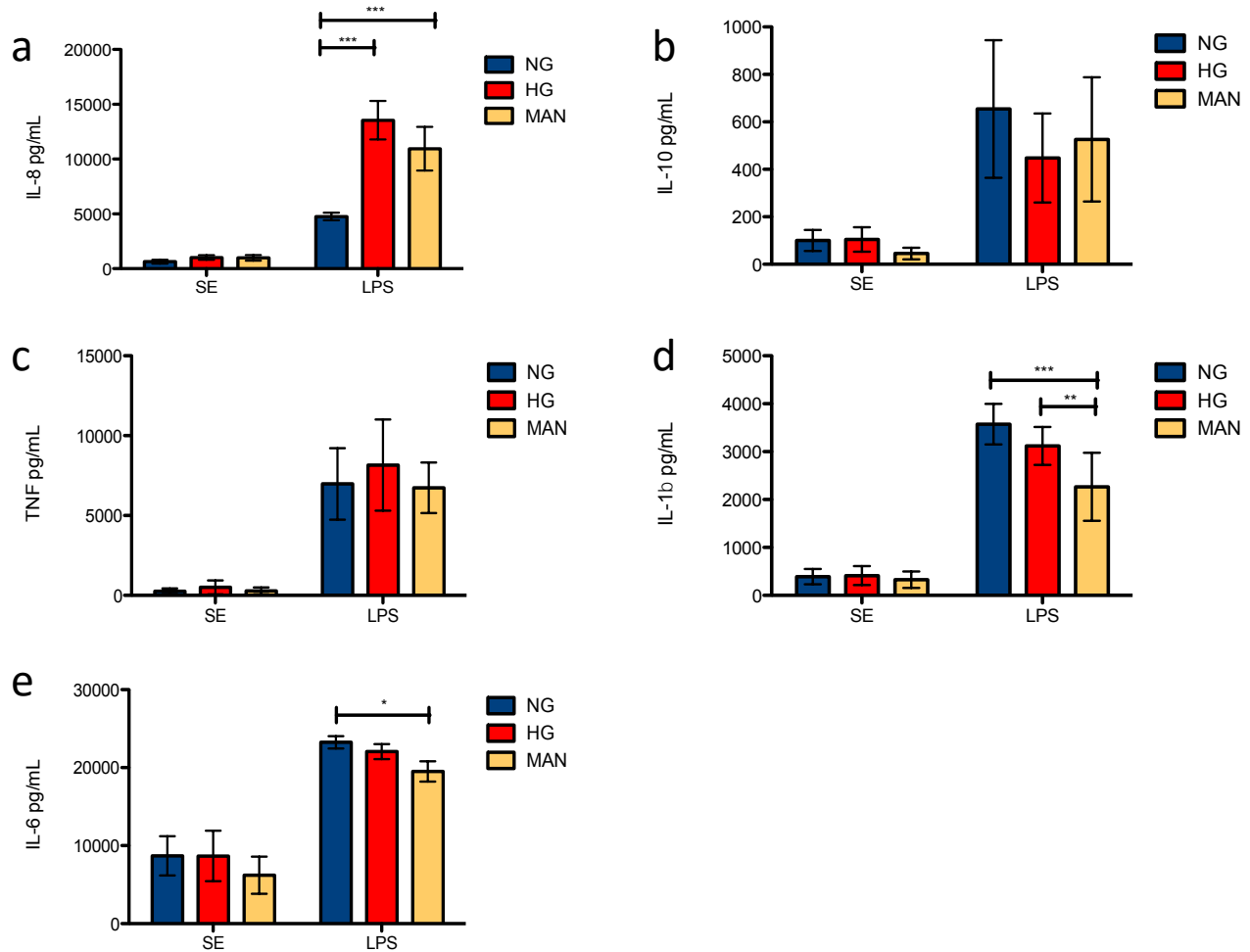


Figura 5. La condición tipo hiperglicemia e hiperosmolaridad incrementa la secreción de IL-8 y disminuye la de IL-1 β inducida por LPS en leucocitos humanos. Sangre periférica humana fue incubada *ex vivo* en condiciones tipo normoglicémicas, hiperglicémicas e hiperosmolares durante 1 h y posteriormente incubadas con LPS 100 ng/mL o no (SE) durante 12 horas. Pasado el tiempo de estimulación se colectó el sobrenadante y se cuantificaron las citocinas con sistemas de arreglos de perlas para análisis por citometría de flujo. Se muestran el promedio de concentración de tres experimentos diferentes +/- desviación estándar, para las citocina: a) IL-8, b) IL-1 β e c) IL-6. ANOVA (Análisis de varianza) 2 vías.

La hiperglicemia/hiperosmolaridad no modifica la expresión de HLA-DR y TREM-1 en monocitos humanos

Se realizó la estimulación celular con el fin de conocer si las células activadas en condiciones de hiperglicemia/hiperosmolaridad, dentro del microambiente sanguíneo, variaban el fenotipo clásico de activación, por lo que se determinó la MFI de los marcadores TREM-1 y HLA-DR.

Se observó que la expresión de estos marcadores tanto en monocitos como en neutrófilos, al realizar el análisis estadístico para ambas poblaciones, no se encuentra modificada en este tiempo de activación, por este motivo se puede afirmar que este tipo de estrés con este tiempo de estimulación, no afecta el fenotipo de activación ($p>0.05$).

