

Revista Chilena de Endocrinología y Diabetes

Sumario

Editorial

Décimo aniversario de la Revista Chilena de Endocrinología y Diabetes.
pág. 45

Artículos Originales

Efecto de la activación del Receptor Sensor de Calcio sobre la expresión de genes lipogénicos en células HepG2.
pág. 47

Estudio e identificación de microRNA en exosomas urinarios en hipertensión arterial mineralocorticoide.
pág. 54

Cinética de muerte de linfocitos en diabetes mellitus tipo 1 y su posible asociación con miR-146a y miR-155.
pág. 62

Caso Clínico

Hiponatremia grave en paciente con anorexia nerviosa. Caso clínico y revisión de la literatura.
pág. 69

Summary

Editorial

10th anniversary of the Chilean Journal of Endocrinology and Diabetes.
pp. 45

Original Articles

Effect of Calcium Sensing Receptor activation on lipogenic gene expression in HepG2 cells.
pp. 47

Study and identification of microRNA in urinary exosomes in mineralocorticoid arterial hypertension.
pp. 54

Kinetics of cell death in type 1 diabetes mellitus and their possible association with miR-146a and miR-155.
pp. 62

Clinical Case

Severe hyponatremia in a patient with anorexia nervosa. Case report and review of literature.
pp. 69

Revista Chilena de Endocrinología y Diabetes (Rev. chil. endocrinol. diabetes)

Fundada en enero de 2008 como Órgano Oficial de la Sociedad Chilena de Endocrinología y Diabetes en conmemoración de sus 50 años de vida.

La Revista Chilena de Endocrinología y Diabetes, se publica trimestralmente, y contiene trabajos originales sobre temas de Endocrinología y Diabetes, en su vertiente clínica de adultos y niños, y también de Ciencias Básicas relacionadas a la disciplina.

Está incluida en la base de datos Latinex-Sistema Regional de Información en Línea para Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España y Portugal.

Los artículos enviados deben cumplir con los requisitos que aparecen publicados en el primer número de cada año de la Revista bajo el Título: "Instrucciones para los Autores", y que están también disponibles en la página electrónica de la Sociedad Chilena de Endocrinología y Diabetes www.soched.cl.

Los trabajos enviados son sometidos al sistema de revisión de pares; esta evaluación está a cargo del Comité Editorial Asesor y de los Editores.

Los trabajos deben enviarse a la Revista Chilena de Endocrinología y Diabetes, a la dirección: Bernarda Morín 488, 3^{er} piso, Providencia, Santiago.

La Revista se reserva el derecho de hacer modificaciones de forma al texto sometido para su eventual publicación.

Suscripciones:

Sin costo para los Socios de la Sociedad Chilena de Endocrinología y Diabetes.

Todo cambio de dirección deberá comunicarse oportunamente. La Revista no se responsabiliza por la pérdida de ejemplares debido al no cumplimiento de esta disposición.

Dirección Postal Revista SOCHED

Bernarda Morín 488, 3^{er} piso, Providencia, Santiago, Chile.

Tel: (56) - 02 - 2223 0386

(56) - 02 - 2753 5555

Fax: (56) - 02 - 2753 5556

E-mail: revendodiab@soched.cl

Producción

Editorial IKU Ltda.

Manquehue Sur 520 Of. 328, Las Condes.
Santiago de Chile.

Tel/Fax (2) 2212 63 84

E-mail: mcristina@editorialiku.cl

Editor

Dr. Francisco Pérez Bravo

Co-Editor Médico

Dr. Claudio Liberman G.

Co-Editor Bioestadístico

Dr. Gabriel Cavada Chacón

Traducción al inglés

Dr. Daniel Bunout Barnet

Secretaría

Srta. Jennifer Dixon Gatica

Comité Editorial Asesor

Dr. Fernando Cassorla G.	IDIMI/Hospital San Borja Arriarán. Universidad de Chile.
Dra. Ethel Codner D.	IDIMI/Hospital San Borja Arriarán. Universidad de Chile.
Dr. Oscar Contreras O.	Dpto. Radiología Pontificia Universidad Católica de Chile.
Dr. Carlos Fardella B.	Dpto. Endocrinología Pontificia Universidad Católica de Chile.
Dra. Cecilia Jhonson P.	IDIMI/Hospital San Borja Arriarán. Universidad de Chile.
Dra. Gladys Larenas Y.	Dpto. Endocrinología Universidad de La Frontera.
Dr. Claudio Liberman G.	Dpto. Endocrinología Hospital Clínico Universidad de Chile.
Dr. Rodrigo Macaya P.	Dpto. Ginecología y Obstetricia. Clínica Las Condes.
Dr. Alberto Maiz G.	Dpto. Nutrición/Diabetes Pontificia Universidad Católica de Chile.
Dra. Elisa Marusic B.	Unidad Fisiopatología Universidad de los Andes.
Dra. Verónica Mericq G.	IDIMI/Hospital San Borja Arriarán. Universidad de Chile.
Dr. Fernando Munizaga C.	Dpto. Endocrinología Hospital San Borja Arriarán.
Dr. Gilberto González V.	Dpto. Endocrinología Pontificia Universidad Católica de Chile.
Dr. José A. Rodríguez P.	Dpto. Endocrinología Pontificia Universidad Católica de Chile.
Dr. José Luis Santos M.	Dpto. Nutrición/Diabetes Pontificia Universidad Católica de Chile.
Dra. María J. Serón-Ferré	Lab. Cronobiología Universidad de Chile.
Dra. Teresa Sir P.	Lab. Endocrinología y Metabolismo Hospital San Juan de Dios.
Dra. Paulina Villaseca D.	Dpto. Endocrinología Pontificia Universidad Católica de Chile.

Comité Editorial Asesor Regional

Dr. Domingo Montalvo V.	Hospital Regional Juan Noé de Arica.
Dra. Vinka Giadrosik R.	Escuela de Medicina. Universidad de Valparaíso.
Dra. Verónica Mujica E.	Facultad de Medicina. Universidad de Talca.
Dra. Sylvia Asenjo M.	Facultad de Medicina. Universidad de Concepción.
Dr. Jorge Sapunar Z.	Facultad de Medicina. Universidad de La Frontera.

Comité Editorial Asesor Internacional

Dr. Antonio Fontanellas	Centro de Investigaciones Médicas Avanzadas (CIMA). Universidad de Navarra, Pamplona. España.
Dr. Luis Mauricio Hurtado L.	Unidad de Cirugía General y Clínica de Tiroides. Hospital General de México. D.F. México.
Dr. Camilo Jiménez	Departamento de Neoplasias Endocrinas y Desórdenes Hormonales. División de Medicina Interna. The University of Texas. Anderson Cancer Center. Houston, USA.
Dr. José Alfredo Martínez	Catedrático de Nutrición. Departamento de Fisiología y Nutrición. Universidad de Navarra, Pamplona. España.
Dr. Rodolfo Rey	Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE-CONICET), División de Endocrinología, Hospital de Niños R. Gutiérrez, Buenos Aires. Argentina.
Dr. Alfredo Reza Albarrán	Profesor de Endocrinología y Medicina Interna. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Instituto de la Nutrición Salvador Zubirán, D.F. México.
Dr. Juan Francisco Santibáñez	Professor of Research Institute for Medical Research. University of Belgrade. Belgrado, Serbia.
Dr. Manuel Serrano-Ríos	Catedrático de Medicina Interna. Hospital Clínico San Carlos. Universidad Complutense de Madrid. España.



Fundada el 4 de junio de 1958.

Sociedad Filial de la Sociedad Médica de Santiago (Sociedad Chilena de Medicina Interna)

Directorio 2016 - 2018

Presidente

Dra. Carmen Gloria Aylwin H.

Past Presidente

Dr. Jorge Sapunar Z.

Vicepresidente

Dr. Pedro Pineda B.

Secretaria General

Dra. Erika Díaz V.

Tesorero

Dr. José Miguel Domínguez R-T.

Directores

Dra. María Soledad Báez P.	(Representante Provincia No GES)
Dra. María Eugenia Bruzzone V.	(Representante Ciencias Fundamentales)
Dra. María Victoria Figueroa F.	(Representante Área Oriente)
Dra. Amanda Ladrón de Guevara H.	(Representante Área Occidente)
Dr. Rodolfo Lahsen M.	(Representante Hospitales Institucionales y Clínicas Privadas)
Dra. Alejandra Martínez G.	(Representante Pontificia Universidad Católica de Chile)
Dra. Virginia Pérez F.	(Representante Pediatría)
Dr. Rafael Ríos S.	(Representante Área Centro-Sur)
Dr. Patricio Salman M.	(Representante GES)
Dra. Cecilia Vargas R.	(Representante Área Norte)

Invitada

Dra. Jocelyn Cortés R. (Representante Becados)

La Sociedad Chilena de Endocrinología y Diabetes está estructurada en función de Comités de Trabajo, los cuales comprenden las siguientes áreas:

Comité Científico

Comité de Investigación

Comité de Ética

Comité de Socios

Comité de Docencia

Comité de Página Web

Sociedad Chilena de Endocrinología y Diabetes

Secretaria de la Presidencia: Sra. Ximena Quinteros F.

Tel. (2) 2223 0386 - (2) 2753 5555 Fax (2) 2753 5556

Bernarda Morín 488, 3^{er} piso, Providencia. Santiago, Chile.

e-mail: soched@soched.cl

www.soched.cl

Contenido

Editorial

Décimo aniversario de la Revista Chilena de Endocrinología y Diabetes
José Manuel López Moreno 45

Artículos Originales

Efecto de la activación del Receptor Sensor de Calcio sobre la expresión de genes lipogénicos en células HepG2.
Pía Villarroel y Mariana Cifuentes 47

Estudio e identificación de microRNA en exosomas urinarios en hipertensión arterial mineralocorticoide.
Alejandra Tapia-Castillo, Carolina Valdivia P., Carmen Campino J., Fidel Allende, Sandra Solari, David Ortiz, Eric Barros, Andrea Vecchiola, Rene Baudrand, Carlos Fardella y Cristian Carvajal M. 54

Cinética de muerte de linfocitos en diabetes mellitus tipo 1 y su posible asociación con miR-146a y miR-155.
Lissette Duarte S., Georhan Mancilla A., Diego F. García-Díaz, Néstor Soto I. y Francisco Pérez B. 62

Caso Clínico

Hiponatremia grave en paciente con anorexia nerviosa.
Caso clínico y revisión de la literatura.
Patricio Salman M. y Andrea Sáez E. 69

Ética, Humanismo y Sociedad

Integrativo o nada.
José Carlos Bermejo 72

Comentarios de Literatura Destacada

Álvaro Pérez Bazán y Gabriel Cavada Ch. 74

Calendario de Cursos, Simposios y Congresos

76

Instrucciones a los Autores

77

Content

Editorial

10th anniversary of the Chilean Journal of Endocrinology and Diabetes.
José Manuel López Moreno 45

Original Articles

Effect of Calcium Sensing Receptor activation on lipogenic gene expression in HepG2 cells.
Pia Villarroel and Mariana Cifuentes 47

Study and identification of microRNA in urinary exosomes in mineralocorticoid arterial hypertension.
Alejandra Tapia-Castillo, Carolina Valdivia P., Carmen Campino J., Fidel Allende, Sandra Solari, David Ortiz, Eric Barros, Andrea Vecchiola, Rene Baudrand, Carlos Fardella and Cristian Carvajal M. 54

Kinetics of cell death in type 1 diabetes mellitus and their possible association with miR-146a and miR-155.
Lissette Duarte S., Georhan Mancilla A., Diego F. García-Díaz, Néstor Soto I. and Francisco Pérez B. 62

Clinical Case

Severe hyponatremia in a patient with anorexia nervosa.
Case report and review of literature.
Patricio Salman M. y Andrea Sáez E. 69

Ethics, Humanism and Society

Integrative or nothing.
José Carlos Bermejo 72

Comments Outstanding Literature

Álvaro Pérez Bazán y Gabriel Cavada Ch. 74

Calendar of courses, Symposia and Meetings

76

Instructions to Authors

77

Décimo aniversario de la Revista Chilena de Endocrinología y Diabetes

10th anniversary of the Chilean Journal of Endocrinology and Diabetes

Permítanme leerles esta “Parra-fada”, que he escrito con permiso de don Nicanor, quien dijo “voy y vuelvo” y aún no regresa; ella versa sobre una niña imaginaria, que con otro nombre sí vive entre nosotros.

Me ha invitado la Dra. Carmen Gloria Aylwin a co-celebrar el décimo cumpleaños de esa niña venturosa y por todos querida. Sus nombres son varios y latos, como las reinas de verdad: Revista Chilena de Endocrinología y Diabetes.

Su madre, SOCHED, gran matrona y hoy sesentona, la alumbró en plena madurez a los cincuenta. Fue su padre el Dr. Hernán García Bruce, y el que habla, ofició de obstetra de inicio y pediatra después. Desde su primer abrir de hojas captó mimosa el interés de tantos por mirarla, escudriñarla y repasarla. Cada 3 meses cambia de tenida, pero es fiel en vestirse, almidonada y compuesta, de raso blanco con vivos de tul azul celeste, colores que eligieron los que la esperaban ver nacer; en un recodo de su traje lleva atenta cuenta de sus meses y años en este mundo.

¿Cómo vino al mundo esta pequeña? La idea primigenia anidaba en el poso del pozo de los quereres del Dr. García. Fue bien concebida, bien gestada y luego bien parida y, más tarde, mejor nutrida. Su desarrollo intrauterino duró 8 meses, para nacer con el mes de enero del año 2008. Desde el día uno recibió el cariño de su madre SOCHED y la atención dedicada de este su neonatólogo. Cada año, cuando la madre por tradición congrega a su familia en pleno, hubo control de niño sano, y también atento examen de sus miembros y sistemas. De ellos el grueso lo constituye la sección de artículos originales de investigación y los casos clínicos. Los primeros para los que ya han recorrido camino y los segundos para los que, empezando, quieren recorrerlo.

Desde su inicio esta grácil muchachita cultivó también otros nortes: uno por cada dedo de su manecita, que aunque menuda capaz de contener mucho. Permítanme solo señalar lo que con títulos de adulto trasuntaban sus otros intereses:

1. Historias de vidas de médicos señeros fallecidos, de Chile y allende los Andes, que sembraron el saber del ayer para que hoy otros se nutran de aquello que aunque inicial es aún permanente. La niña muy bien sabe que los muertos con sus escritos abren los ojos de los vivos.
2. Mimos para el alma que mi amigo José Carlos Bermejo le manda regularmente desde España para hacerla más humana.
3. Autoevaluación para el lector que en silencio reconocerá el respaldo o el aviso de ser mejor.
4. Cartas a los enfermos explicándoles en simple verdadero lo que en complejo puede no ser tan cierto para ellos.
5. Noticias de su madre SOCHED.

Cuatro años fui su pediatra y doy fe que la quise y la quiero. Hoy su nuevo pediatra el Dr. Francisco Pérez está enseñándole a comportarse en sociedad, porque quiere que otros, de latitudes lejanas la visiten. ¡Enhorabuena!

Por quien madre y familia tiene no hay que llorar sino celebrar de veras, como ahora lo estamos haciendo. ¡Viva nuestra revista! ¡Y que viva por muchos años!

Dr. José Manuel López Moreno
Editor (2008-2011)

Efecto de la activación del Receptor Sensor de Calcio sobre la expresión de genes lipogénicos en células HepG2

Pía Villarroel^{1,2,3,a} y Mariana Cifuentes^{3,b}

Effect of Calcium Sensing Receptor activation on lipogenic gene expression in HepG2 cells

Introduction: The Calcium Sensing Receptor (CaSR) is expressed in human fat cells, and its stimulation may be associated with adipose tissue dysfunction. The multisystemic character of obesity and the search of deepening the scope of the activation of CaSR in this disorder allows us to study the response of this protein in tissues that differ from adipose. **Objective:** To evaluate the effect of CaSR activation on the expression of lipogenic genes in a model of excess glucose and fatty acids in HepG2 human liver cells. **Materials and methods:** The effect of the calcimimetic cinacalcet (allosteric agonist of CaSR) on the content of triglycerides (fluorimetry) in a model of glucose supply and on the expression of lipogenic genes (qPCR) in hyperglycemia and hyperlipidemia conditions in the Liver cell line HepG2. **Results:** Cinacalcet, glucose (25 mM) and oleic acid (0.6 mM) did not affect cell viability. Activation of CaSR in the presence of glucose failed to increase the intracellular triglyceride content at 72 hours. Under these conditions, no response was observed for the factors coding for lipogenic genes (SREBP1c and FAS) at 24 hours of stimulation with cinacalcet in the liver cells. In the case of the over supply of fatty acids, the HepG2 cells did not show a variation in the gene expression of the DGAT enzymes after exposure to cinacalcet. **Conclusion:** Under conditions of glucose exposure, cinacalcet did not show a response in the triglyceride content, nor in the expression of genes related to hepatic lipogenesis. Therefore, stimulation of CaSR would not be associated with hepatic steatosis in HepG2 cells exposed to glucose.

Key words: Receptor, calcium, lipogenesis, HepG2.

¹Escuela de Nutrición y Dietética, Facultad de Ciencias, Universidad Mayor, Santiago, Chile.

²Escuela de Nutrición y Dietética, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad San Sebastián, Santiago, Chile.

³Laboratorio de Nutrición Básica y Epidemiología Genética. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile.

^aNutricionista. PhD en Nutrición y Alimentos.

^bQuímico Farmacéutico, PhD en Ciencias de la Nutrición. Profesor Titular Universidad de Chile.

Apoyo financiero: Proyecto Sociedad Chilena de Endocrinología y Diabetes (SOCHED) 2013-04.

Declaración de intereses: Los autores no declaran conflicto de interés alguno.