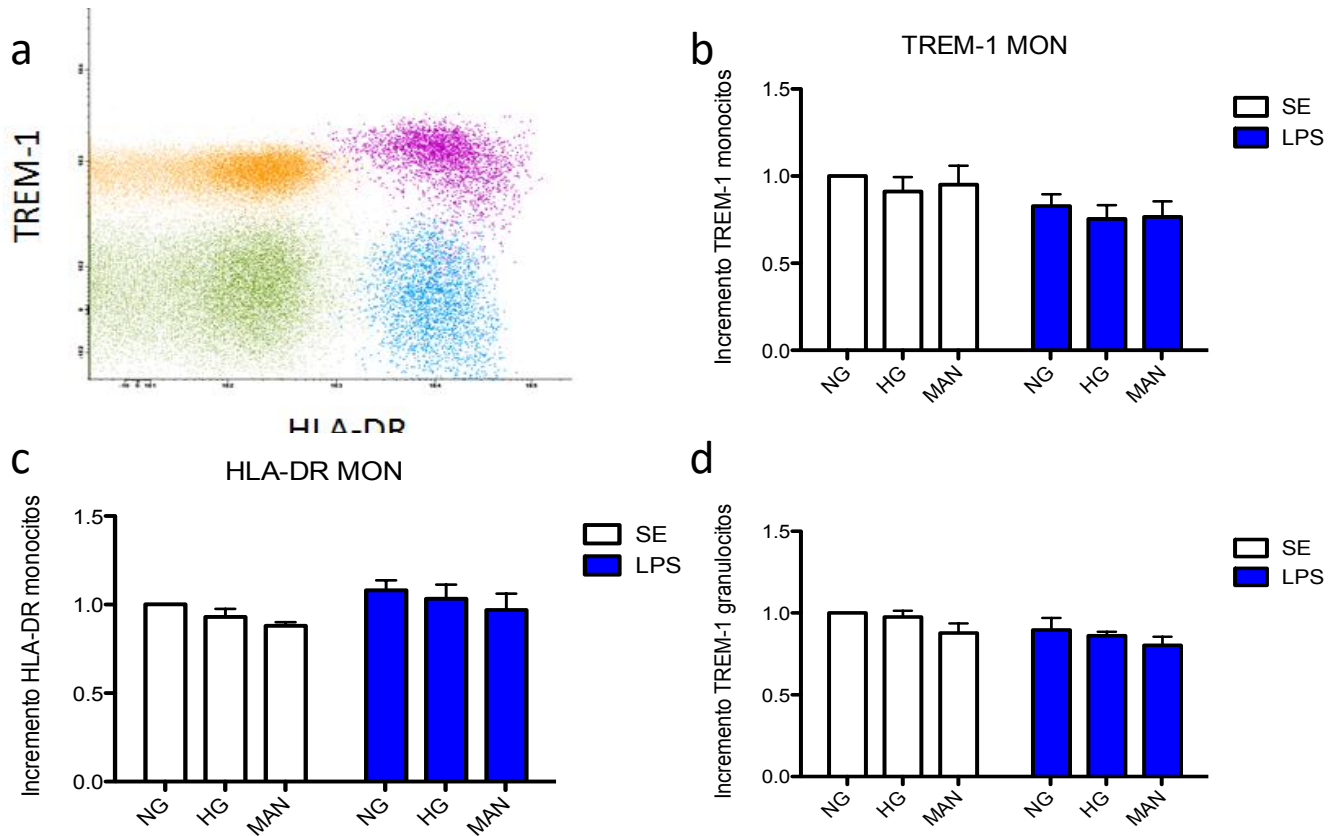


Figura 6. La condición tipo hiperglicemia no modifica la expresión de HLA-DR ni de TREM-1 en monocitos. Sangre periférica de 5 sujetos sanos se incubó durante 1 h en condiciones correspondientes a normoglicemia (NG), hiperglicemia (HG) o con manitol (MAN, como control de osmolaridad). Posteriormente se incubaron o no (SE) con LPS (100 ng/mL) durante 4 h. Se evaluó por citometría de flujo la MFI para TREM-1 y HLA-DR en leucocitos de sangre periférica clasificados de acuerdo al algoritmo referido en la figura 4. a) Dot plot de la expresión de TREM-1 y HLA-DR en las diferentes poblaciones: granulocitos ●, monocitos ● y linfocitos B ●. Los datos de MFI de la condición LPS se normalizaron respecto al estímulo y se muestra la variación de respuesta en: b) la expresión de TREM-1 en monocitos; c) la expresión de HLA-DR en monocitos; y d) la expresión de TREM-1 en granulocitos. ANOVA 2 vías.

Los monocitos son las células productoras de citocinas proinflamatorias en condiciones de activación con LPS

Con el objetivo de saber cuál población celular era la responsable de la producción de algunas de las citocinas proinflamatorias detectadas en los sobrenadantes, se realizó un experimento para detectar las citocinas intracelulares en leucocitos identificados con marcadores de superficie y se utilizó CD14 como identificador de monocitos. Se siguió la misma estrategia de análisis que en la determinación del inmunofenotipo, se determinaron los eventos sencillos con los parámetros de tamaño (FSC) con la señal integral (A) y altura (H), posteriormente se seleccionaron las células con tamaño (FSC-A) y complejidad (SSC-A) correspondiente a leucocitos. En condiciones de activación con LPS se identificó a los monocitos (células $FSC^{med}SSC^{med}CD45^{med}CD14^{+}$) como la población celular productora de TNF- α e IL-1 β (Figura 7).

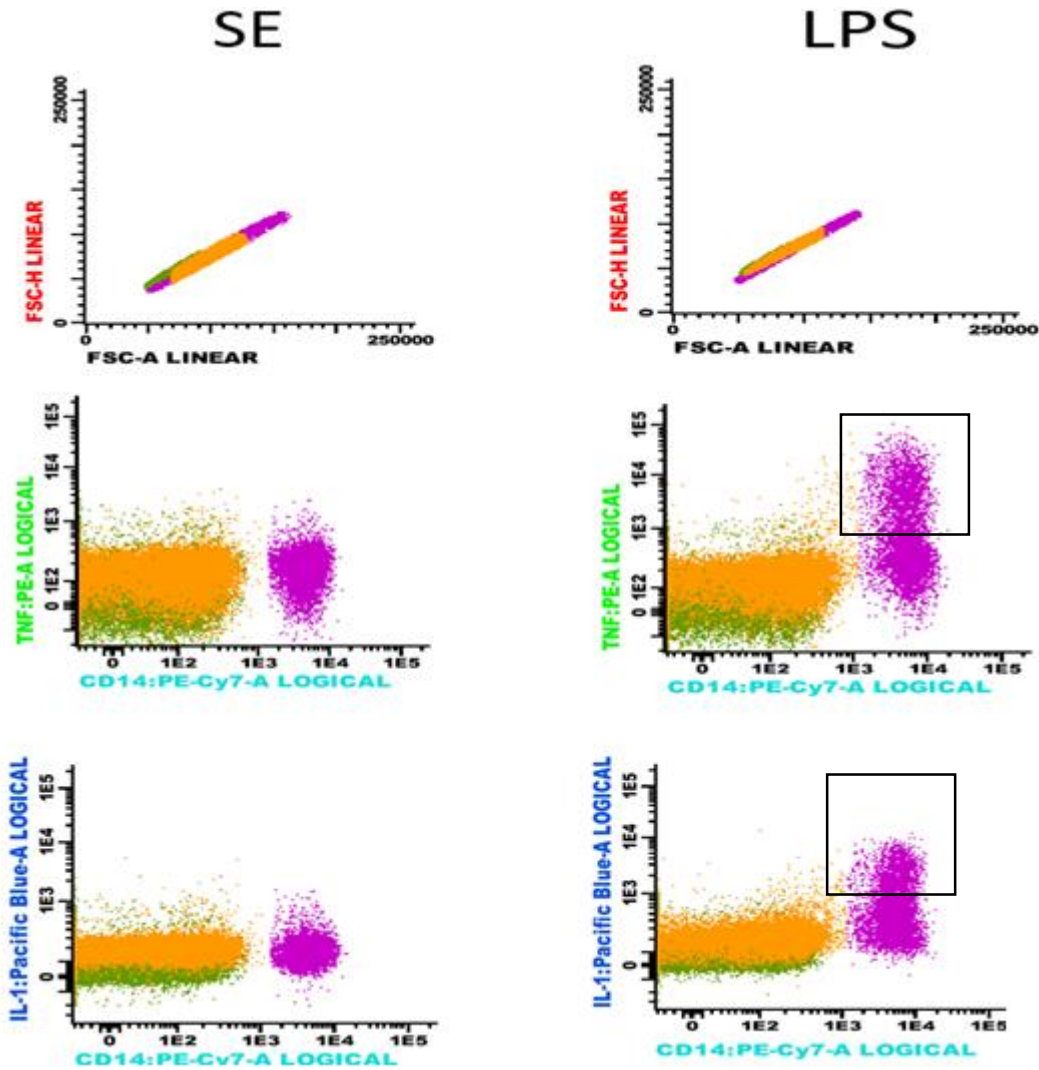


Figura 7. Los monocitos son los productores de IL-1 β y TNF- α ante el estímulo con LPS. Sangre periférica recuperada de voluntarios sanos se incubó durante 4 h en presencia o ausencia (SE) de LPS (100 ng/mL). En ambos tipos de condiciones SE y LPS se identificaron los eventos sencillos (gráfica de puntos FSC-A vs FSC-H), y se identificó la población monocitos, CD14⁺• productores de TNF- α (a) o IL-1 β (b).

En condiciones de hiperglicemia se incrementa la producción de IL-8 por células mieloides humanas

Con la misma estrategia descrita para IL-1 β y TNF- α (Figura 7), se determinó a nivel intracelular qué poblaciones eran las responsables de la producción de citocinas, observándose que además de los monocitos (células CD14⁺ que además fueran FSC^{med}SSC^{med}CD45^{med}), los granulocitos (células FSC^{het}SSC^{hi}CD45^{low}CD14⁻)

participan en la producción de IL-8, para lo que se analizó el valor de MFI correspondiente a la fluorescencia alofococianina (APC) que correspondía al anticuerpo anti-IL-8.