Correspondencia:

Pía Villarroel Heise

Escuela de Nutrición y Dietética, Facultad de Ciencias, Universidad Mayor, Campus Huechuraba. Camino la Pirámide 5750, Santiago, Chile.

Teléfono: 23281346

pia.villarroel@mayor.cl - pia.villarroel@inta.uchile.cl

Recibido: 16-05-2017

Aceptado: 19-10-2017

Introducción

En la obesidad, una desregulación en los procesos metabólicos puede resultar en el depósito de grasa ectópica, que se relaciona con la lipogénesis y la esteatosis hepática¹. La esteatosis hepática cursa con una alteración en el almacenamiento de triglicéridos en una patología denominada como enfermedad de hígado graso no alcohólica, señalada como uno de los factores claves asociados con insuficiencia metabólica relacionada a la obesidad².

Se ha descrito la presencia y funcionalidad del Receptor Sensor de Calcio (CaSR) en una variedad de tejidos que difieren de su principal y, originalmente, descrito papel en la homeostasis del calcio³. Nuestro laboratorio ha estudiado la participación del CaSR en las alteraciones en el tejido adiposo que se asocian a las comorbilidades de la obesidad⁴⁻⁷. En el año 2001, Canaff y cols. identificaron por primera vez la expresión del CaSR en el tejido hepático y hepatocitos de cultivo primario de ratas⁸ y, recientemente, nuestro laboratorio ha descrito la expresión del CaSR en células hepáticas humanas⁷. Para complementar

Artículo Original

lo observado en el tejido adiposo, y por su relevancia a nivel sistémico, se estudió la participación del CaSR en la desregulación de la funcionalidad del tejido hepático, sugiriendo que el almacenamiento de triglicéridos en el hígado puede verse alterado ante la activación de esta proteína⁷. Desde este hallazgo ha surgido la necesidad de estudiar diversos aspectos de la funcionalidad hepática que, potencialmente, estén mediados por la activación del CaSR.

En el contexto del carácter multisistémico de la obesidad y en la búsqueda de profundizar en los alcances de la activación del CaSR en este desorden, este trabajo evaluó si la exposición al calcimimético cinacalcet (agonista alostérico del CaSR) modula la acumulación de triglicéridos en células HepG2 en un modelo de sobreoferta de glucosa, a fin de proponer mecanismos adicionales del CaSR como un factor involucrado en las comorbilidades asociadas a la obesidad.

Materiales y Métodos

Línea celular HepG2

Se utilizó la línea celular HepG2 (American Type Culture Collection, ATCC), derivada de un carcinoma hepatocelular humano y validada como modelo de hepatocitos humanos⁹. Las células fueron mantenidas en un medio mínimo esencial (MEM), con 10% de suero fetal bovino (SFB) suplementado con antibióticos (1% penicilina/estreptomina), en una atmósfera controlada (37 °C; 5% CO₂).

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

El ARN total se obtuvo luego de lisar las células utilizando Trizol® (Invitrogen, Life Technologies INC., Carlsbad, CA, USA). El ARN fue extraído utilizando el Mini Kit PureLink™ RNA (Invitrogen), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La transcripción reversa se realizó usando high Capacity cDNA Reverse Transcrip-

tion kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). La expresión de ARNm se evaluó en Step One Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.), utilizando SYBR® FAST qPCR Kit (Applied Biosystems). Se utilizaron partidores previamente validados en nuestro laboratorio (Tabla 1). Las condiciones de los ciclos térmicos consistieron en una preincubación de 20 seg a 95 °C seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 3 segundos y 60 °C durante 30 seg. Los resultados se normalizaron de acuerdo a la expresión del gen de referencia GAPDH y la expresión se calculó usando el modelo Pfaffl¹⁰. Todos los ensayos se realizaron en duplicado.

RT-PCR y electroforesis en gel de agarosa

Luego de extraer el ARN y sintetizar el cDNA, las amplificaciones se realizaron utilizando la enzima GoTaq Master Mix (Promega, Madison, WI, EE. UU.) en el termociclador Biometra® Personal Cycler (Göttingen, Alemania). Las condiciones de los ciclos térmicos consistieron en una preincubación de 2 min a 95 °C seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos. Para terminar con una extensión final a 72 °C durante 5 min. Como marcador de peso molecular se utilizó DNA Ladder 50 pb (Fermentas, EE. UU.). Se realizó electroforesis en geles de agarosa (1,5% en buffer TBE 1X) entre 40-60 min a 80V, y los amplificados fueron observados bajo luz UV.

Cuantificación del contenido de triglicéridos

Las células fueron tratadas con 0,25% de solución de tripsina e incubadas a 37 °C por 10 min. Posteriormente, fueron lavadas con PBS e incubadas con Nile Red (1µl/ml) disuelto en PBS por 5-7 min a temperatura ambiente. La fluorescencia fue evaluada utilizando filtros 485 nm de excitación y 572 nm de emisión (fluorímetro Synergy 2 (Biotek®)). Los resultados fueron normalizados por el contenido de proteína medida mediante el método basado en el ácido bicinonínico (Pierce).

Tabla 1. Secuencia de partidores para PCR en tiempo real

Target mRNA	Acceso	Partidor Forward (5' → 3')	Partidor Reverse (5' → 3')
CaSR	NM_001178065	GATGAGACAGATGCCAGTGC	AAAGAGGGTGAGTGCGATCC
FAS	NM_004104.4	GGAAGCTGCCAGAGTCGGAGAACT	TGAGGGTCCATCGTGTGTGCC
SREBP1c	NM_001005291.2	ACACAGCAACCAGAACTCAAG	AGTGTCTCTCCACCTCAGTCT
DGAT1	NM_012079.5	GAGTACTCCCGACAATCTGA	AGCTGGGTGAAGAACAGCAT
DGAT2	NM_032564.3	GGCAGGCAACTTCCGAATGCCT	AAAGCCCTTGCGGTTCCGCA
GAPDH*	NM_002046	GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC	CAGAGTTAAAGCAGCCCTGGT

*Gen control (Housekeeping).

Evaluación de la viabilidad celular

Se evaluó viabilidad celular por colorimetría a través del ensayo CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega, WI, USA) de acuerdo a las condiciones descritas por el fabricante en un espectrofotómetro de escaneo multipocillo ELx808 microplate reader (BioTek Instruments, Inc. VT, USA). Las células HepG2 fueron sembradas a una densidad de 3×10^3 células/cm². Después de 24 h de incubación se realizó un cambio de medio y se inició el tratamiento con los distintos agentes por 72 h. Posteriormente, cada pozo fue tratado con 20 μ l del reactivo 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) y se incubó por 3 h a 37 °C. El colorante de formazán, producido por las células metabólicamente activas, se cuantificó a través de la medición de absorbancia a una longitud de onda de 490 (restándole la lectura a 630 nm para descartar el *background* de acuerdo con las recomendaciones del fabricante).

Resultados

Evaluación del efecto de la activación del CaSR sobre el contenido de triglicéridos en la línea celular HepG2 en un modelo de sobreoferta de glucosa

Cuando la capacidad del tejido adiposo de almacenar grasa se ve sobrepasada por un exceso de oferta de nutrientes, puede producirse un depósito de lípidos en el hígado. Este hecho da lugar a una alteración deletérea del metabolismo en este órgano, con consecuencias clínicas importantes. Utilizando un modelo de sobreoferta de nutrientes para observar el manejo de triglicéridos en células HepG2, expusimos las células a concentraciones consideradas altas (25 mM) de glucosa¹¹ o (0,6 mM) ácido oleico¹². Para descartar muerte celular dado el riesgo de toxicidad ante estas altas concentraciones, se determinó la viabilidad de estas células frente a los estímulos (Figura 1).

Una vez establecido que los tratamientos usados en las concentraciones indicadas no afectan la viabilidad celular, se evaluó el efecto de cinacalcet, glucosa y ácido oleico sobre la acumulación de triglicéridos (Figura 2).

La Figura 2 muestra que el tratamiento con ácido oleico aumenta significativamente el contenido de triglicéridos comparado con el cultivo control, mientras que la concentración de lípidos intracelulares no respondió frente al tratamiento con glucosa (con o sin insulina). Posteriormente, se estimuló las células con cinacalcet para evaluar el efecto de la activación del CaSR en las condiciones de sobreoferta glicémica (Figura 3).

La Figura 3 muestra que la activación del CaSR no afecta el contenido de triglicéridos en presencia de glu-

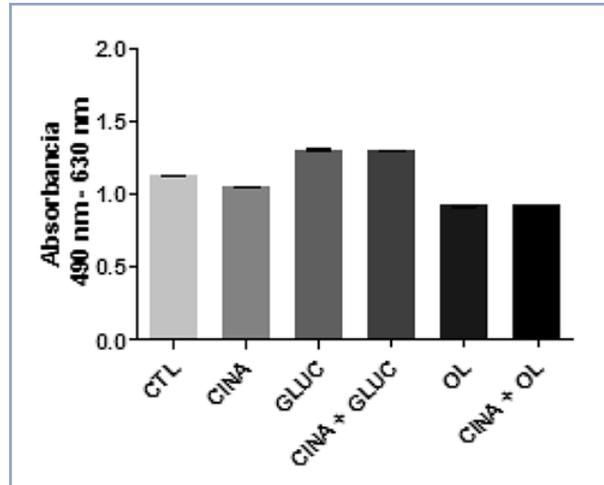


Figura 1. Viabilidad de células HepG2. Células tratadas por 72 h con estímulos de cinacalcet 1 μ M y glucosa 25 mM y ácido oleico 0,6 mM. La viabilidad celular fue medida por el ensayo MTS. Las barras representan media \pm SEM de la absorbancia a 490 nm (menos 630 nm). No se encontraron diferencias vs el control (Test de Wilcoxon $p > 0,05$). La Figura representa 3 experimentos independientes, cada uno en triplicado.

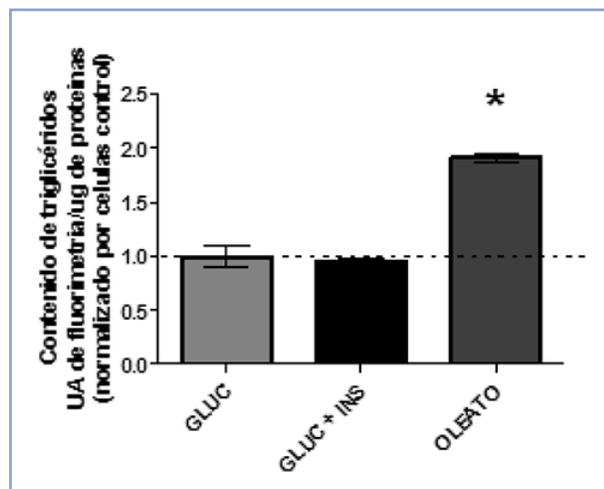


Figura 2. Células HepG2 expuestas por 72 h a glucosa 25 mM, ácido oleico 0,6 mM. El contenido de triglicéridos fue evaluado por fluorimetría usando Nile Red. Las barras representan media \pm SEM. Los tratamientos están comparados vs el cultivo control (valor 1, representado por la línea). * $p < 0,05$, prueba de Wilcoxon ($n = 8$).

cosa. No obstante, en presencia de ácido oleico la estimulación del CaSR por 72 h aumenta significativamente la concentración de lípidos intracelulares⁷. Esperando explicar estas diferencias se evaluó el efecto de la estimulación del CaSR sobre la respuesta génica de factores li-

Artículo Original

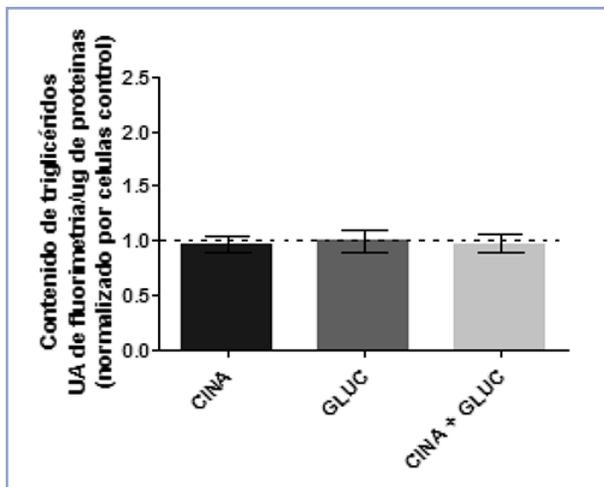


Figura 3. Células HepG2 expuestas por 72 h a glucosa 25 mM y glucosa + Cinacalcet 1µM. El contenido de triglicéridos fue evaluado por fluorimetría usando Nile Red. Las barras representan media ± SEM. Los tratamientos están comparados vs el cultivo control (valor 1, representado por la línea) (n = 8).

pogénicos como DGAT1/2 (asociados a la sobreoferta de lípidos) y de SREBP1c y FAS (asociados a la sobreoferta de glucosa) en los modelos antes mencionados. Los genes propuestos son de particular interés por representar distintas etapas de la lipogénesis hepática, hecho que podría ser vinculado a los efectos sistémicos de la inflamación y disfunción adiposa asociadas a la obesidad.

Efecto de la activación del CaSR sobre la expresión génica de factores lipogénicos en células HepG2

Previamente, se reportó un aumento en el contenido de triglicéridos para células HepG2 expuestas a ácido oleico⁷, por lo tanto, es interesante estudiar la respuesta de los genes lipogénicos DGAT1/2 en estas condiciones, dado que ellos participan en etapa final de la síntesis de triglicéridos (Figura 4).

Para aquellas células expuestas a ácido oleico, observamos en la Figura 4 que este estímulo no afecta la expresión del ARNm de DGAT1/2. No se observó un efecto de cinacalcet sobre la respuesta génica de DGAT1/2.

Por otro lado, se estudió la respuesta de SREBP1c y FAS en un contexto de hiperglicemia. Estos factores participan en la lipogénesis de novo, respaldando el uso del exceso crónico de glucosa como sustrato para la síntesis de triglicéridos (Figura 5).

Como muestra la Figura 5, la exposición de células HepG2 a glucosa y/o cinacalcet no muestra una respuesta de SREBP1c. En esta última condición es interesante destacar que FAS disminuye significativamente su expresión

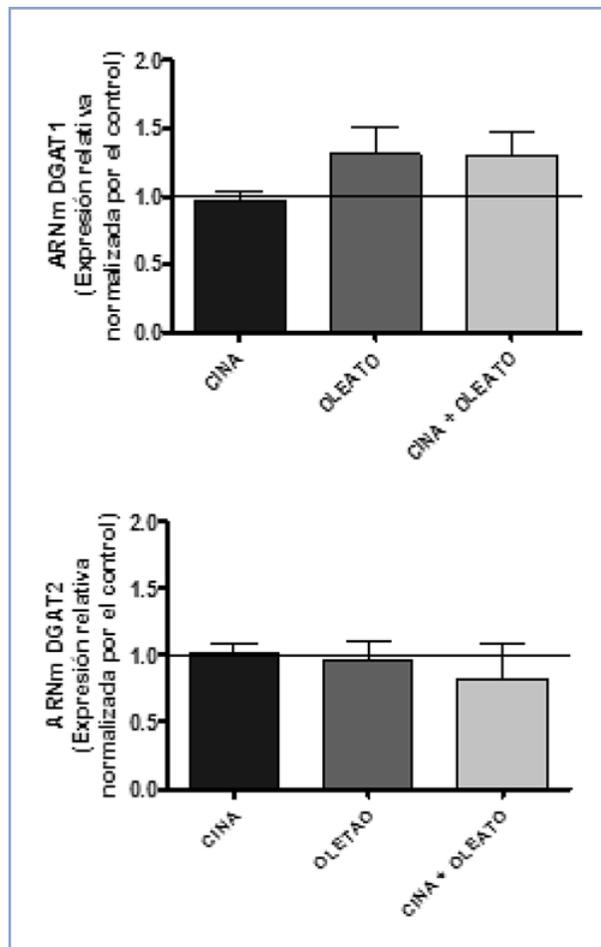


Figura 4. Expresión génica de DGAT1 y DGAT2. Células HepG2 expuestas por 24 h a cinacalcet 1 µM, ácido oleico 0,6 mM y el efecto combinado de ambos tratamientos. Se utilizó la expresión de GAPDH como control interno. Las barras representan media ± SEM. Test de Wilcoxon (*) p < 0,2. La expresión del ARNm de todos los genes está comparada vs el cultivo control tratado con vehículo, representado por el valor 1 (línea horizontal) (n = 10).

cuando las células hepáticas se exponen a glucosa comparadas con el cultivo control. No se observó una respuesta en la expresión de SREBP1c o FAS ante la estimulación del CaSR.