Se puede observar que monocitos (Figura 8a) y granulocitos (Figura 8b) incrementan significativamente la producción de IL-8 en respuesta a LPS en condiciones de hiperglicemia (LPS 2.3 ± 1.4 de incremento vs HG/LPS 3.5 ± 1.9 de incremento, $p > 0.05$).

Por otro lado, el porcentaje de monocitos productores de IL-8 se incrementa significativamente en condiciones de hiperglicemia en comparación con el grupo normoglicémico (LPS 74.7 ± 19.2 vs HG/LPS 95.1 ± 3.5 , $p > 0.05$ vs MAN 84.3 ± 3.2) (Figura 8c).

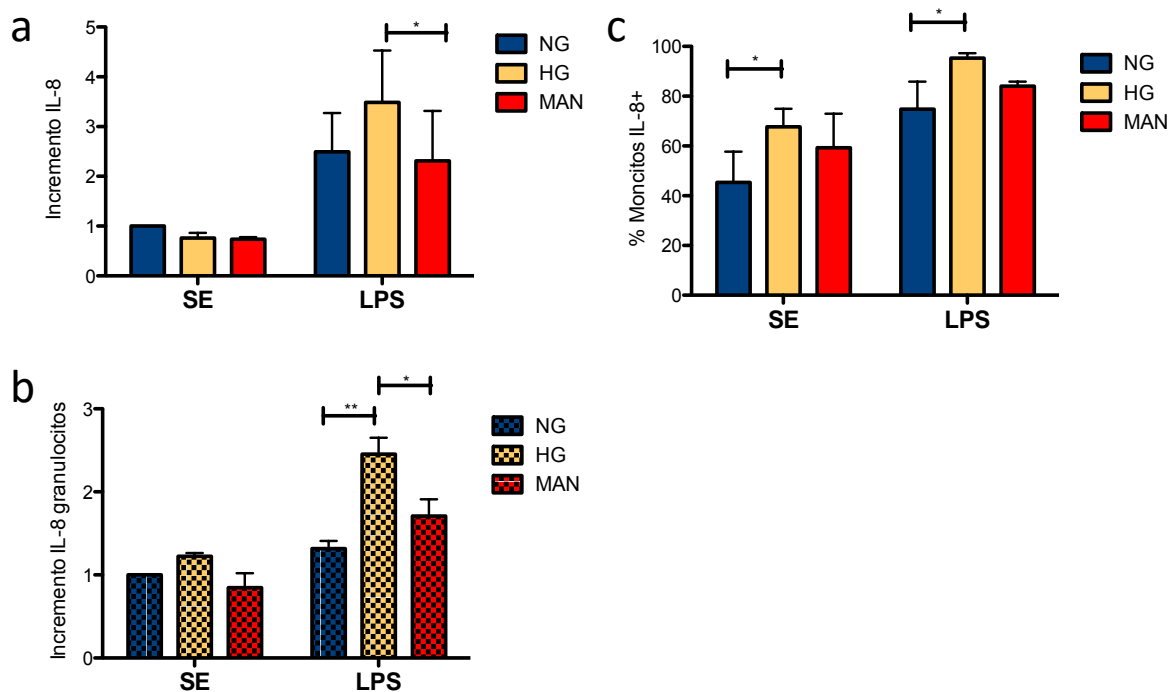


Figura 8. La hiperglicemia potencia la producción de IL-8 en células mieloides humanas activadas con LPS. La sangre periférica humana de 3 voluntarios se incubó *ex vivo* en condiciones tipo normoglicémicas (NG), hiperglicémicas (HG) e hiperosmolares (MAN) y 1 h después con LPS 100 ng/mL o no (SE) durante 4 horas más previo al análisis por citometría de flujo para determinar de presencia de IL-8 en monocitos y granulocitos. Se presentan los valores normalizados del incremento de la condición LPS respecto a la condición SE de IL-8 en a) monocitos y b) granulocitos. Se presenta en C) el valor medio con su desviación estándar de la proporción (%) de monocitos productores de IL-8 (n=3). ANOVA 2 vías.

El estrés hiperosmolar incrementa la proporción de monocitos productores de IL-1 β

En la proporción de monocitos productores de IL-1 β , existe diferencia significativa en condiciones de hiperglicemia pero es mayor en el grupo que se utilizó como control de osmolaridad (LPS 19.94 \pm 6.51 vs HG/LPS 38.78 \pm 18.18, $p > 0.05$ vs MAN 43.97 \pm 22.91, $p > 0.01$) (Figura 9).

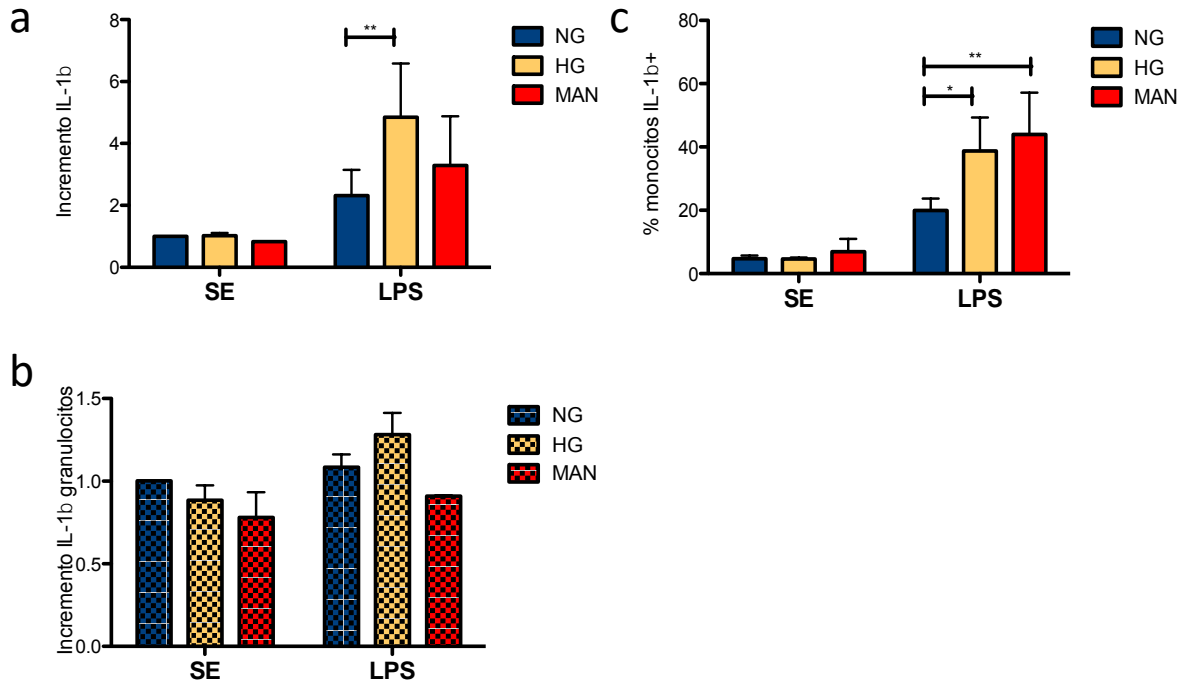


Figura 9. La hiperosmolaridad incrementa el porcentaje de monocitos, activados con LPS, productores de IL-1 β intracelular. Sangre periférica humana de 3 voluntarios fue incubada *ex vivo* en condiciones tipo normoglicémicas (NG), hiperglicémicas (HG) e hiperosmolares (MAN) y 1 h después con LPS 100 ng/mL o no (SE), todas en presencia de brefeldina A, durante 4 h más previo al análisis por citometría de flujo para determinar de presencia de IL-1 β en monocitos y granulocitos. Se muestran los valores normalizados del incremento de la condición LPS respecto a la condición SE de IL-1 β en a) monocitos y b) granulocitos. Se muestra en c) el valor medio con su desviación estándar de la proporción (%) de monocitos productores de IL-1 β (n=3). ANOVA 2 vías.

La hiperosmolaridad incrementa la proporción de monocitos productores de TNF- α en respuesta a LPS.

Se observó que la activación celular con LPS muestra diferencia significativa en la producción de TNF- α por parte de los monocitos estimulados con LPS en condiciones de hiperglicemia en comparación con la hiperosmolaridad (HG/LPS 11.53 ± 3.34 vs MAN 8.31 ± 4.87 , $p < 0.05$). De igual manera existe una diferencia en la producción de TNF- α por parte de los neutrófilos entre los grupos estimulados en hiperglicemia y en hiperosmolaridad ($p < 0.05$).