Discusión

Los resultados obtenidos permiten proponer un modelo en el que, identificado el CaSR en células hepáticas humanas y en consistencia con lo reportado previamente⁷, la proteína CaSR no participaría en el desarrollo de la es-

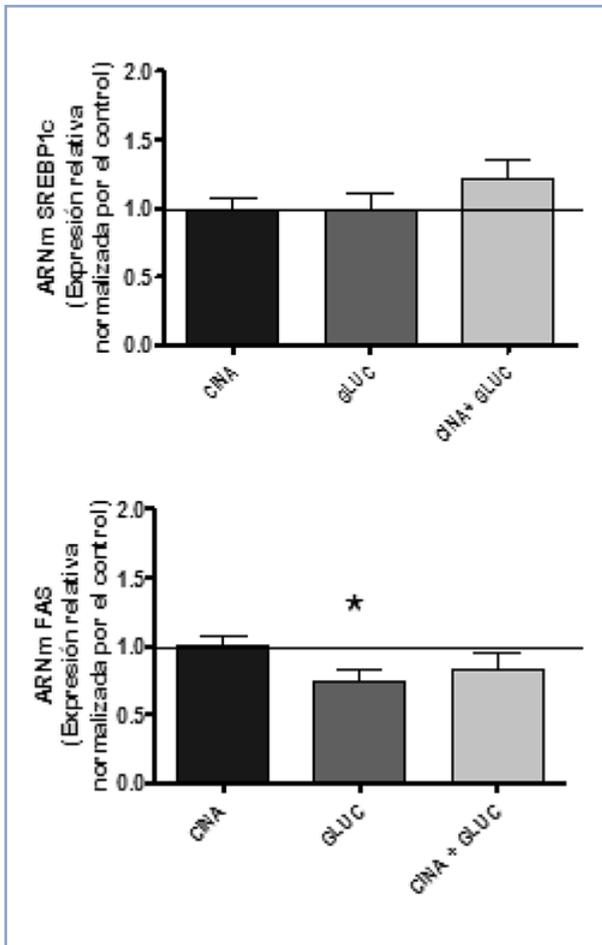


Figura 5. Expresión génica de SREBP-1 y FAS. Células HepG2 expuestas por 24 h a cinacalcet 1 μ M, glucosa 25 Mm y el efecto combinado de ambos tratamientos. Se utilizó la expresión de GAPDH como control interno. Las barras representan media \pm SEM. Test de Wilcoxon * p < 0,05, (*) p < 0,2. La expresión del ARNm de todos los genes está comparada vs el cultivo control tratado con vehículo (n = 10).

teatosis hepática en condiciones de sobreoferta de glucosa. Además, hemos podido establecer que, al comparar la expresión génica de factores lipogénicos, entre el modelo de sobreoferta de glucosa y de sobreoferta de lípidos, la estimulación del CaSR no influye en la respuesta de los genes propuestos. Por tanto, sugerimos que el estímulo del CaSR, en un contexto hiperglicémico, no contribuiría (de acuerdo al mecanismo estudiado) al desarrollo de comorbilidades asociadas a la obesidad.

Nuestras observaciones están exponiendo algunas manifestaciones de la célula hepática en respuesta a la activación del CaSR en dos contextos fisiopatológicos di-

ferentes (sobreoferta de lípidos y sobreoferta de glucosa). La relación existente entre la sobreoferta crónica de glucosa (hiperglicemia) y el consecuente aumento de la lipogénesis de novo¹³, nos habría permitido interpretar este modelo como una manifestación de disfuncionalidad hepática. Al observar la presencia de lípidos intracelulares en células hepáticas humanas HepG2, evidenciamos que la activación del CaSR no aumenta el contenido de triglicéridos en presencia de glucosa, respuesta significativamente incrementada en células expuestas a ácido oleico⁷.

Entre las principales funciones metabólicas del hígado se encuentran la síntesis, almacenamiento, secreción y catabolismo de ácidos grasos y triglicéridos, que pueden ser evaluados, entre otras, a través de la expresión de enzimas y factores de transcripción relevantes en las distintas vías, tales como la proteína 1 ligante al elemento regulador de esteroides (SREBP-1c), la sintasa de los ácidos grasos (FAS) y las diacilglicerido aciltransferasas 1 y 2 (DGAT1/2). En el caso de la sobreoferta de ácidos grasos se estudiaron 2 enzimas (DGAT1 y DGAT2), que a pesar de catalizar la misma reacción (síntesis de triglicéridos a partir de la acil-CoA y diacilglicerol)¹⁴, se sugiere que DGAT2 posee mayor afinidad por ciertos sustratos que DGAT1¹⁵. Se ha establecido que DGAT1 juega un papel más importante en la esterificación de ácidos grasos exógenos, mientras que DGAT2 es principalmente responsable de la incorporación de ácidos grasos de síntesis endógena a los triglicéridos¹⁶. A pesar de la falta de respuesta sobre la expresión de DGATs por efecto de cinacalcet, estudios anteriores⁷ han podido establecer un posible mecanismo mediado por la inflamación para sugerir la etiopatogénesis de la esteatosis hepática frente a una sobre carga lipídica.

Sobre la base de que la hiperglicemia incrementaría una respuesta de genes asociados a la lipogénesis de novo (SREBP-1c y FAS)¹³, y que la estimulación del CaSR podría asociarse a este fenotipo negativo en el hígado⁷, podríamos especular que las condiciones experimentales utilizadas deberían respaldar un aumento en la expresión de los genes estudiados. No obstante, cinacalcet no muestra el efecto esperado, la activación del CaSR no aumenta SREBP1c y/o FAS en células hepáticas en presencia de glucosa. SREBP-1c es un factor de transcripción que puede ser estimulado por glucosa¹⁷, el gen más importante en la regulación de la lipogénesis de novo en el hígado y responsable de la activación de genes implicados en la biosíntesis de ácidos grasos, incluyendo FAS¹⁸. Adicionalmente, la glucosa también es capaz de estimular otro factor de transcripción como ChREBP (proteína ligadora de elementos de respuesta a carbohidratos), que induce no solo enzimas glucogénicas, sino que también enzimas lipogénicas como FAS¹⁹. Por esto, la sintasa de ácidos grasos debiera haber respondido al estímulo de glucosa

Artículo Original

en las células hepáticas de manera dependiente o independiente a SREBP1c. Sin embargo, se debe tener presente la compleja respuesta fisiológica asociada a eventos de hiperglicemia, con lo que tampoco se puede descartar que al evaluar una otra ventana de tiempo pudiera evidenciarse una respuesta diferente de los genes estudiados. Asimismo, la falta de respuesta observada puede fundar la existencia de otros mecanismos generados por la hiperglicemia (como resistencia a la insulina) que estén bloqueando el desarrollo de lipogénesis hepática.

En el hígado, la sobreoferta lipídica se relaciona con un aumento en el contenido de triglicéridos hepáticos⁷, mientras que la sobreoferta de glucosa no mostró esta tendencia. Esto podría sugerir que la hiperlipidemia exacerbaría el fenotipo negativo de la obesidad en mayor magnitud que la hiperglicemia. En otras palabras, si el CaSR participa como mediador en la generación de estasis hepática, podríamos discutir o pensar que un sujeto dislipidémico debería verse más propenso/dañado a una esteatosis hepática que un sujeto diabético.

Nuestros resultados apoyan la relevancia del estudio de una conversación cruzada adiposo-hepático, pues el tejido adiposo provee de ácidos grasos que el hígado capta¹³. Estudios anteriores de nuestro laboratorio han podido mostrar que la estimulación del CaSR en el tejido adiposo sería responsable de una menor lipogénesis⁵, involucrando posiblemente una mayor cantidad de ácidos grasos circulantes, susceptibles de ser captados por el hígado. Cuando se estimula el CaSR en células hepáticas expuestas a ácido oleico, se promueve un mayor depósito de triglicéridos en este tejido⁷, permitiendo postular al CaSR como mediador entre la disminución de la lipogénesis adiposa y el aumento de la lipogénesis hepática. En este contexto patológico podemos especular un probable efecto deletéreo del CaSR sobre el hígado asociado a una exposición a ácidos grasos que no fue posible observar en condiciones de exposición a glucosa.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo de la Sociedad Chilena de Endocrinología y Diabetes (SOCHED) proyecto 2013-04 y del Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT) 1150651

Referencias bibliográficas

- Ginsberg H, Zhang Y, Hernández-Ono A. 2006. Metabolic syndrome: Focus on dyslipidemia. *Obesity* 14: 41-9.
- Diraison F, Dusserre E, Vidal H, Sothier M, Beylot M. 2002. Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E46eE51.
- Brown E, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O. et al. 1993. Cloning and characterisation of an extracellular Ca²⁺-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 366: 575-580.
- Cifuentes M, Fuentes C, Tobar N, Acevedo I, Villalobos E, Hugo E, et al. 2012. Calcium sensing receptor activation elevates proinflammatory factor expression in human adipose cells and adipose tissue. *Molecular and cellular endocrinology* 361: 24-30.
- Villarroel P, Reyes M, Fuentes C, Segovia M, Tobar N, Villalobos E, et al. 2013. Adipogenic effect of calcium sensing receptor activation. *Molecular and cellular biochemistry* 384: 139-145.
- Rocha G, Villalobos E, Fuentes C, Villarroel P, Reyes M, Díaz X, et al. 2015. Preadipocyte proliferation is elevated by calcium sensing receptor activation. *Molecular and cellular endocrinology* 412: 251-256.
- Villarroel P, Mattar P, D'Espessailles A, Arrese M, Arreguin A, Fuentes C, et al. 2016. Calcium sensing receptor effects in adipocytes and liver cells: Implications for an adipose-hepatic crosstalk. *Arch Biochem Biophys* 607: 47-54.
- Canaff L, Petit J, Kisiel M, Watson P, Gascon-Barré M, Hendy G. 2001. Extracellular calcium-sensing receptor is expressed in rat hepatocytes coupling to intracellular calcium mobilization and stimulation of bile flow. *Biol Chem* 276: 4070-9.
- Bokhari M, Carnachan R, Cameron N, Przyborski S. 2007. Culture of HepG2 liver cells on three dimensional polystyrene scaffolds enhances cell structure and function during toxicological challenge. *J Anat* 211: 567-76.
- Pfaffl M. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.
- Khodabukus A, Baar K. 2015. Glucose concentration and streptomycin alter in vitro muscle function and metabolism. *J Cell Physiol* 230: 1226-34.
- Kwan H, Fong W, Yang Z, Yu Z, Hsiao W. 2013. Inhibition of DNA-dependent protein kinase reduced palmitate and oleate-induced lipid accumulation in HepG2 cells. *Eur J Nutr* 52: 1621-30.
- Geisler C, Renquist B. 2017. Hepatic lipid accumulation: cause and consequence of dysregulated glucoregulatory hormones. *J Endocrinol*. pii: JOE-16-0513. doi: 10.1530/JOE-16-0513 [Epub ahead of print].
- Liu Y, Millar J, Cromley D, Graham M, Crooke R, Billheimer J, et al. 2008. Knockdown of acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase 2 with antisense oligonucleotide reduces VLDL TG and ApoB secretion in mice. *Biochim Biophys Acta* 1781: 97-104.
- Yen C, Stone S, Koliwad S, Harris C, Farese RV Jr. 2008. Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J Lipid Res* 49: 2283-301.

16. Qi J, Lang W, Geisler J, Wang P, Petrounia I, Mai S, et al. 2012. The use of stable isotope-labeled glycerol and oleic acid to differentiate the hepatic functions of DGAT1 and -2. *J Lipid Res* 53: 1106-16.
17. Weickert, Pfeiffer. 2006. Signalling mechanisms linking hepatic glucose and lipid metabolism. *Diabetologia* 49: 1732-41.
18. Palou M, Priego T, Sánchez J, Villegas E, Rodríguez A, Palou A, et al. 2008. Sequential changes in the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue and liver in response to fasting. *Pflugers Arch* 456: 825-36.
19. Iizuka K, Bruick R, Liang G, Horton J, Uyeda K. 2004. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 7281-6.

Artículo Original

Estudio e identificación de microRNA en exosomas urinarios en hipertensión arterial mineralocorticoide

Alejandra Tapia-Castillo^{1,3}, Carolina Valdivia P.¹, Carmen Campino J.^{1,4}, Fidel Allende², Sandra Solari², David Ortiz¹, Eric Barros¹, Andrea Vecchiola^{1,4}, Rene Baudrand¹, Carlos Fardella^{1,4} y Cristian Carvajal M.^{1,4}

Study and identification of microRNA in urinary exosomes in mineralocorticoid arterial hypertension

¹Departamento de Endocrinología, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

²Departamento de Laboratorios Clínicos, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

³Centro Genética y Genómica, Facultad de Medicina, Universidad del Desarrollo.

⁴Instituto Milenio de Inmunología e Inmunoterapia (IMI).

Fuentes de financiamiento: Este trabajo fue apoyado por SOCHED 2015-10, CONICYT-FONDECYT 1150437, 1160695, 1160836, CONICYT-FONDEQUIP EQM150023, IMII P09/16-F, CETREN-UC.

Declaración: Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Correspondencia:

Cristian A. Carvajal, PhD.

Departamento de Endocrinología, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Diagonal Paraguay 362, 4° piso, Santiago Centro 8330077, Santiago, Chile.

Teléfono: (56-2) 2354-3639

Fax: (56-2) 2638-5675

ccarvaja@med.puc.cl

Recibido: 04-01-2018

Aceptado: 27-01-2018

About 15% of the essential hypertensive patients would have a low activity of the 11β HSD2 enzyme, which inactivates cortisol (F) to cortisone (E). Gene expression can be negatively regulated by miRNA. Urinary exosomes and their specific content (miRNA/proteins) represent a valuable tool as a biomarker for the diagnosis and prognosis of the disease. **Aim:** To evaluate the expression of miRNA specific for 11β HSD2 in samples of urinary exosomes and to determine its association with biochemical variables associated with mineralocorticoid metabolism. **Subjects and Methods:** Cross-sectional study in subjects between 10-60 years. They were classified into subjects with high F/E ($> p75$) and low cortisone ($< p25$) and control subjects. The urinary exosomes were isolated with the Invitrogen kit. Bioinformatic analysis was performed with MirWalk to identify specific miRNAs of HSD11B2. The expression of miRNA was evaluated by qRT-PCR. The comparisons were made with the Mann-Whitney test. **Results:** 7.1% of the subjects are suggestive of a partial deficiency of 11β HSD2 (NC-AME). The expression of miR-488 was higher in NC-AME than in controls (5839 ± 1719 vs $3,437 \pm 2,581$; $p = 0.01$). We found positive associations between mir-615 and ARP; miR-488 and the sodium/potassium ratio; miR-1205 with age and urinary sodium excretion; miR-494 with age, activity MMP9 and NGAL. **Conclusion:** We identified high expression of miR-488 in NC-AME subjects and associations of miRNAs with biochemical variables associated with mineralocorticoid metabolism. Thus, exosomes and their miRNA content could be potential regulators and biomarkers of 11β HSD2 activity.

Key words: Hypertension, 11β HSD2, mineralocorticoid receptor, microRNA, exosomes.

Introducción

La hipertensión arterial es una enfermedad de alta prevalencia en Chile, alcanzando al 27% de la población (ENS 2017) y se considera una de las primeras causas de muerte a nivel mundial, por accidente cerebrovascular y enfermedad cardíaca¹.

Estudios previos muestran que alrededor de un 15% de los hipertensos esenciales tendrían una inadecuada metabolización de cortisol (F) a su metabolito inactivo cortisona (E), lo cual podría activar la vía mineralocorticoide a nivel renal y vascular². Se ha planteado que este

fenómeno puede tener su origen etiológico en un déficit de la enzima 11β -hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 2 (11β HSD2). Cuando está enzima esta inactiva en forma parcial o total, ya sea por una alteración genética de HSD11B2 (NG_016549; OMIM 614232; ENSG00000176387)³ o ingesta de inhibidores exógenos (Ej. licorice y carbenoxolona)⁴, o endógenos (GALFs, factores tipo ácido B-glicirriténico), el cortisol que circula en concentraciones 1.000 veces más altas que la aldosterona, puede activar al receptor de mineralocorticoide (MR) y producir los mismos efectos que la aldosterona⁵.

Nuestro grupo previamente ha demostrado que la en-

fermedad hipertensiva asociada al déficit 11 β HSD2 podría ser más frecuente de lo esperado, sugiriendo que una alta frecuencia de estos trastornos no están siendo diagnosticados. A nivel poblacional la frecuencia de mutaciones en las regiones codificantes del gen de HSD11B2 son extremadamente baja. Así, otros mecanismos deberían ser capaces de explicar la regulación de la expresión de la enzima 11 β HSD2, entre ellos, las modificaciones epigenéticas serían potenciales reguladores de la actividad de la 11 β HSD2 mediante el control transcripcional y traduccional del gen HSD11B2^{6,7}.

La metilación, modificación de las histonas y los RNA no codificantes son los principales mecanismos de modificaciones epigenéticas, y son elementos claves en la regulación post-transcripcional de la expresión génica. En los últimos años, se ha prestado cada vez más atención al papel de los miRNAs circulantes en la enfermedad hipertensiva. Los miRNAs circulantes podrían desempeñar un papel importante como biomarcadores y comunicadores intercelulares en la predicción, diagnóstico y tratamiento personalizado de pacientes hipertensos^{8,9}. Sin embargo, la regulación epigenética por miRNA de la 11 β HSD2 aún no ha sido bien elucidado. Solo dos estudios en animales han evaluado la relación entre la expresión de miRNA y 11 β HSD2 *in vivo*, los cuales aportan las primeras evidencias de la asociación entre miRNA, 11 β HSD2 y presión arterial¹⁰. Por otro lado, el contenido tejido-específico de tales modificaciones epigenéticas es un desafío actualmente. En este contexto, los exosomas, pequeñas vesículas de membrana, liberadas desde diferentes tipos celulares para comunicación celular, reflejan el estado fisiológico de las células de origen y su contenido específico de RNA, miRNA y proteínas; pueden ser una valiosa herramienta biomédica para identificar potenciales mecanismos fisiopatológicos implicados en la génesis y desarrollo de hipertensión arterial mineralocorticoide¹¹. Así, resulta relevante determinar un perfil de expresión de miRNA que afecten la expresión de la enzima 11 β HSD2, en exosomas de fluidos como la orina y que den cuenta del metabolismo local y de la condición fisiopatología del tejido renal.

Materiales y Métodos

Sujetos

Se estudió una cohorte de 127 sujetos chilenos, de ambos sexos, entre 10 y 60 años, reclutados para un estudio previo. Todos los pacientes hipertensos que ingresaron al estudio cumplían los siguientes criterios: Ser hipertensos con valores de presión arterial > 140/90 mmHg (JNC-VI) o mayor al p95 de HTA sistó-diastólica en niños (Task Force 4). Ausencia de antecedentes de patología crónicas como insuficiencia renal, insuficiencia cardíaca, diabetes mellitus, daño hepático crónico o endocrinopatías. Los sujetos

que habían recibido glucocorticoides (cortisol, prednisona, entre otros) o mineralocorticoides (fludrocortisona) en los 2 meses previos al inicio del estudio, fueron excluidos. Dado que la mayoría de los pacientes hipertensos podrían haber estado recibiendo algún antihipertensivo al momento del estudio, se les exigió un período libre de fármacos de 15 días (como habitualmente se realiza en clínica) bajo estricta supervisión médica. En los sujetos que presentaban enfermedad hipertensiva severa (estado 3 de la clasificación de JNVC) no se realizó dicha suspensión o se usaron bloqueadores alfa-adrenérgico (doxasosina, ej: Cardura XL) que no interfieren en la medición de la actividad renina plasmática (ARP).

El protocolo seguido en este estudio se escribió de acuerdo con las directrices de la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité Ético de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile. El estudio y el protocolo se explicaron a todos los participantes y se obtuvo el consentimiento informado por escrito y asentimiento en el caso de los niños.

Análisis bioquímicos

Todos los pacientes seleccionados tienen una ficha clínica donde se consignaron los datos más relevantes de la historia clínica y del examen físico, así como los exámenes generales que se realizan habitualmente en el programa de hipertensión y que son perfil bioquímico, hemograma VHS, creatinemia, creatinuria, electrolitos plasmáticos, aldosterona, actividad de renina plasmática. En todos los sujetos se realizó la determinación de los niveles de cortisol (F) y cortisona (E), mediante HPLC-MS/MS. Además, de estos sujetos se disponen muestras de sangre y orina 24 h y matinal para determinar diferentes analitos incluidos en el estudio.

Aislamiento de exosomas

Desde las muestras de orina matinal de todos los participantes, se aislaron exosomas urinarios con el kit de Invitrogen (Total exosome isolation kit, cat#4484452) de acuerdo al protocolo del fabricante, y posteriormente se aisló RNA total, miRNA y proteínas con el kit de life Technologies (Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit, cat # 4478545). La caracterización de exosomas fue realizada mediante microscopía electrónica y se identificó por western-blot proteínas específicas de exosomas (CD63, TSG101).

Análisis bioinformático

Se realizó una búsqueda bioinformática a partir de bases de datos como NCBI, DianaLab, MirBASE y MirWalk 2.0 para identificar miRNA blancos de unión en el 3'UTR de la HSD11B2 en humanos, y un análisis bibliográfico de potenciales miRNA asociados a HTA y HSD11B2 en humanos.

Artículo Original

Análisis de expresión

La transcripción reversa se realizó para cada miRNA, en específico, utilizando el kit TaqMan MicroRNA RT (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se usó la expresión del RNA-U6 como un control de normalización interno. Los niveles de expresión de los miRNA se evaluaron con el kit TaqMan Micro RNA Assay en el equipo RotorGene 6000 (Corbett Research, Sydney, Australia).

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como promedio \pm desviación estándar o mediana (rango intercuartil, (Q1-Q3)). Las comparaciones estadísticas se realizaron usando el test de Mann-Whitney. Las asociaciones se analizaron mediante correlación de Pearson (r) con el software GraphPad Prism v5.0. Las diferencias y asociaciones se consideraron significativas a $P < 0,05$.

Resultados

De los 127 sujetos estudiados, identificamos 9/127 sujetos (7,1%) que presentan una alta razón F/E ($> p75$) y cortisona baja ($p < 25$) predefinidos como potenciales o sugerentes de tener un síndrome de exceso aparente de mineralocorticoides (SEAM) o conocido en inglés como “*Apparent mineralocor-*

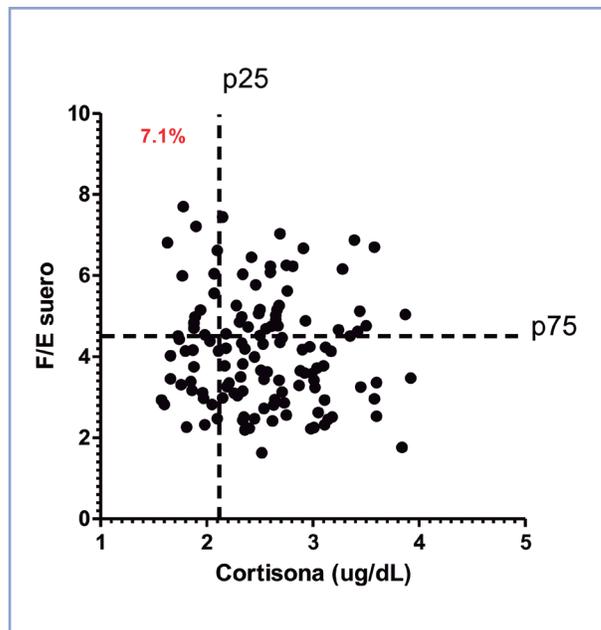


Figura 1. Clasificación de sujetos con sugerente NC-AME. Asociación de la relación F/E y los niveles de cortisona en la población total de estudio ($n = 127$). Los sujetos NC-AME fueron clasificados de acuerdo a: razón F/E $> p75$ y cortisona $< p25$, representando un 7,1% de la población de estudio.

Tabla 1. Características clínicas y bioquímicas de sujetos con AME no clásico y sin AME no clásico

Características	Sujetos NC-AME	Sujetos sin NC-AME	Valor p
n	9	118	--
edad	34,2 [12,4-47,74]	36,9 [14,1-46,77]	0,96
Hombres, %	33%	45%	0,73
Hipertensión, %	66,7%	51,7%	0,38
Índice de masa corporal, kg/m ²	29,1 [27,6-32,45]	26,18 [22,8-29,3]	0,001
Presión arterial sistólica, mm Hg	140,7 [119,5-156,8]	126,5 [115,0-135,8]	0,03*
Presión arterial diastólica, mm Hg	78,3 [66,1-94,7]	80,0 [72,6-88,1]	0,85
Aldosterona sérica, ng/dl	4,8 [4,2-9,3]	7,9 [5,15-12,85]	0,17
Actividad renina plasmática, ng/mL*h	1,6 [1,1-2,4]	1,6 [0,9-2,7]	0,01*
Sodio sérico, mEq/L	140,0 [138,5-140,5]	140,0 [139,0-141,0]	0,33
Potasio sérico, mEq/L	4,2 [3,7-4,4]	4,3 [4,1-4,6]	0,12
Microalbuminuria, mg/24 h	18,5 [9,4-117,8]	7,3 [5,0-11,6]	$< 0,0001^*$
Sodio urinario, mEq/24 h	178,5 [132,3-213,5]	141,0 [101,0-191,0]	0,20
Potasio urinario, mEq/24 h	50,0 [46,2-63,7]	48,0 [33,0-61,0]	0,06
FEK, 24 h	8,16 [6,1-10,7]	6,6 [5,1-8,2]	0,01*
Cortisol sérico, ug/dl	11,5 [10,3-13,7]	9,4 [7,0-12,7]	0,35
Cortisona sérico, ug/dl	1,9 [1,7-2,1]	2,5 [2,2-2,9]	$< 0,0006^*$
Razón cortisol/cortisona sérica	6,0 [5,3-7,0]	3,8 [2,9-4,7]	$< 0,0001^*$

Valores corresponden a mediana [Q1-Q3]. * $p < 0,05$.

ticoid excess” AME “No clásico” (NC-AME)¹² (Figura 1). Las características clínicas y bioquímicas son mostradas en la Tabla 1. Ambos grupos fueron comparables en términos de edad, sexo, aldosterona y cortisol. Los sujetos con NC-AME en comparación con sujetos sin NC-AME tienen una PA sistólica significativamente más alta (140,7 [119,5-156,8] vs 126,5 [115,0-135,8]; $p = 0,03$), FEK + (8,2 [6,1-10,7] vs 6,6 [5,1-8,2]; $p = 0,01$), una ARP menor (1,6 [1,1-2,4] vs 1,6 [0,9-2,7]; $p = 0,01$) y una MAC más alta (mg/24 h) (18,5 [9,4-117,8] vs 7,3 [5,0-11,6]; $p < 0,0001$).

Caracterización de exosomas urinarios en sujetos con alteraciones en la actividad de la 11 β HSD2 y sujetos controles

Los exosomas fueron aislados de muestras de orina matinal de todos los sujetos. El tamaño y la morfología de estas nanovesículas fueron adecuada según lo descrito en exosomas urinarios (Figura 2A). La distribución del tamaño de partículas es similar entre ambos grupos de sujetos (Figura 2B), encontrando que un 73% de las nanovesículas urinarias obtenidas tienen un tamaño entre 50-150 nm en ambos grupos de sujetos y el 27% corresponde a nanove-

sículas con un tamaño mayor a 150 nm (Figura 2C). El porcentaje de nanovesículas menor a 50 nm corresponde a menos del 0,025% (Figura 2C). Así también, el análisis de distribución de tamaño de vesículas mostró un tamaño promedio de partículas de 121 ± 51 nm vs 124 ± 54 nm y una moda de 92,3 nm vs 97,5 nm, para el grupo NC-AME vs controles, respectivamente.

Expresión diferencial de miRNA específicos para HSD11B2 en exosomas urinarios de sujetos con alteraciones en la actividad de la 11 β HSD2 y sujetos controles

A partir del análisis bioinformático se identificaron 8 miRNA con alto “score” que, potencialmente, se unen a la región 3’UTR de HSD11B2 (Tabla 2). De los 8 miRNA seleccionados por el análisis bioinformático solo amplificaron 4 microRNA en más de un 50% de las muestras (miR-615, miR-488, miR-1205 y miR-494). De los 4 miRNA analizados, solo observamos diferencias significativas en la expresión de miR-488, el cual resultó estar mayormente expresado en sujetos NC-AME vs controles (5.889 [3.746-7.487] vs 2.607 [1.576-5.290] UR; $p = 0,01$) (Figura 3).

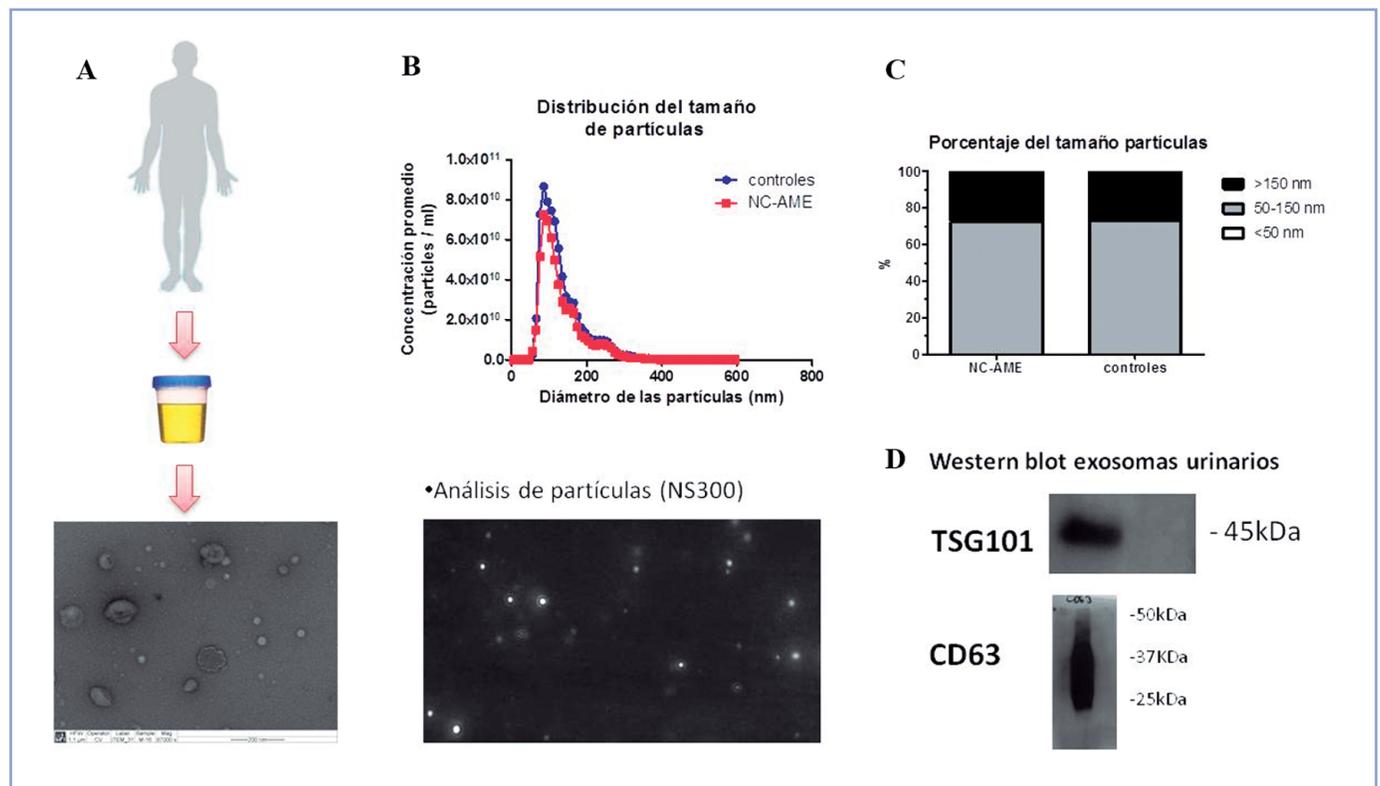


Figura 2. Caracterización de exosomas. Los exosomas fueron aislados desde orina matinal mediante ultracentrifugación y el análisis de partículas se realizó con el instrumento NanoSight NS500. **A)** Identificación de exosomas mediante microscopía electrónica. **B)** Distribución del tamaño de partículas de los dos grupos de sujetos estudiados. **C)** Porcentajes de partículas en 3 rangos de tamaño (< 50 nm; 50-150 nm; > 150 nm). **D)** Westernblot de proteínas exosomales.

Artículo Original

Tabla 2. Selección de microRNA con potencial unión a la región 3'UTR en HSD11B2

Gene Name	RefseqID	MicroRNA	Seed length	Start	Position	End	Region	Pvalue
HSD11B2	NM_000196	hsa-miR-615-5p	10	1704	1	1695	3 UTR	0,0006
HSD11B2	NM_000196	hsa-miR-1205	9	1587	2	1579	3 UTR	0,0023
HSD11B2	NM_000196	hsa-miR-488	9	1643	2	1635	3 UTR	0,0023
HSD11B2	NM_000196	hsa-miR-101	8	1833	1	1826	3 UTR	0,0092
HSD11B2	NM_000196	hsa-miR-193b*	8	1408	2	1401	3 UTR	0,0092
HSD11B2	NM_000196	hsa-miR-431	8	1626	2	1619	3 UTR	0,0092
HSD11B2	NM_000196	hsa-miR-101	7	1832	2	1826	3 UTR	0,0363
HSD11B2	NM_000196	hsa-miR-1205	7	1657	1	1651	3 UTR	0,0363
HSD11B2	NM_000196	hsa-miR-494	7	1546	1	1540	3 UTR	0,0363
HSD11B2	NM_000196	hsa-miR-637	7	1411	2	1405	3 UTR	0,0363

Análisis bioinformático realizado en miRWalk 2.0. Los miRNAs asociados a HSD11B2 están ordenados de acuerdo a su estabilidad termodinámica predicha por el análisis bioinformático (p value).

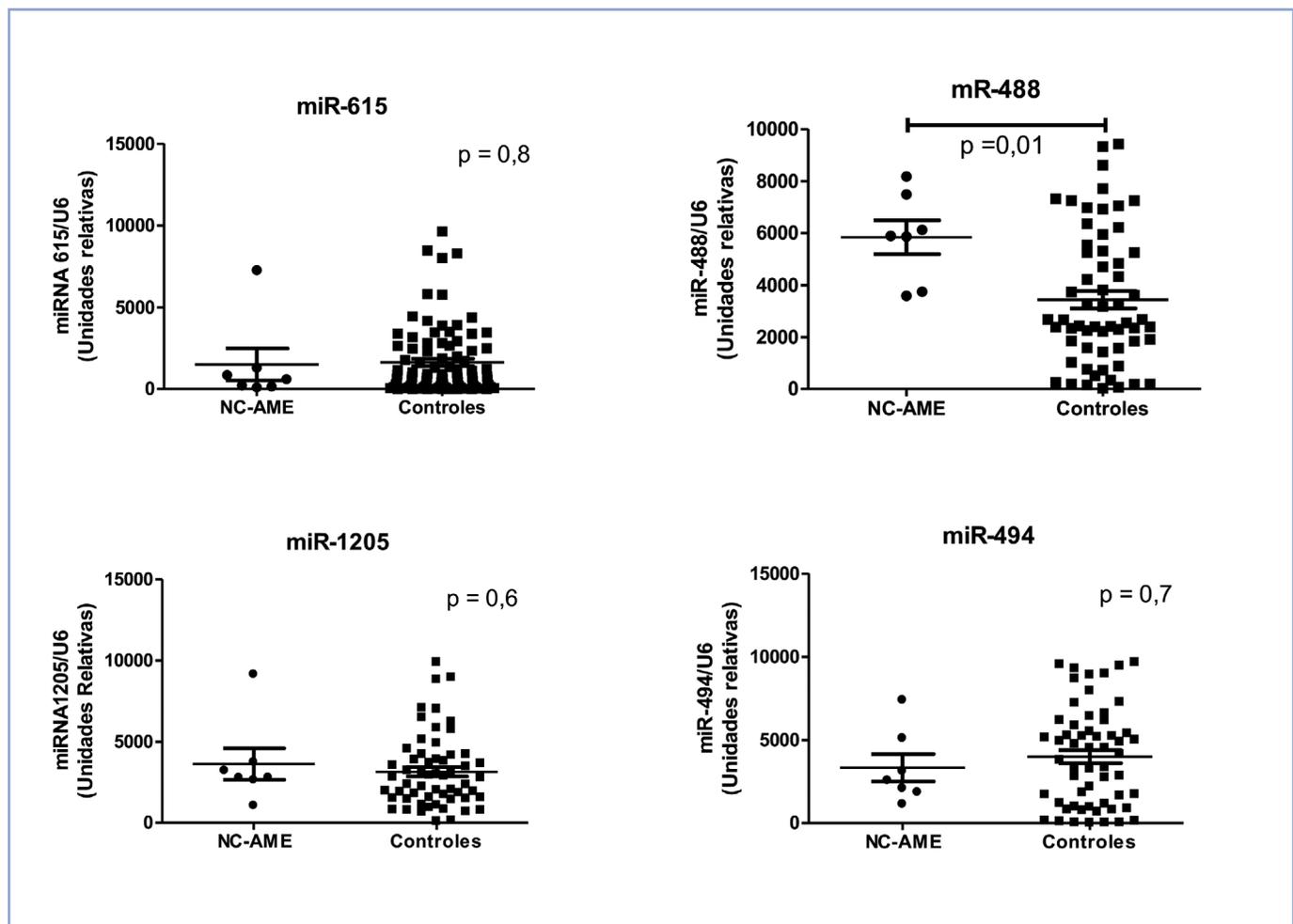


Figura 3. Expresión de miRNA en sujetos NC-AME y controles. Las comparaciones de grupos fueron realizadas con Mann-Whitney test considerando significativo $p < 0,05$.