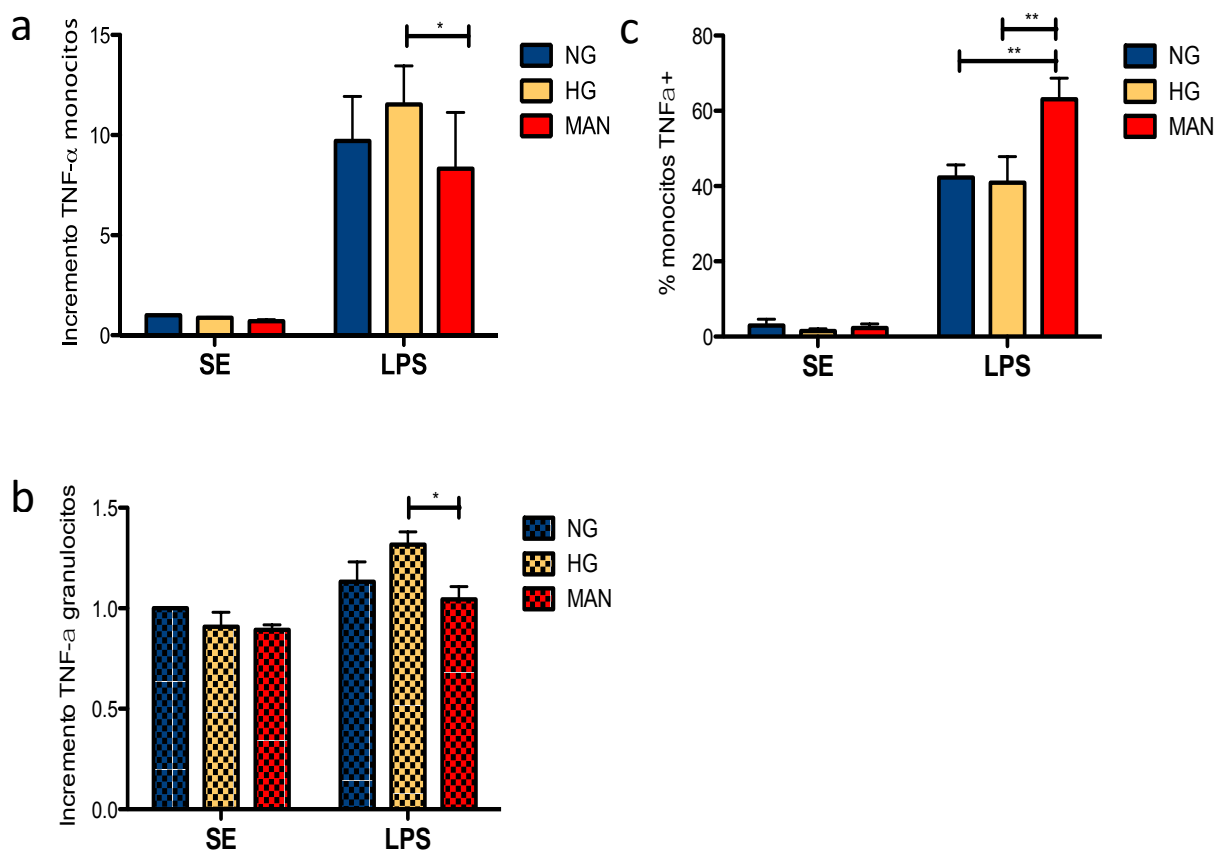


Figura 10. La hiperosmolaridad aumenta la proporción de monocitos productores de TNF- α . a) Detección de TNF- α en monocitos, proporción de monocitos productores de TNF- α , b) Proporción de granulocitos productores de TNF- α .

Discusión

Enfermedades con alta prevalencia en México y en el mundo como diabetes, y otras como sepsis, tienen picos de hiperglicemia en los pacientes, esto se asocia a mal pronóstico, y en los modelos descritos no se había caracterizado el efecto de la alta concentración de glucosa en sangre total, es por ello la importancia de este trabajo. Es bien conocido que los monocitos pueden adquirir la glucosa porque expresan las isoformas del transportador de glucosa (GLUT) GLUT1, GLUT3 y GLUT5, pero expresión ausente de GLUT2 y GLUT4, se sabe que este último es dependiente de insulina, mientras que el GLUT 1 y GLUT3 son constitutivos. Es posible entonces que estas células tengan diferentes capacidades para metabolizar la glucosa, en comparación con las de células que dependen de insulina para la captación de la misma. Así, en teoría, al tener transportadores de glucosa que son independientes de la insulina, los resultados encontrados serán siempre reproducibles sin importar si el sujeto en cuestión tiene baja o nula producción de insulina^{32, 33}. Por otro lado, la glucosa además constituye en las soluciones y suspensiones, como el tejido sanguíneo un osmol más. Por ello es importante en los ensayos que exploren modificaciones de la glicemia incluir un control de osmolaridad, siendo el más utilizado el manitol³⁴.

Con el fin de conocer la respuesta ante LPS de células sanguíneas en condiciones tipo hiperglicemia se analizó la capacidad de secreción y producción de perfil de citocinas por diferentes leucocitos. Al realizar la cuantificación de citocinas, se observaron cambios que no se encuentran descritos en la literatura, como la disminución de IL-1 β e IL-6 (Figura 5d y 5e). En referencias previas se comenta el aumento de estas citocinas en condiciones hiperglicémicas, sin embargo, estas mediciones se realizaron a las 12 h, se puede afirmar que a este tiempo el estrés hiperglicémico disminuye la producción de estas citocinas, dentro de este experimento se realizó otro hallazgo importante que fue la alta producción de IL-8 (Figura 5a).

Como se esperaba de acuerdo a varios reportes previos³⁵, ante el estímulo de LPS, son los monocitos los principales leucocitos que responden a este PAMP, produciendo IL-1 β , TNF e IL-8 (Figura 7, 8a, 9a).

Se conoce de la literatura que TREM-1 se encuentra sobreexpresado en monocitos y neutrófilos estimulados con LPS²⁰ y que la expresión de HLA-DR, presente en monocitos y macrófagos, se encuentra disminuida en condiciones *in vitro* o de inflamación sistémica, como en sepsis y pancreatitis³¹.

Se ha reportado también que el pico de expresión de HLA-DR y TREM-1 es a las 2 h y 4 h respectivamente, también se ha asociado que TREM-1 únicamente se modifica de manera constante en el género masculino, mientras que en mujeres la expresión es variable³⁶, a estas razones se atribuye el hecho de que no se haya encontrado variaciones en la expresión de estos marcadores como se esperaba.

Con base en lo anterior, se puede afirmar que el estrés hiperosmolar no induce cambios dentro de la expresión del inmunofenotipo, sin embargo, se puede apreciar una ligera tendencia de HLA-DR a disminuir, aunque sin significancia estadística.

Se realizaron análisis citométricos para determinar qué población era la que estaba produciendo las citocinas mencionadas arriba. Hubo diferencia en la producción de IL-8 por parte de los monocitos, aunque principalmente, en los neutrófilos. Se sabe que esta última población de células es una gran productora de dicha quimiocina³⁷, sin embargo de manera muy interesante, pues no se tienen reportes al respecto, esta gran producción se dio en condiciones de hiperglicemia.