Tabla 3. Correlación de variables clínicas/bioquímicas y miRNAs

	miR-615		miR-488		miR-1205		miR494	
	Valor p	Rho						
Edad, año	0,43	-0,08	0,74	-0,04	0,03	0,26	0,01	0,32
IMC, Kg/m ²	0,38	-0,09	0,93	0,01	0,09	0,22	0,16	0,18
PA sistólica, mmHg	0,88	-0,02	0,78	0,03	0,61	0,06	0,75	0,04
PA diastólica, mmHg	0,48	0,07	0,21	-0,16	0,58	0,07	0,51	0,08
Aldosterona, ng/dl	0,62	0,05	0,56	-0,07	0,17	-0,17	0,79	-0,03
ARP, ng/ml*h	0,02*	0,25	0,82	-0,03	0,55	-0,08	0,52	-0,08
Sodio urinario, mEq/24h	0,53	0,07	0,23	-0,15	0,01*	0,32	0,55	0,08
Na/K urinario	0,65	0,05	0,04*	0,26	0,20	0,17	0,61	-0,07
PCRus, mg/L	0,57	-0,06	0,81	-0,03	0,25	0,15	0,57	0,07
MAC, mg/24h	0,66	0,05	0,11	0,21	0,67	0,06	0,89	-0,02
MDA, μM	0,61	0,05	1,00	0,00	0,67	0,05	0,89	0,02
MMP-9, veces de cambio	0,06	0,21	0,38	0,11	0,54	0,08	0,04*	0,28
MMP-2, veces de cambio	0,09	0,18	0,37	-0,11	0,36	0,12	0,18	0,18
PAI-I, ng/ml	0,13	-0,16	0,41	-0,10	0,17	0,17	0,60	0,07
TNF-alfa, pg/ml	0,35	0,10	0,97	-0,01	0,24	0,15	0,35	0,12
IL-6, pg/ml	0,49	0,08	0,36	0,13	0,35	-0,14	0,36	-0,13
Cortisol sérico, ug/dl	0,34	0,10	0,76	0,04	0,55	-0,07	0,93	-0,01
Cortisona sérica, ug/dl	0,17	0,14	0,77	-0,04	0,61	-0,06	0,72	0,05
Razón F/E sérica	0,86	0,02	0,73	0,04	0,61	-0,06	0,72	-0,05
NGAL, ng/mL	0,09	-0,27	0,63	0,09	0,30	0,19	0,11	0,27
NGAL/MMP9, ng/mL	0,38	-0,19	0,26	0,31	0,78	0,07	0,62	0,16
NGAL Total	0,19	-0,28	0,61	0,14	0,26	0,28	0,02*	0,66

Correlación de pearson. *p < 0,05.

Estudio de asociación entre la expresión de miRNA y las diferentes variables clínicas y bioquímicas de los sujetos estudiados

En el total de los sujetos estudiados, realizamos análisis de asociación entre la expresión de los microRNA y los diferentes parámetros bioquímicos estudiados (Tabla 3). Observamos que miR-615 se asocia positivamente con la ARP ($r = 0,25$; $p = 0,02$); miR-488 se asocia positivamente con la razón sodio/potasio urinario ($r = 0,26$; $p = 0,04$); miR-1205 se asoció positivamente con la edad ($r = 0,26$; $p = 0,03$) y la excreción de sodio urinario ($r = 0,32$; $p = 0,01$) y; miR-494 se asocia positivamente con la edad ($r = 0,32$; $p = 0,01$), actividad MMP9 ($r = 0,28$; $p = 0,04$) y NGAL ($r = 0,66$; $p = 0,02$) (Tabla 3).

Discusión

En este estudio identificamos que el 7,1% de los sujetos presenta déficit parcial de la enzima 11βHSD2 (razón F/E alta y cortisona baja) y observamos que estos sujetos presentan una elevada expresión de miR-488, el cual regularía negativa y postranscripcionalmente la traducción del mRNA de 11βHSD2.

Recientemente, numerosos estudios han demostrado que los miRNA están emergiendo como una nueva clase de biomarcadores en hipertensión arterial^{8,9}. Los miRNA exosomales se han identificado en todo tipo de fluidos corporales, incluidos el plasma, las lágrimas, la saliva, el líquido peritoneal y la orina. De estas fuentes candidatas, la

Artículo Original

orina es una fuente particularmente deseable de biomarcadores para hipertensión mineralocorticoide, ya que podrían ser indicadores directos de la condición fisiopatológica a nivel renal. En 2013, Gildea et al. estudiaron el miARNoma de exosomas urinarios en sujetos sal sensible y encontraron que 45 miRNAs, probablemente, sean potenciales biomarcadores de la sensibilidad a la sal y la presión arterial¹³.

Cuando exploramos las asociaciones de miRNA y los diferentes parámetros clínicos y bioquímicos asociados a HTA, encontramos que miR-615 se asocia positivamente con la ARP, lo cual sugeriría ser un biomarcador clínico no invasivo del sistema RAA asociado a la actividad de 11 β HSD2. Por otro lado, miR-1205, miR-494 y miR-488, se asociaron con parámetros como la edad, excreción de sodio, razón excreción sodio/potasiourinaria, mayores niveles de MMP9 y NGAL, los cuales serían sugerentes biomarcadores y reguladores de la vía de señalización mineralocorticoide.

Previamente, nuestro grupos demostró que la razón cortisol/cortisona aumenta con la edad, pero disminuye con la cortisona, sugiriendo una disminución de la actividad de 11 β HSD2 con el tiempo¹⁴, lo cual explicaría en parte el aumento de la presión arterial en sujetos ancianos. La expresión de la enzima 11 β -HSD2 puede ser regulada negativamente por diferentes mecanismos epigenéticos tales como la metilación del DNA, modificación de histonas y expresión de miRNA. El presente estudio muestra que los miRNA se asocian positivamente con la edad, sugiriendo que la expresión de 11 β HSD2 disminuiría con la edad por un aumento en la expresión de miRNA.

Previamente, han sido identificados los miRNA como potenciales biomarcadores de hipertensión sal sensible¹³. La alta ingesta de sodio tiene efectos nocivos sobre la presión arterial. Recientemente, describimos que un alto consumo de sal se asocia con hipertensión arterial, resistencia a la insulina, dislipidemia e hipoadiponectinemia y esto podría estar relacionado con la desregulación del cortisol¹⁵. Hemos observado que la expresión miR-1205 en exosomas urinarios se asocia positivamente con la excreción de sodio, indicativo de una alta ingesta de sodio. Consecuentemente con estos hallazgos, Gildea et al, demostró que los miRNA posiblemente derivados de las células del túbulo renal podrían alterarse o incluso utilizarse como biomarcadores de las vías reguladoras de sodio aberrantes en hipertensión¹³. En la nefrona distal del riñón, la vía mineralocorticoide tiene un papel fundamental en la regulación homeostática de los electrolitos, el volumen de líquido y la presión arterial. En el presente estudio, las evidencias sugieren que miR-488 se asocia positivamente con la razón Na/K urinaria, indicativo de una activación de la vía mineralocorticoide. Varios estudios apoyan los resultados observacionales en donde la razón Na/K se asocia mejor con la presión arterial más que el sodio o potasio por sí solo¹⁶. Nosotros sugerimos

que una alta ingesta de sodio podría estar induciendo una mayor expresión de miR-1205 que conllevaría a una disminución en la actividad de HSD11B2 como se observa en sujetos con déficit parcial de la enzima 11 β HSD2, esto estaría de acuerdo con estudios previos que indican que una alta ingesta de sal en sujetos normotensos con déficit parcial de 11 β -hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 2 (HSD11B2) inducen una activación no regulada del receptor de mineralocorticoides (MR) por glucocorticoide y responden a un aumento en la presión arterial^{17,18}.

Por otro lado, recientemente, nuestro grupo mostró que, en población pediátrica, existe una fuerte asociación entre hipertensión y la razón F/E en suero y la actividad de MMP-9, más allá de los efectos del BMI y la edad. Marchesi et al. demostró que metaloproteinas 9, un biomarcador del remodelamiento cardiovascular, es mayormente expresada en pacientes hipertensos¹⁹. Estos estudios apoyan nuestros resultados en donde observamos que miR-494 se asocia positivamente con MMP-9, resultando ser ambos biomarcadores importantes de la remodelación cardiovascular y el deterioro de la actividad 11 β -HSD2. Así también, observamos que miR-494 se asoció con NGAL, una lipocalina expresada en neutrófilos, la cual es un gen blanco del receptor mineralocorticoide²⁰. NGAL se une a MMP9 estabilizando su actividad y este complejo NGAL/MMP9 tiene un rol fundamental en el remodelamiento de la matriz extracelular, fibrosis vascular y aumento de la presión arterial mediada por el receptor de mineralocorticoide²¹.

En resumen, encontramos que miR-488 está elevado en sujetos con déficit parcial de la enzima 11 β HSD2 y que miR-615 miR-1205, miR-488 y miR-494 se asocian con parámetros de HTA mineralocorticoide. Nuestros resultados proporcionan nueva evidencia sobre la utilidad de los exosomas y su contenido de miRNA como reguladores y biomarcadores potenciales de la actividad 11 β HSD2 a nivel renal. Sin embargo, se requieren más estudios para confirmar estos hallazgos.

Referencias

1. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. 2005. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*. 365: 217-23.
2. Campino C, Carvajal CA, Cornejo J, San Martín B, Olivieri O, Guidi G, et al. 2010. 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type-2 and type-1 (11beta-HSD2 and 11beta-HSD1) and 5beta-reductase activities in the pathogenesis of essential hypertension. *Endocrine* 37: 106-14.
3. Carvajal CA, González AA, Romero DG, González A, Mosso LM, Lagos ET, et al. 2003. Two homozygous mutations in the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene in a case of apparent mineralocorticoid excess. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 2501-7.

4. Harahap IS, Sasaki N, Gunadi, Yusoff S, Lee MJ, Morikawa S, et al. 2011. Herbal Medicine Containing Licorice May Be Contraindicated for a Patient with an HSD11B2 Mutation. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011:646540.
5. Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE, et al. 1987. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* 237: 268-75.
6. Friso S, Carvajal CA, Fardella CE, Olivieri O. 2015. Epigenetics and arterial hypertension: the challenge of emerging evidence. *Transl Res* 165: 154-65.
7. Pizzolo F, Friso S, Morandini F, Antoniazzi F, Zaltron C, Udali S, et al. 2015. Apparent Mineralocorticoid Excess by a Novel Mutation and Epigenetic Modulation by HSD11B2 Promoter Methylation. *J Clin Endocrinol Metab* 100: E1234-41.
8. Romaine SP, Charchar FJ, Samani NJ, Tomaszewski M. 2016. Circulating microRNAs and hypertension-from new insights into blood pressure regulation to biomarkers of cardiovascular risk. *Curr Opin Pharmacol* 27: 1-7.
9. Butterworth MB. 2015. MicroRNAs and the regulation of aldosterone signaling in the kidney. *Am J Physiol Cell Physiol* 308: C521-7.
10. Rezaei M, Andrieu T, Neuenschwander S, Bruggmann R, Mordasini D, Frey FJ, et al. 2014. Regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 by microRNA. *Hypertension* 64: 860-6.
11. Barros ER, Carvajal CA. 2017. Urinary Exosomes and Their Cargo: Potential Biomarkers for Mineralocorticoid Arterial Hypertension? *Front Endocrinol (Lausanne)* 8: 230.
12. Tapia-Castillo A, Baudrand R, Campino C, Vaidya A, Allende F, Valdivia C, et al. 2018. Clinical, biochemical and genetic characteristics of "Non-classical" Apparent Mineralocorticoid Excess Syndrome. *Circulation*. 2018: in press.
13. Gildea JJ, Carlson JM, Schoeffel CD, Carey RM, Felder RA. 2013. Urinary exosome miRNome analysis and its applications to salt sensitivity of blood pressure. *Clin Biochem* 46: 1131-4.
14. Campino C, Martínez-Aguayo A, Baudrand R, Carvajal CA, Aglony M, García H, et al. 2013. Age-related changes in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity in normotensive subjects. *Am J Hypertens* 26: 481-7.
15. Baudrand R, Campino C, Carvajal CA, Olivieri O, Guidi G, Faccini G, et al. 2014. High sodium intake is associated with increased glucocorticoid production, insulin resistance and metabolic syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 80: 677-84.
16. Pérez V, Chang ET. 2014. Sodium-to-potassium ratio and blood pressure, hypertension, and related factors. *Adv Nutr* 5: 712-41.
17. Ferrari P, Sansonnens A, Dick B, Frey FJ. 2001. *In vivo* 11beta-HSD-2 activity: variability, salt-sensitivity, and effect of licorice. *Hypertension* 38: 1330-6.
18. Lovati E, Ferrari P, Dick B, Jostardt K, Frey BM, Frey FJ, et al. 1999. Molecular basis of human salt sensitivity: the role of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 3745-9.
19. Martínez-Aguayo A, Campino C, Baudrand R, Carvajal CA, García H, Aglony M, et al. 2016. Cortisol/cortisone ratio and matrix metalloproteinase-9 activity are associated with pediatric primary hypertension. *J Hypertens* 34: 1808-14.
20. Latouche C, El Moghrabi S, Messaoudi S, Nguyen Dinh Cat A, Hernández-Díaz I, Álvarez de la Rosa D, et al. 2012. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a novel mineralocorticoid target in the cardiovascular system. *Hypertension* 59: 966-72.
21. Tarjus A, Martínez-Martínez E, Amador C, Latouche C, El Moghrabi S, Berger T, et al. 2015. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin, a Novel Mineralocorticoid Biotarget, Mediates Vascular Profibrotic Effects of Mineralocorticoids. *Hypertension* 66: 158-66.

Artículo Original

Cinética de muerte de linfocitos en diabetes mellitus tipo 1 y su posible asociación con miR-146a y miR-155

Lissette Duarte S.¹, Georhan Mancilla A.¹, Diego F García-Díaz¹, Néstor Soto I.² y Francisco Pérez B.¹

Kinetics of cell death in type 1 diabetes mellitus and their possible association with miR-146a and miR-155

¹Laboratorio de Nutrigenómica.
Departamento de Nutrición.
Facultad de Medicina. Universidad
de Chile.
²Unidad de Endocrinología y
Diabetes. Hospital San Borja-
Arriarán.

Correspondencia:

Dr. Francisco Pérez Bravo
Av. Independencia 1027, Santiago.
Teléfono: + 56 2 2978 61 35
fperez@med.uchile.cl

Recibido: 11-01-2018
Aceptado: 02-03-2018

Aim: Analyze mi-146a and miR-155 expression and its correlation with the apoptosis of lymphocytes T in T1D and control patient. **Patients and Methodology:** 17 T1D patients (5 children between 8-14 yr and 12 adults between 19-29 yr). Activated and not activated peripheral mononuclear cells were studied. Cellular activation with anti-CD3 and primary culture with interleukine-2 by 5 days. Apoptosis assays through flow cytometry. miRNA through Taqman probes. Statistical analysis through Kruskal-Wallis and post-hoc Dunn's test. **Results:** Composition of virgin and memory T CD4 cells showed significant differences for stimulus response in control group ($p = 0,0004$). Increased memory cells count in control group activated by 7 days than basal ($p = 0,0047$). For early apoptosis differences were observed in days 3 and 7 with and without activation ($p = 0,001$). AICD apoptosis showed increases in control group after re-stimulation through TCR ($p = 0,03$). miR-146a expression was lower in recent-onset T1D children vs recent-onset DM1 adults ($p = 0,0167$). **Conclusion:** This study shows a differential miR-146a expression in T1D children with respect to T1D adult patients, diminished AICD mechanism in T1D and altered CD4+CD45RA-CD45R0+ memory cells generation in T1D adult patients.

Key words: Type 1 Diabetes; Apoptosis; Immune System.

Introducción

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) es un trastorno autoinmune crónico que se presenta en individuos genéticamente susceptibles, gatillado por factores genéticos y ambientales¹. Se caracteriza por la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas². La DM1 se ha asociado a la región de antígenos leucocitarios humanos (HLA) y otros 40 loci^{3,4}. Sin embargo, el análisis de asociación alélica refleja valores modestos incluso para esta región⁵. Dentro del componente ambiental en DM1, se encuentran las infecciones virales⁶, la composición bacteriana del intestino⁷ y factores alimentario-nutricionales, como la ingesta temprana de leche de vaca, el consumo de proteínas del trigo y el estatus de vitamina D3, entre otros⁸.

Los microRNA (miRNAs) son pequeñas moléculas mono-hebras no codificantes de RNA (aproximadamente de 22 nucleótidos) que ejercen una función represiva sobre

RNAs mensajeros (mRNA)⁹. Los miRNAs participan en la regulación inmune, diferenciación celular y plasticidad celular¹⁰. miR-146a ha demostrado tener un importante rol en la patogenia del lupus (SLE) observándose que su baja expresión induce la hiperactivación de la vía del Interferón tipo I (I-INF)¹¹. En artritis reumatoide (RA), miR-146a se encuentra sobreexpresado en varios tipos celulares y se ha propuesto que cumple una función reguladora negativa sobre citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-17¹². En DM1, la evidencia indica que, en la etapa inmediatamente posterior al debut clínico, la expresión de miR-146a disminuye en células mononucleares periféricas (PBMCs)¹³ y que miR-146a estaría involucrado en las complicaciones de la diabetes y la producción de proteínas de matriz extracelular¹⁴. En cuanto al miR-155 se ha demostrado que tiene participación en numerosos procesos biológicos, incluyendo la hematopoyesis, inflamación e inmunidad¹⁵. De esta forma, miR-155 controla la diferenciación de células T CD4 en los subgrupos de células

colaboradoras tipo 1, 2 y 17 (Th1, Th2 y Th17)¹⁶ afectando el desarrollo de células T reguladoras (Treg)¹⁷, y regulando las células T CD8¹⁸ siendo esencial para la normal diferenciación de células B y la producción de anticuerpos¹⁹.

El objetivo de este estudio fue analizar la cinética de muerte de linfocitos en pacientes con DM1 y su relación con la expresión génica de miR-146a y miR-155 en un modelo de células activadas y no activadas.

Pacientes y Metodología

En este estudio participaron cinco niños (8-14 años), doce adultos (19-29 años) y diez controles adultos sanos (21-28 años), provenientes del Instituto de Investigación Materno Infantil (IDIMI) y la Sección de Endocrinología y Diabetes del Hospital Clínico San Borja Arriarán. La investigación fue aprobada por el Comité de Ética en Investigación Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, y del Servicio de Salud Metropolitano Central (CEC) del Hospital San Borja Arriarán. Todos los pacientes, padres y/o apoderados de los niños y adolescentes, participantes firmaron consentimiento informado.

Extracción y activación celular

Se tomaron 12 mL de muestra de sangre periférica por punción venosa. Las muestras con anticoagulante fueron diluidas en solución salina tamponada con fosfato PBS, homogeneizada y depositada sobre una solución de Ficoll-Hypaque. La separación por gradiente de densidad se realizó mediante centrifugación por 30 min a 410 g, sin freno, a 4 °C. Los PBMCs fueron transferidos a un tubo con PBS y lavados 2 veces, mediante centrifugación a 730 g por 10 min. Finalmente, el precipitado celular fue resuspendido en RPMI-1640 y cultivado en RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor, 10 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 5 uM de 2-mercaptoetanol, 100 U/mL de penicilina y 100 ug/mL de estreptomina. Las incubaciones se realizaron por 8 h, 3 días y 8 días a 37 °C con 5% CO₂, en placas de 96 pocillos a una concentración de 1 x 10⁶ células/mL.

Las células fueron incubadas con 50 µL de solución de PBS con 5 µg/mL de anti-CD3 (clon OKT3, eBioscience Inc., San Diego, EE. UU.) durante toda la noche a 4 °C, y luego lavadas 3 veces con 200 µL de PBS. Las PBMCs fueron cultivados en alícuotas de 200 µL por pocillo y coestimuladas con 2 µg/mL de anti-CD28 (clon 28.2, eBioscience Inc., San Diego, EE. UU.) por 72 h. Luego fueron lavadas 2 veces con 200 µL de PBS a 37 °C y transferidas a una placa de 96 pocillos sin anticuerpos, suplementadas con 200 UI/mL de IL-2 (Human IL-2 Recombinant Protein, eBioscience Inc., San Diego, EE. UU.) y cultivadas hasta completar 7 días 1 x 10⁶. PBMCs procedentes de los cultivos activados por 7 días

fueron reestimuladas por 8 h con 5 µg/mL de anti-CD3 unidas a la placa, suplementado con 100 UI/mL de IL-2 o expuestas a anti-FAS (clon EOS9.1, eBioscience Inc., San Diego, USA) durante 8 h (la condición control fue suplementada con IL-2). Todas las determinaciones de concentración y viabilidad para ajustes de concentraciones de cultivos celulares, fueron realizadas usando el kit de Muse™ Count & Viability (Merck, Sao Paulo, Brasil).

Determinación de apoptosis, citometría de flujo y porcentaje de subpoblaciones

La apoptosis fue analizada mediante el kit de Muse™ Annexin V & Dead Cell (Merck, Sao Paulo, Brasil), para cuantificar las concentraciones y porcentajes de: células sin apoptosis (LL), en apoptosis temprana (EA), en apoptosis tardía (LA) o muertas. Todos los anticuerpos utilizados, anti-CD4 (clon OKT-4) conjugado a Isocianato de fluoresceína (FITC), anti-CD8a (clon HIT8a) conjugado a Ficoeritrina (PE), anti-CD3 (clon UCHT1) conjugado a Cianina 5R-PE (Cy5-PE), anti-CD45RA (clon HI100) conjugado a PE y anti-CD45R0 (clon UCHL1) conjugado a PE-Cy5, fueron obtenidos de eBioscience. La cuantificación de linfocitos T reguladores (CD3+CD4+CD8-), linfocitos T citotóxicos (CD3+CD4-CD8+), linfocitos T CD4 naïve (CD4+CD45RA) y linfocitos T CD4 de memoria (CD4+CD45R0+) fue realizada a través de inmuno-marcaje. Las distintas fluorescencias de subpoblaciones fueron cuantificadas por el equipo FACSAriaIII™ y, posteriormente, analizadas en el programa FlowJo vX (Tree Star's Inc., Oregon, EE. UU.).

Extracción de RNA total y síntesis de cDNA de miRNAs

La extracción de RNA total fue realizada por el método de TRIzol. La integridad del RNA fue evaluada visualizando bandas ribosomales 28S y 18S. Su cuantificación se realizó por espectrofotómetro (Infite NanoQuant M200). Se sintetizó cDNA de miR-146a, miR-155 y rU6 a partir de 10 ng/reacción utilizando el ensayo TaqMan Small RNA Assays (Applied Biosystems, Life Technologies, California, EE. UU.), utilizando los partidores TaqMan diseñados contra las secuencias maduras (Tabla Suplementaria 1). La expresión relativa fue analizada por qPCR (Applied Biosystem, Foster City, EE. UU.). Se utilizaron sondas TaqMan MGB y Universal PCR Master Mix II (2x) no UNG, en duplicado en el equipo Agilent Mx3005P (Agilent Technologies, California, EE. UU.). La normalización se llevó a cabo respecto al grupo no diabético, utilizando como control endógeno a U6 snRNA.

Análisis estadístico

El análisis de la curva de crecimiento celular, respecto a las variables "concentración de células vivas", "porcentaje de células en apoptosis temprana", "porcentaje de células en apoptosis tardía", "expresión relativa de miRNAs" se realizó

Artículo Original

mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Las comparaciones entre grupos se realizaron con análisis “post-hoc” de Dunn. La expresión relativa de los miRNAs fue calculada en base al método del $\Delta\Delta Ct$, considerando como condición basal al grupo de controles sanos en tiempo cero. Finalmente, la determinación de asociación fue realizada mediante r de Spearman con una significancia de $p < 0,05$. Los gráficos, correlaciones y otros análisis fueron realizados con programa de análisis estadístico GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EE. UU.).

Resultados

La determinación de los componentes de memoria inmunológica, a través de la composición de células T CD4 vírgenes y de memoria (Figura 1), mostró diferencias estadísticamente significativas para la respuesta al estímulo en el grupo control ($p = 0,0004$). La comparación entre grupos reveló un incremento de la cantidad de células de memoria en el grupo control para la condición de activación por 7 días respecto al basal ($p = 0,0047$). Este incremento fue menor en el grupo con DM1 ($p = 0,0133$). El análisis de la apoptosis temprana (Figura 2A), no mostró diferencias significativas al comparar el grupo control con respecto al grupo DM1 en condiciones basales, sin embargo, las diferencias se presentaron al día 3

y 7 de cultivo tanto en la condición activa, como no activa entre DM1 y controles ($p = 0,001$, Figura 2B). La apoptosis tardía, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos DM1 y control.

La apoptosis autoinducida por sobre activación (AICD) o la sensibilidad a la muerte inducida por la interacción Fas-FasL se resume en la Figura 3. Se observó un aumento de la apoptosis en el grupo control tras la reestimulación vía TCR ($p = 0,03$).

Finalmente, la expresión relativa de miR-146a durante la reestimulación no fue diferente entre el grupo DM1 y control. La expresión relativa de miR-155 durante la curva de crecimiento mostró un aumento para las condiciones de activación en ambos grupos, pero estas diferencias no fueron significativas. Al analizar la expresión relativa de ambos miRNAs en condiciones basales en niños con reciente diagnóstico de DM1 ($n = 5$), adultos con DM1 ($n = 12$) y en el grupo control ($n = 15$), se observó que mir-146a mostró diferencias significativas entre niños DM1 y DM1 adultos ($p = 0,0167$), y que mir-155 no mostró diferencias entre los grupos (Figura 4). Finalmente, al analizar la correlación entre la expresión relativa de miR-146a y miR-155 vs apoptosis no se observó correlación entre estos miRNAs y apoptosis temprana (miR-146a $r = 0,137$; $p = 0,287$; miR-155 $r = -0,175$; $p = 0,167$). Sólo se observó asociación entre miR-155 y apoptosis total ($r = -0,4121$; $p = 0,0009$).

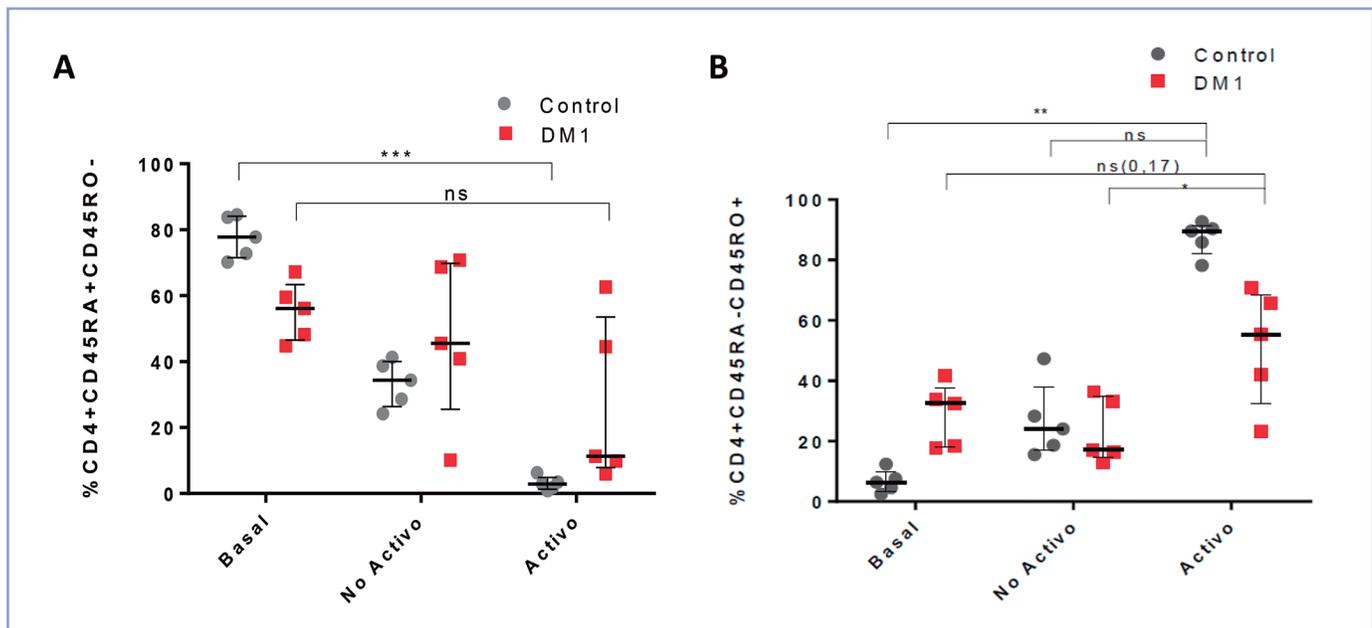


Figura 1. A: composición de linfocitos T CD4 vírgenes y B: composición de linfocitos T CD4 de memoria respecto a la población de linfocitos de CD4. Células marcadas CD4+CD45RA+CD45RO- y CD4+CD45RA-CD45RO+, respectivamente, en condición basal, cultivo sin activar por 7 días; cultivo activado por 7 días. Valores expresados como mediana y rango intercuartílico * $p = 0,0133$; ** $p = 0,0047$; *** $p = 0,0004$.

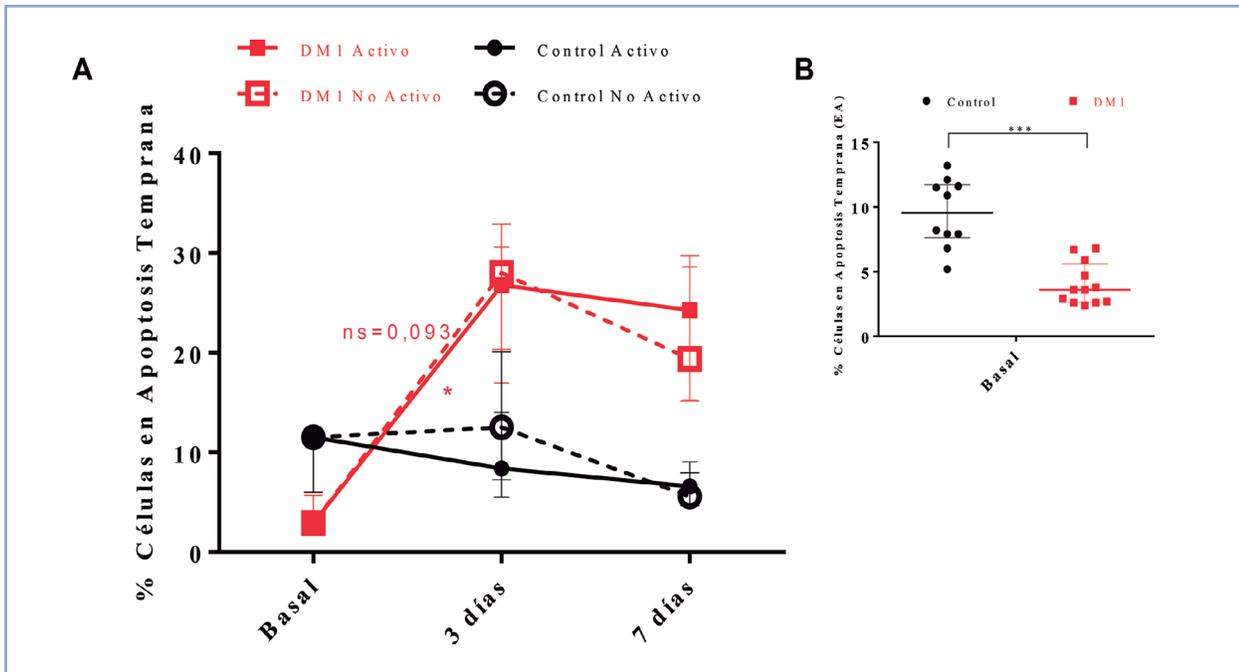


Figura 2. Porcentaje de células en apoptosis temprana. A: conjunto de las curvas de crecimiento celular de los grupos DM1 y control en condiciones de activación y sin activación. B: comparación entre el grupo DM1 y control en condiciones basales. Valores expresados como mediana y rango intercuartílico. *p = 0,0013. ***p < 0,001.