Contrario a lo observado en las citocinas secretadas se encontró que el estrés hiperosmolar incrementa el número de monocitos productores de IL-1 β aunque esto no impacta en la cantidad de citocina producida, esto nos dice que aunque muchos monocitos están respondiendo al estrés hiperosmolar, su capacidad para producir citocina no es tan alta, esto mismo ocurre en el caso de TNF- α (Figuras 9a y 10a). Sin embargo la falta de diferencia a nivel soluble puede ser porque el efecto de la hiperglicemia sea sólo adelantar la producción de esta citocina.

Aunque a nivel soluble se observa que la producción de IL-1 β , una de las citocinas con mayor importancia en la respuesta inflamatoria, es menor en condiciones de hiperglicemia e hiperosmolaridad se observó que los monocitos aumentan la producción de esta citocina, sin embargo los neutrófilos no participan en la producción de esta.

Probablemente a nivel soluble las concentraciones se vean disminuidos por su mayor uso por otras estirpes celulares como los neutrófilos, linfocitos T e incluso de manera autócrina y parácrina por los propios monocitos, induciendo una regulación negativa en su producción.

La diferencia mencionada entre la expresión de IL-1 β de manera intracelular contra la concentración soluble, se puede explicar con un modelo de células HMC-1 que son estimuladas con la citocina IL-1 β y como resultado se obtiene que la producción de IL-8 se ve favorecida y potenciada por la IL-1 β ³⁸. Dicho esto, es posible entender la alta producción de IL-8, y la baja concentración de IL-1 β en este modelo de hiperglicemia, pues hay grandes probabilidades de que esté siendo ocupada por los mismos monocitos y los granulocitos para la producción de la IL-8, es por eso que aunque encontramos una alta proporción de monocitos productores de IL-1 β en hiperosmolaridad y una alta expresión a nivel intracelular, no se refleja en la cuantificación de citocinas a nivel soluble.

Los niveles elevados de IL-1 β a nivel celular pueden ser resultado de mayor expresión o bien de mayor concentración de esta citocina, sin embargo a nivel soluble esto no se refleja.

Aunque a nivel soluble no se observaron diferencias entre la condición de hiperglicemia y la condición hiperosmolar, a nivel celular se observa que en la hiperglicemia los granulocitos son células capaces al igual que los monocitos, en responder ante la hiperglicemia, haciendo suponer que los mecanismos de inducción de esta quimiocina, en ambas situaciones, pueden ser diferentes. Sin embargo, el cambio más representativo es el incremento de la proporción de monocitos productores de dicha citocina.

Estos datos, apuntan a que más que la hiperglicemia *per se*, son sus efectos osmolares los que modifican la producción de citocinas, sin embargo, este efecto no es aplicable para la producción de todas las citocinas, ya que se observa que la única molécula que aumenta su producción en hiperglicemia/hiperosmolaridad es la quimiocina IL-8, sin embargo IL-1 β sufre el efecto contrario ya que en estas condiciones, su producción es menor (Figura 8a, 8b, 9a y 9b).

Los cambios que se observan en condiciones de estrés hiperosmolar, ya sea con glucosa o manitol, aumenta la producción de todas las citocinas proinflamatorias, sin embargo, la gran diferencia entre la IL-8 y las demás citocinas es que la IL-8 conserva este patrón de comportamiento a nivel soluble, mientras que en el resto de las citocinas sólo se refleja este comportamiento en la producción de citocinas de manera intracelular, esto puede deberse a que otro tipo de células estén utilizando estas citocinas o a que, a manera de equilibrar, dichas citocinas se dejen de producir por retroalimentación negativa.

Dentro de los cambios de producción de la IL-8, también se puede apreciar el hecho de que pareciera ser que los mecanismos por los cuales se está produciendo, en respuesta al estrés por glucosa o manitol, son diferentes ya que se observa que a nivel celular la producción de IL-8 es mayor y aumenta la proporción de monocitos productores, esta situación hace pensar que a nivel soluble la producción de IL-8 también fuera mayor que en el estrés hiperosmolar por manitol, sin embargo se observa lo contrario (Figura 8a).

Conclusión

La hiperglicemia aguda transitoria *ex vivo* en los monocitos incrementa su capacidad de respuesta a LPS, aun cuando no se modifique en ellos la expresión de marcadores de activación como HLA-DR y TREM-1. Lo anterior probablemente se relacione con respuestas moduladas en fases más tardías de inflamación.

Referencias

1. Abbas, A.K., Lichtman, Andrew H., Pillai, Shiv *Inmunología celular y molecular*, Edn. 7. (Elsevier España, S.L., Traversera de Gracia, 17-21 -0 8 0 2 1 Barcelona, España; 2012).
2. Fleisher, T.A. & Bleesing, J.J. Immune function. *Pediatric clinics of North America* **47**, 1197-1209 (2000).
3. Feghali, C.A. & Wright, T.M. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **2**, d12-26 (1997).
4. Perez-Martinez, L.P.-A., G. Ferat-Osorio, E. Acute inflammatory response. *Molecular Aspects of Inflammation*, 231 (2013).
5. Murphy, K., Travers, P., Walport, M. *Inmunobiología de Janeway*, Edn. 7a. (McGraw-Hill Interamericana Editores, México, D.F.; 2009).
6. Hoesel, L.M., Gao, H. & Ward, P.A. New insights into cellular mechanisms during sepsis. *Immunologic research* **34**, 133-141 (2006).
7. Schlag, G. & Redl, H. Mediators of injury and inflammation. *World journal of surgery* **20**, 406-410 (1996).
8. Bone, R.C. *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* **101**, 1644-1655 (1992).
9. Bone, R.C. *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992. *Chest* **136**, e28 (2009).

10. Robbins, S.L., Kumar, V. & Cotran, R.S. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*, Edn. 8th. (Saunders/Elsevier, Philadelphia, PA; 2010).
11. Hotamisligil, G.S. & Erbay, E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nature reviews. Immunology* **8**, 923-934 (2008).
12. Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805-820 (2010).
13. Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801 (2006).
14. Takeda, K., Kaisho, T. & Akira, S. Toll-like receptors. *Annual review of immunology* **21**, 335-376 (2003).
15. O'Neill, L.A., Golenbock, D. & Bowie, A.G. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nature reviews. Immunology* **13**, 453-460 (2013).
16. Aimée Dominguez Nieto, A.Z.D., Juan Raymundo Velázquez Rodríguez in *Revista de Educación Bioquímica*, Vol. 28 125-131 (Red de Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España y Portugal, México; 2009).
17. Sokolowska-Wojdylo, M., Olek-Hrab, K. & Ruckemann-Dziurdzinska, K. Primary cutaneous lymphomas: diagnosis and treatment. *Postepy dermatologii i alergologii* **32**, 368-383 (2015).
18. Huschak, G., Zur Nieden, K., Stuttmann, R. & Riemann, D. Changes in monocytic expression of aminopeptidase N/CD13 after major trauma. *Clinical and experimental immunology* **134**, 491-496 (2003).
19. Shantsila, E. *et al.* Immunophenotypic characterization of human monocyte subsets: possible implications for cardiovascular disease pathophysiology. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **9**, 1056-1066 (2011).

20. Klesney-Tait, J., Turnbull, I.R. & Colonna, M. The TREM receptor family and signal integration. *Nature immunology* **7**, 1266-1273 (2006).
21. Radulovic, K. & Niess, J.H. CD69 is the crucial regulator of intestinal inflammation: a new target molecule for IBD treatment? *Journal of immunology research* **2015**, 497056 (2015).
22. Rattanataweeboon, P., Vilaichone, W. & Vannasaeng, S. Stress hyperglycemia in patients with sepsis. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet* **92 Suppl 2**, S88-94 (2009).
23. Ip, W.K. & Medzhitov, R. Macrophages monitor tissue osmolarity and induce inflammatory response through NLRP3 and NLRC4 inflammasome activation. *Nature communications* **6**, 6931 (2015).
24. Andersen, S.K., Gjedsted, J., Christiansen, C. & Tonnesen, E. The roles of insulin and hyperglycemia in sepsis pathogenesis. *Journal of leukocyte biology* **75**, 413-421 (2004).
25. Hirasawa, H., Oda, S. & Nakamura, M. Blood glucose control in patients with severe sepsis and septic shock. *World journal of gastroenterology : WJG* **15**, 4132-4136 (2009).
26. Sandireddy, R., Yerra, V.G., Areti, A., Komirishetty, P. & Kumar, A. Neuroinflammation and oxidative stress in diabetic neuropathy: futuristic strategies based on these targets. *International journal of endocrinology* **2014**, 674987 (2014).
27. Gyurko, R. *et al.* Chronic hyperglycemia predisposes to exaggerated inflammatory response and leukocyte dysfunction in Akita mice. *J Immunol* **177**, 7250-7256 (2006).
28. Basta, G., Schmidt, A.M. & De Caterina, R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovascular research* **63**, 582-592 (2004).

29. 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).
30. Dasu, M.R., Devaraj, S., Zhao, L., Hwang, D.H. & Jialal, I. High glucose induces toll-like receptor expression in human monocytes: mechanism of activation. *Diabetes* **57**, 3090-3098 (2008).
31. Ferat-Osorio, E. *et al.* Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 expression on monocytes is associated with inflammation but not with infection in acute pancreatitis. *Crit Care* **13**, R69 (2009).
32. Thorens, B. & Mueckler, M. Glucose transporters in the 21st Century. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **298**, E141-145 (2010).
33. Mueckler, M. & Thorens, B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Molecular aspects of medicine* **34**, 121-138 (2013).
34. Igarashi, M. *et al.* Glucose or diabetes activates p38 mitogen-activated protein kinase via different pathways. *The Journal of clinical investigation* **103**, 185-195 (1999).
35. Morris, M.C., Gilliam, E.A. & Li, L. Innate immune programming by endotoxin and its pathological consequences. *Frontiers in immunology* **5**, 680 (2014).
36. Jiménez, A., P. in *Inmunología*, Vol. Maestría (Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México; 2012).
37. Allen, T.C. & Kurdowska, A. Interleukin 8 and acute lung injury. *Archives of pathology & laboratory medicine* **138**, 266-269 (2014).

38. Kim, G.Y. *et al.* Proinflammatory cytokine IL-1beta stimulates IL-8 synthesis in mast cells via a leukotriene B4 receptor 2-linked pathway, contributing to angiogenesis. *J Immunol* **184**, 3946-3954 (2010).