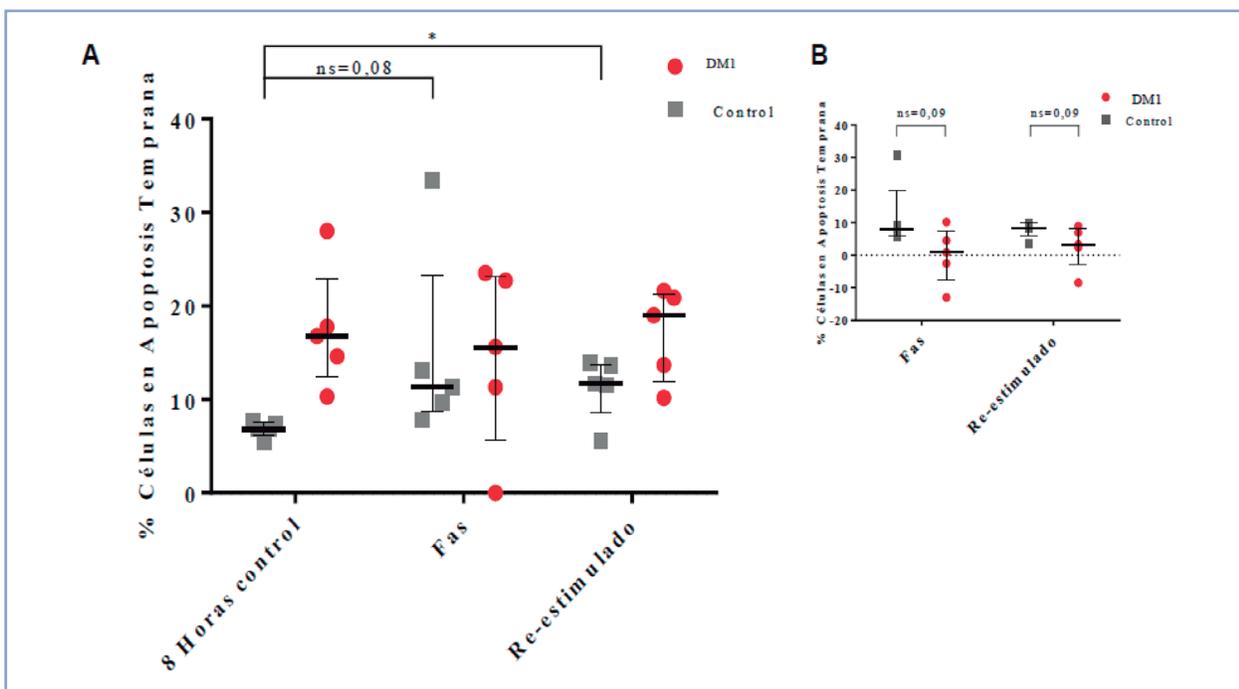


Figura 3. Gráficos de apoptosis bajo condiciones de reestimulación. A: resumen de la apoptosis derivadas del cultivo celular por 8 h, en condiciones control, de exposición a FasL y de reestimulación. B: apoptosis específica bajo condiciones de exposición a FasL y de reestimulación. Valores expresados como mediana y rango intercuartílico. *p = 0,03.

Artículo Original

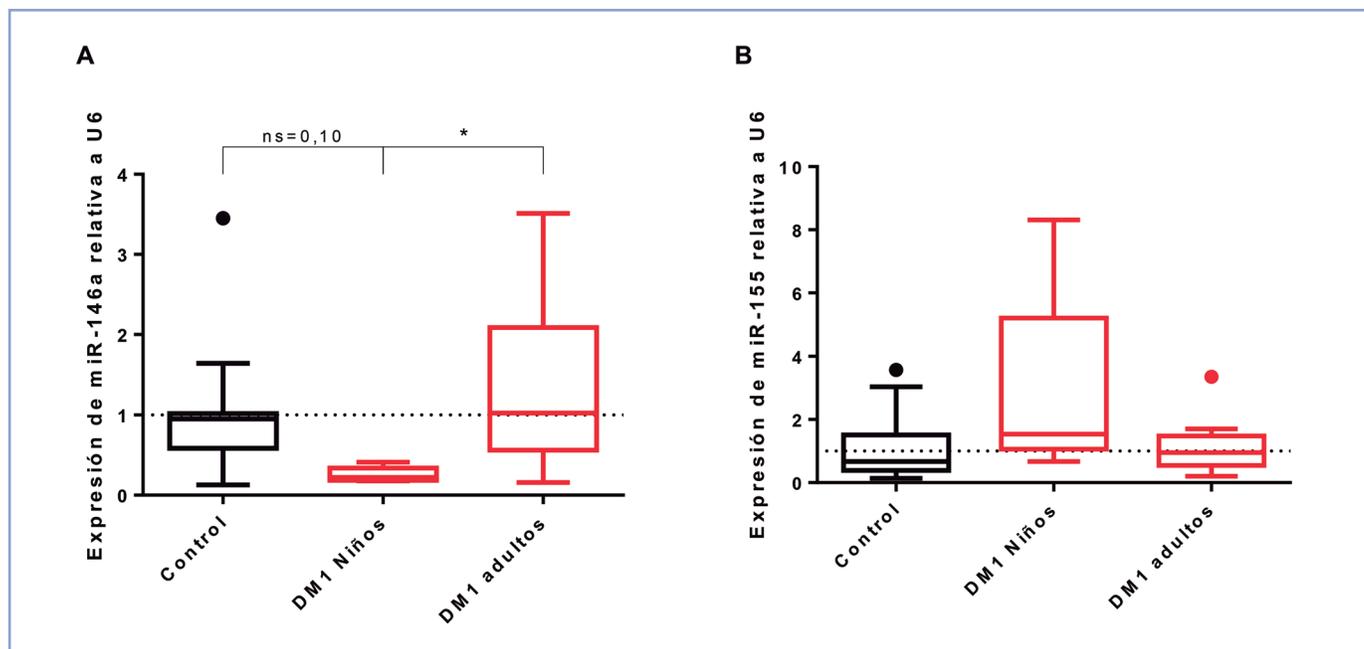


Figura 4. Comparación de expresión relativa de miR-146a y miR-155 en adultos y niños con DM1. A: expresión relativa de miR-146a; B: expresión relativa de miR-155. Valores expresados como mediana y rango intercuartílico.

Discusión

Estudios previos han mostrado cambios en las etapas del inicio clínico de la DM1, describiéndose una disminución persistente de la razón CD4/CD8 en pacientes que presentan esta patología²⁰. Nuestro estudio no mostró esta diferencia, lo cual podría explicarse por una desaceleración inmune presente en nuestros pacientes con DM1 los cuales, en su mayoría, tenían un estadio de enfermedad más avanzada. Se podría especular que la falla en los receptores periféricos, derivada de procesos tales como: oxidación, nitración y glicación de proteínas consecuencia de glicemias crónicas elevadas²¹, sea el fenómeno que conduzca a esta desaceleración, al alterar la eficiencia de unión de agonistas a sus receptores tales como TCR, teniendo un efecto neto de aumento del umbral de activación como se ha observado en diabetes tipo 2²². Esto sugiere la existencia de adaptaciones que buscan compensar la hipersensibilidad de los linfocitos en pacientes bajo cuadros autoinmunes avanzados²³.

Los resultados respecto a la generación de células T de memoria tras una activación vía TCR (con anti-CD3, anti-CD28 y suplementado con IL-2) en el grupo de adultos con DM1 y controles sin DM1, mostró un aumento significativo en las células activadas respecto a las no activadas en el grupo control, fenómeno no observado en el grupo de adultos con DM1. Esta característica, sumada a la pérdida del marcador de condición naive, daría cuenta de una respuesta alterada,

que se condice con el condicionamiento a nivel sistémico de individuos con enfermedades autoinmunes en etapas avanzadas²⁴.

Nuestro estudio mostró una menor apoptosis basal en pacientes adultos con DM1 respecto al grupo control, fenómeno que cambió rápidamente luego de 3 días de cultivo celular, aumentando la apoptosis tanto en cultivos activados, como no activados. Esto podría evidenciar una mayor sensibilidad de los linfocitos del grupo con DM1 a perturbaciones originadas por el cultivo *in vitro* (al día 3 se le suministró IL-2), que posiblemente se explique por el fenómeno de sensibilidad compensatoria que se traduce en mayores requerimientos de señales de sobrevivencia, lo que es coherente con lo observado al día 7 donde se evidenció una disminución de la apoptosis respecto al tercer día.

Las fallas en el término de la tolerancia periférica han sido vinculadas a numerosas enfermedades autoinmunes, en particular, el AICD pareciera ser la forma más crítica en el desarrollo de una autoinmunidad²⁵. Esto, debido a que en un núcleo inflamatorio donde se concentran las señales que permiten a los linfocitos actuar en la destrucción controlada de blancos inmunes, se genera estrés tisular y esta destrucción se desarrolla de forma controlada o no dependiendo de la magnitud de la infección o daño (insulinitis). Si en este escenario, las células en necrosis superan la capacidad de macrófagos en el núcleo inflamatorio se exponen epítopes intracelulares como la maquinaria de procesamiento de RNA RISC, que es

altamente inmunogénica²⁶ y que en un contexto inflamatorio daría como resultante la generación de linfocitos de memoria.

En pacientes con DM1 en etapas iniciales, se ha reportado que los linfocitos presentan una resistencia a AICD comparado a sujetos controles a través de la vía Fas²⁷. Esta resistencia a AICD vía Fas también se observó en nuestro estudio en adultos con DM1. Para el caso de la apoptosis en linfocitos, el factor NF- κ B es uno de los más estudiados, por su versatilidad de respuesta y su participación en vías de señalización de apoptosis que lo describen como integrador de señales²⁸. Tanto miR-146a como miR-155, han demostrado participar en la regulación de la apoptosis en variados tipos celulares por medio de la regulación de vías de señalización que convergen en NF- κ B^{28,29}. Nuestro estudio mostró una expresión disminuida de miR-146a en condiciones basales en niños con DM1, lo que es concordante con lo descrito por Yang et al¹³. La expresión de miR-146a en adultos, siguió una tendencia al aumento en grupos no activados y una disminución en los grupos activados. Esto posiblemente se deba a que miR-146a en su regulación de retroalimentación negativa sobre NF- κ B tiene un efecto neto pro-apoptótico, lo que en el grupo control se ajusta bastante bien al modelo de sensibilización a la apoptosis producto de la activación vía TCR. Además, la expresión de miR-146a durante la reestimulación mostró un aumento en ambos grupos, sin ser éste un cambio significativo. Una cinética similar en la expresión de miR-146a se ha descrito en modelo de cicatrización de heridas en diabéticos, donde se ha propuesto que la expresión de miR-146a podría ser un predictor sistémico de patologías vinculadas al término de la respuesta inmune vía TLR³⁰. Por último, nuestro estudio mostró correlaciones negativas significativas entre la expresión de miR-146a y apoptosis en el grupo con DM1 en AICD. Esto podría relacionar a miR-146a con el fenómeno de apoptosis en la DM1.

En conclusión, este estudio mostró que niños con diagnóstico reciente de DM1 presentan una expresión reducida de miR-146a en condiciones basales; que AICD como mecanismo de contracción de la respuesta inmune, está disminuido en niños y adultos con DM1; y que la generación de células de memoria CD4+CD45RA-CD45RO+ se encuentra reducida en pacientes adultos DM1.

Agradecimientos

Los autores agradecen a todos los pacientes y controles participantes en esta investigación. Este proyecto fue financiado por FONDECYT 1130240.

Referencias bibliográficas

- Todd JA. 2010. Etiology of Type 1 Diabetes. *Immunity* 32 (4): 457-467.
- Van Belle TL, Coppieters KT, Von Herrath M. 2011. Type 1 Diabetes: Etiology, Immunology, and Therapeutic Strategies. *Physiol Rev.* 91 (1): 79-118.
- Pociot F, Akolkar B, Concannon P, Erlich HA, Julier C, Morahan G, et al. 2010. Genetics of Type 1 Diabetes: What's Next? *Diabetes* 59 (7): 1561-1571.
- Noble JA, Valdés AM. 2011. Genetics of the HLA Region in the Prediction of Type 1 Diabetes. *Current diab rep* 11 (6): 533-542.
- Gillespie KM, Bain SC, Barnett AH, Bingley PJ, Christie MR, Gill GV, et al. 2004. The rising incidence of childhood type 1 diabetes and reduced contribution of high-risk HLA haplotypes. *The Lancet* 364 (9446): 1699-1700.
- Rodríguez-Calvo T, Sabouri S, Anquetil F, von Herrath MG. 2016. The viral paradigm in type 1 diabetes: Who are the main suspects? *Autoimmun Rev.* 15 (10): 964-9.
- Vaarala O, Atkinson MA, Neu J. 2008. The "Perfect Storm" for Type 1 Diabetes: The Complex Interplay Between Intestinal Microbiota, Gut Permeability, and Mucosal Immunity. *Diabetes* 57 (10): 2555-2562.
- Virtanen SM. 2016. Dietary factors in the development of type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 17 Suppl 22: 49-55.
- Carthew RW, Sontheimer EJ. 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136 (4): 642-655.
- Baumjohann D, Ansel KM. 2013. MicroRNA Regulation of T Helper Cell Differentiation and Plasticity. *Nature reviews. Immunology* 13 (9): 666-678.
- Tang Y, Luo X, Cui H, Ni X, Yuan M, Guo Y, et al. 2009. MicroRNA-146a contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis Rheum* 60 (4): 1065-1075.
- Pauley KM, Satoh M, Chan AL, Bubb MR, Reeves WH, Chan EK. 2008. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 10 (4): R101-R101.
- Yang M, Ye L, Wang B, Gao J, Liu R, Hong J, et al. 2015. Decreased miR-146 expression in peripheral blood mononuclear cells is correlated with ongoing islet autoimmunity in type 1 diabetes patients. *J Diabetes* 7 (2): 158-165.
- Bhatt K, Kato M, Natarajan R. 2016. Mini-review: emerging roles of microRNAs in the pathophysiology of renal diseases. *Am J Physiol Renal Physiol.* 310 (2): F109-18.
- Faraoni I, Antonetti FR, Cardone J, Bonmassar E. 2009. miR-155 gene: A typical multifunctional microRNA. *Biochim Biophys Acta* 1792 (6): 497-505.
- O'Connell RM, Kahn D, Gibson W, Round J, Scholz RL, Chaudhuri A, et al. 2010. MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. *Immunity* 33 (4): 607-619.
- Kohlhaas S, Garden OA, Scudamore C, Turner M, Okkenhaug K, Vigorito E. 2009. Cutting Edge: The Foxp3 Target miR-155 Contributes to the Development of Regulatory T Cells. *J Immunol* 182 (5): 2578-2582.
- Lind EF, Elford AR, Ohashi PS. 2013. Micro-RNA 155 Is

Artículo Original

- Required for Optimal CD8⁺ T Cell Responses to Acute Viral and Intracellular Bacterial Challenges. *J Immunol* 190 (3): 1210-1216.
19. Thai TH, Calado DP, Casola S, Ansel KM, Xiao C, Xue Y, et al. 2017. Regulation of the Germinal Center Response by MicroRNA-155. *Science* 316 (5824): 604-608.
 20. Al-Sakkaf L, Pozzilli P, Tarn AC, Schwarz G, Gale E, Bottazzo GF. 1989. Persistent reduction of CD4/CD8 lymphocyte ratio and cell activation before the onset of Type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 32 (5): 322-325.
 21. Méndez J, Xie J, Aguilar-Hernández M, Méndez-Valenzuela V. 2010. Trends in advanced glycation end products research in diabetes mellitus and its complications. *Mol Cell Biochem* 341 (1-2): 33-41.
 22. Shah BR, Hux JE. 2003. Quantifying the Risk of Infectious Diseases for People With Diabetes. *Diabetes Care* 26 (2): 510-513.
 23. Maddur MS, Vani J, Lacroix-Desmazes S, Kaveri S, Bayry J. 2010. Autoimmunity as a Predisposition for Infectious Diseases. *PLoS Pathog* 6 (11): e1001077.
 24. Pender MP. 1999. Activation-induced apoptosis of autoreactive and alloreactive T lymphocytes in the target organ as a major mechanism of tolerance. *Immunol Cell Biol* 77 (3): 216-223.
 25. Ceribelli A, Satoh M, Chan EK. 2012. MicroRNAs and autoimmunity. *Curr opin immunol* 24 (6): 686-691.
 26. Richiusa P, Pizzolanti G, Misiano G, Mattina A, Citarrella R, Galluzzo A, Giordano C. 2004. Up-regulation of c-FLIPshort and reduction of activation-induced cell death in T-cells from patients with Type 1 diabetes. *Diab. Nutr. Metab* 17 (1): 6-11.
 27. Bonizzi G, Karin M. 2004. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25 (6): 280-288.
 28. Aalaei-andabili SH, Rezaei N. 2013. Toll like receptor (TLR)-induced differential expression of microRNAs (MiRs) and immune response against infection: A systematic review. *J Infect* 67 (4): 251-264.
 29. Xu J, Wu W, Zhang L, Dorset-Martin W, Morris MW, Mitchell ME, Liechty K. 2012. The Role of MicroRNA-146a in the Pathogenesis of the Diabetic Wound-Healing Impairment: Correction With Mesenchymal Stem Cell Treatment. *Diabetes* 61 (11): 2906-2912.
 30. Dasu MR, Martin SJ. 2014. Toll-like receptor expression and signaling in human diabetic wounds. *World Journal of Diabetes* 5 (2): 219-223.

Hiponatremia grave en paciente con anorexia nerviosa. Caso clínico y revisión de la literatura

Patricio Salman M.¹ y Andrea Sáez E.²

Severe hyponatremia in a patient with anorexia nervosa. Case report and review of literature

Electrolyte disorders are a not infrequent alteration in patients with anorexia nervosa. Its mechanisms are multifactorial, depending on the electrolytic alteration. Hyponatremia is described in 7% of patients and generally does not reach serious values. We present the case of a female patient with difficult-to-manage anorexia nervosa who was hospitalized for hyponatremia with values not described in the literature, with a good final outcome. Literature and the main physiopathological mechanisms are reviewed.

Key words: Hyponatremia. Anorexia Nervosa. Undernourishment.

¹Sección Endocrinología, Departamento de Medicina Interna de la Facultad de Medicina, Universidad de Concepción.

²Residente de Medicina Interna del Departamento de Medicina Interna de la Facultad de Medicina, Universidad de Concepción.

Sin financiamiento. Sin conflicto de interés.

Correspondencia:

Patricio Salman Mardones

Profesor Asistente de la Facultad de Medicina de la Universidad de Concepción.

Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Chacabuco con Janequeo s/n, 4° piso. Barrio Universitario. Concepción.

Teléfono: (41) 2204921

psalman@udec.cl

Recibido: 24-01-2018

Aceptado: 08-03-2018

Introducción

La anorexia nerviosa (AN) es un desorden psiquiátrico caracterizado por alteración de la imagen corporal, restricción alimentaria persistente y bajo peso corporal¹. Este desorden está asociado con una disregulación global desde el punto de vista endocrinológico, afectando, principalmente, el eje hipotálamo-hipófisis incluyendo hipogonadismo hipogonadotrópico, resistencia a hormona de crecimiento, hipercortisolemia, síndrome eutiroideo enfermo, alteración mineralización ósea y alteraciones electrolíticas donde destaca la hiponatremia. El caso clínico que presentaremos es una paciente joven con antecedente de anorexia nerviosa que se hospitalizó por cuadro de hiponatremia grave con compromiso de conciencia y crisis convulsiva, con revisión de la literatura de sus principales mecanismos fisiopatológicos.

Caso clínico

Paciente de género femenino, 17 años, con antecedentes de amaurosis congénita, anorexia nerviosa desde

los 14 años, sin antecedentes quirúrgicos ni alérgicos. No usa medicamentos, tampoco uso de laxantes, sólo declara uso de *Hypericum perforatum* (Hierba de San Juan). Según madre de la paciente utilizó sertralina hace 18 meses siendo suspendida hace un año aproximadamente. No consume alcohol, tabaco u otra droga ilícita. Dentro de los antecedentes ginecoobstétricos presentó su menarquia a los 13 años y desde los 14 años en amenorrea, sin uso de anticonceptivo o terapia de reemplazo hormonal. Desde el punto de vista nutricional la paciente se declara vegetariana.

Ingresa al Hospital Clínico Regional de Concepción a comienzos de diciembre de 2017 por cuadro de compromiso de conciencia de horas de evolución que se asoció a crisis convulsiva, siendo trasladada en ambulancia hasta el Servicio de Urgencia del recinto asistencial. A su ingreso la paciente ya estaba vigil, taquicárdica, resto de los signos vitales y examen físico normales. Dentro de los exámenes iniciales solicitados destaca Na⁺ 101 mEq/L, K⁺ 2,8 mEq/L, Cl⁻ 71 mEq/L, BUN 4 mg/dl, glicemia 121 mg/dl, CK total 1.059, hematocrito 28,2%, Hb 10,6, pH 7,37, HCO₃ 15,6 mmol/L, pO₂ 129 mmHg, pCO₂ 27 mmHg, TSH 4,2 uUI/ml, osmolalidad plasmática

Caso Clínico

ca 210 mOsm/kg. En el Servicio de Urgencia se administra 2 bolos de suero fisiológico al 3%. Posteriormente se ingresa a Servicio de Medicina Interna siendo manejada inicialmente con suero fisiológico al 0,9%. Corrección de natremia paulatina hasta llegar a 135 mEq/L. Es evaluada, posteriormente, por equipo de endocrinología, encontrándose paciente vigil, asintomática, que al interrogatorio niega uso de cualquier medicamento, ni diuréticos, ni antidepresivos, reconociendo un consumo no cuantificado, pero aparentemente excesivo de agua en forma permanente y en particular los días previos a su ingreso. Al examen físico destaca peso 30,7 kg talla 1,58 mt, IMC 12,3, hidratación adecuada, mucosas levemente pálidas, escaso desarrollo caracteres sexuales secundarios, con escaso desarrollo muscular, sin signos de hipercortisolismo. Se solicita cortisol AM cuyo resultado fue normal 11 ug/dl. Desde el punto de vista nutricional fue manejada con alimentación por sonda con fórmula polimérica más alimentación oral en forma paulatina para evitar síndrome de realimentación. Además, se solicitó densitometría ósea, que por protocolo del hospital en edades pediátricas sólo se informó la densidad ósea corporal total con un Z-2,6. Ante la situación de peso actual y amenorrea secundaria, se le indicó uso de estrógenos que la paciente rechazó en forma absoluta, decidiéndose uso de bisfosfonato.

Finalmente, la paciente recuperó la natremia a valores de normalidad, la familia decide firmar alta administrativa por solicitud de la paciente.

Discusión

La AN es un cuadro psiquiátrico que produce alteraciones endocrinológicas en distintas áreas. Una de ellas, son las alteraciones electrolíticas con potenciales consecuencias graves para los pacientes. Nuestro caso clínico evidencia algo no infrecuente en AN como es la hiponatremia, pero este nivel de gravedad a nuestro entender no ha sido reportado en la literatura. Dado que la hiponatremia en el contexto de AN no suele ser grave, sólo está reportado un nivel de 122 mEq/L en un estudio². La prevalencia de hiponatremia en AN es variable, pero está descrito en un 7% de los pacientes².

La fisiopatología de la hiponatremia en AN es multifactorial, describiéndose los siguientes mecanismos: la secreción inadecuada de hormona antidiurética (ADH), consumo excesivo o compulsivo de agua, disminución de la ingesta de sodio en la dieta, hipovolemia debido a malnutrición o purga, reabsorción tubular renal de sodio y cloro alterada en contexto de desnutrición, uso de medicamentos (como los inhibidores de la recaptación de serotonina) que produzcan SIADH, o medicamentos tipo diuréticos (ej. tiazidas)³⁻⁵. En el caso de la secreción

inadecuada de ADH está documentada su elevación en el fluido cerebroespinal en humanos en el contexto de depresión, estrés crónico y descrita, además, en AN⁶⁻⁸. Respecto al consumo excesivo de agua libre por parte de pacientes con AN también tiene una explicación multifactorial, desde medicamentos anticolinérgicos que producen xerostomía⁹, como estrategia para reducir el hambre, o subir de peso previamente a sus controles médicos, o incluso en incapacidad de los pacientes de distinguir sed de hambre^{4,10}. La disminución de la ingesta de sodio en la dieta está descrita con la finalidad de control de peso⁵. Existe en la literatura un reporte de una paciente con AN que se produjo una rabdomiolisis por ejercicio excesivo asociado a hiponatremia, donde esta última puede ser explicada por la rabdomiolisis¹¹. En el caso de nuestra paciente, la historia clínica fue suficientemente clara para atribuir la hiponatremia al consumo excesivo de agua en forma crónica y en particular los días previos a su ingreso. No estaba el dato anamnésico de ejercicio previo y la CK total elevada puede ser explicada por la crisis convulsiva que presentó.

Una correcta elaboración de la historia clínica permitirá identificar las principales causas de hiponatremia en un paciente en particular, dado que el tratamiento no es igual para todos.

La medición de sodio urinario y osmolalidad urinaria puede ayudar en distinguir SIADH de la ingesta excesiva de agua. En el caso de esta última, el sodio urinario será bajo, al igual que la osmolalidad urinaria, mientras que en el SIADH el sodio urinario será > 30 mEq/L y la osmolalidad urinaria será > 100 mOsm/kg⁴.

El tratamiento de la hiponatremia está dado por las normas habituales y depende de su gravedad y síntomas. En el caso de nuestra paciente, una hiponatremia grave como la que presentó (101 mEq/L) y la crisis convulsiva secundaria a éste, hacía necesario el uso de suero fisiológico al 3% para salir de ese estado. Con el conocimiento de la fisiopatología de la hiponatremia en el contexto de AN, y el dato anamnésico de consumo excesivo de agua, probablemente sólo el hecho de la hospitalización y restricción del consumo elevado de agua pudiera ser suficientes para la correcta corrección de la natremia que se tiene que tener en estos pacientes, dado que es conocido que una corrección rápida puede ser riesgo para generar una Mielinolisis Pontina Central, tal como está descrito en un paciente con una historia de hiponatremia y AN¹². El uso de suero fisiológico al 0,9% que se utilizó posteriormente, con nuestra paciente, pudiera ser discutible dada la explicación fisiopatológica expuesta. Una vez vista por el equipo de endocrinología, este suero se suspendió.

Si bien está fuera del alcance de este trabajo, la densidad mineral ósea disminuida para la edad de la paciente (Z score -2,6), con seguridad en el contexto de la AN,

pudiera estar, además, relacionada con la hiponatremia, dado que ésta puede ser un factor de riesgo para desmineralización ósea y osteoporosis¹³.

Finalmente, cabe destacar que otras alteraciones electrolíticas que pueden ocurrir en contexto de AN son hipokalemia, hipomagnesemia, hipocalcemia e hipofosfemia. Algunas de estas, además, en el contexto de un síndrome de realimentación.

En resumen, presentamos el caso de una paciente con AN que cursó con hiponatremia de una gravedad no descrita en la literatura, y ejemplificamos con este caso que la adecuada historia clínica nos lleva a una correcta etiología de la hiponatremia y así, a un correcto tratamiento.

Referencias bibliográficas

1. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (American Psychiatric Publishing, 2013).
2. Miller KK, Grinspoon SK, Ciampa J, Hier J, Herzog D, et al. 2005. Medical findings in outpatients with anorexia nervosa. *Arch Intern Med* 5: 561-566.
3. Schorr M, Miller KK. 2017. The endocrine manifestations of anorexia nervosa: mechanisms and management. *Nature reviews endocrinology* 13: 174-186.
4. Winston AP. 2012. The clinical biochemistry of anorexia nervosa. *Ann Clin Biochem* 49: 132-143.
5. Stheneur C, Bergerow S, Lapeyraque AL. 2014. Renal complications in anorexia nervosa. *Eat Weight Disord* 19 (4): 455-460.
6. Rubin RT, O'Toole SM, Rhodes ME, Sekula LK, Czambel RK. 1999. Hypothalamo-pituitary-adrenal cortical responses to low-dose physostigmine and arginine vasopressin administration: sex differences between major depressives and matched control subjects. *Psychiatry Res* 89: 1-20.
7. Challier P, Cabrol S. 1995. Severe hyponatremia associated with anorexia nervosa: role of inappropriate antidiuretic hormone secretion? *Arch Pediatr* 2: 977-979.
8. Gold PW, Kaye W, Robertson GL, Ebert M. 1983. Abnormalities in plasma and cerebrospinal fluid arginine vasopressin in patients with anorexia nervosa. *N Engl J Med* 308: 1117-1123.
9. Palla B, Litt IF. Medical complications of eating disorders in adolescents. 1988. *Pediatrics* 81 (5): 613-623.
10. Bahia A, Chu E, Mehler P. 2011. Polydipsia and hyponatremia in a woman with anorexia nervosa. *Int J Eat Disord* 44: 186-188.
11. El Ghoch M, Calugi S, Dalle Grave R. 2016. Management of severe rhabdomyolysis and exercise associated hyponatremia in a female with anorexia nervosa and excessive compulsive exercising. *Case Reports in Medicine*; article ID 8194160.
12. Amann B, Schäfer M, Sterr A, Arnold S, Grunze H. 2001. Central pontine myelinolysis in a patient with anorexia nervosa. *Int J Eat Disord* 30: 462-466.
13. Levy-Shraga Y, David D, Vered I, Kochavi B, Stein D, et al. 2016. Hyponatremia and decreased bone density in adolescent inpatients diagnosed with anorexia nervosa. *Nutrition* 32 (10): 1097-1102.

Ética, Humanismo y Sociedad

Integrativo o nada

José Carlos Bermejo

Religioso Camilo. Director del Centro de Humanización de la Salud. Tres Cantos, Madrid, España.

Integrative or nothing

Este fue el comentario de uno de mis contertulios en la cena con la que nos juntábamos a celebrar las jornadas de *counselling* humanista: “*hoy todo tiene que ser integrativo*”, “*o integrativo o nada*”, “*antes era ecléctico, pero si dices esa palabra, estás anticuado*”. Quizás sea una cuestión de moda en relación a las palabras... Ayudar con un método ecléctico –como yo estudiaba en mi juventud– quería decir uniendo –sin fundamentalismos– valores, ideas, tendencias, etc., de sistemas diversos del mundo de la psicología.

Pero hoy preferimos hablar de *integrar*. De hecho, el *counselling* se sitúa dentro de las tendencias humanistas de la psicología llamadas de tercera generación. Se supera o se hace uso conveniente de aspectos del psicoanálisis, del conductismo, de tendencias más cognitivo-conductuales, gestálticas... sin pudor de juntar aspectos que añadan a la eficacia de la relación de ayuda. La denominación “tercera” fue acuñada por Hayes para agrupar perspectivas similares que surgieron casi simultáneamente en el campo de las terapias de conducta. Es “tercera”, en referencia a dos movimientos similares previos en los desarrollos terapéuticos conductuales que tuvieron lugar en el siglo XX.

El *counselling* o las psicoterapias integrativas son tendencias psicoterapéuticas recientes. El término integrativo se refiere tanto a la síntesis completa de la teoría y los métodos de la psicoterapia en lo afectivo, lo conductual, lo cognitivo y lo fisiológico como al resultado de la psicoterapia: la integración o la asimilación en el interior del cliente de los aspectos de la personalidad fragmentados.

Sea como fuere, dos “integraciones” me parecen particularmente relevantes en el desarrollo de quien desea formarse o aplicar el *counselling* en el alivio del sufrimiento ajeno o en el acompañamiento en el sufrimiento inevitable. Quiero decir, que eso de “integrar”... no es tan nuevo.

Integrar la sombra

No es propuesto por el exponente de la psicología positiva –Seligman– entre lo más reciente que podamos

encontrar en clave humanista. No. Era Jung, discípulo de Freud, quien proponía para ser la mejor versión de uno mismo... esta clave de la integración. En su caso: integrar la propia sombra.

En efecto, dice él, “lo que niegas te somete, lo que aceptas te transforma”. Carl Jung proponía que “cada uno de nosotros proyecta una sombra tanto más oscura y compacta, cuanto menos encarnada se halle en nuestra vida consciente. Esta sombra constituye, a todos los efectos, un impedimento inconsciente que malogra nuestras mejores intenciones”.

En la psicología de Carl Jung la sombra, fue definida como el lado oscuro de la personalidad. Está constituida por frustraciones, experiencias vergonzosas, dolorosas, temores, inseguridades, rencor, agresividad que se alojan en lo inconsciente del ser humano, formando un complejo, muchas veces, disociado de la consciencia. La sombra contiene lo negativo de nuestra personalidad que el individuo no siempre quiere conocer y mucho menos asumir como propias; por lo cual negándola, se frena la manifestación de nuestra auténtica forma de ser y de sentir.

“Uno no se ilumina imaginando figuras de luz” -dice Jung- “sino haciendo consciente la oscuridad, un procedimiento, no obstante, trabajoso y, por tanto, poco popular”.

Debido a la dificultad de reconocer y aceptar nuestra propia sombra, este mecanismo de proyección es una de las formas más recurrentes y negativas de no trabajar los propios defectos y adjudicar estos solo a los demás. Este es un fenómeno típico que, por ejemplo, se observa en gran parte a los comentarios por la espalda que ocurren dentro de cualquier vecindario o entre grupos pequeños de individuos.

Alejandro Jodorowsky (artista chileno sobre la proyección) dice: “Quien siembra proyecciones cosecha enfermedades”. Todo lo que no acepto de mí mismo, lo proyecto fuera. “Todo lo que criticamos del exterior es aquello que no nos gusta de nosotros mismos”.

Acercarnos a la sombra, conocerla y aceptarla, simplificará el camino a su integración, única posibilidad del bienestar. El peor rostro de la sombra, aparece cuando

la subestimamos, ninguneamos, negamos o expulsamos del consciente. El mismo Jung advierte que vivir consigo mismo requiere una serie de virtudes, entre las cuales están la humildad y la tolerancia que son, pues, aplicables a uno consigo mismo y después a los demás. La solución es siempre la integración. La lucha contra el propio espejo (la sombra) siempre refuerza a esta y hace perder.

Integrar la propia muerte

Integrar, algo más que juntar. De hecho, en el *counselling* que trabaje en espacios de final de vida o, en todo caso, en espacio de pérdidas y rupturas de vínculos significativos, se hace necesario evocar a la famosa Kübler-Ross. Ella fue quien planteó como requisito para ayudar a los enfermos al final de la vida la necesidad de afrontar la propia muerte, integrar la propia muerte. Lo expresa así: “Lo más importante es nuestra propia actitud y nuestra capacidad para afrontar la enfermedad mortal y la muerte. Si este es un gran problema en nuestra vida, y vemos la muerte como un tema tabú, aterrador y horrible, nunca podremos ayudar a un paciente a afrontarla con tranquilidad. (...) Si no podemos afrontar la muerte con ecuanimidad ¿cómo podremos ser útiles a nuestros pacientes? Damos rodeos y hablamos de trivialidades o del maravilloso tiempo que hace fuera”.

Este requisito viene dado por el hecho de que para quien se acerca al que sabe que debe morir en breve, la

muerte del enfermo prefigura la propia y supone hacer la experiencia del fracaso en lo que este tiene de más absoluto y definitivo. Una cosa es saber que se ha de morir y otra es estar en constante contacto con quien va muriendo y tener que reflexionar: “todo esto me sucederá algún día a mí”.

Pero, ¿qué significa integrar la propia muerte? Todo un mundo separa la idea de que ha de morir de la experiencia pensada de la propia muerte. Desde el momento en que yo me concibo, soy a la vez sujeto y objeto de mi pensamiento. Si “me concibo muerto”, solo el objeto habrá cambiado de apariencia mientras el sujeto será, por decirlo de algún modo, el mismo, vivo. Para ser más exactos habría que decir que me es imposible concebirme muerto. Al máximo puedo imaginarme tal. Pero mirándolo bien, la cosa es también más ilusoria. Lo que puedo imaginar es mi agonía o mi cadáver, que yo miro con la imaginación, pero no “el yo que ya no está”. Es una contradicción más bien desconcertante, a pesar de todo: sé que moriré; no puedo temer tal hecho como un hecho; pero no puede temerlo de ninguna manera como un no ser del “yo”.

Counselling integrativo, así lo presentan algunos. *Counselling humanista*, siguen diciendo otros. En todo caso, no solo se trata de integrar técnicas, enfoques... sino la propia fragilidad -sombra, muerte- de la persona que quiere ayudar de manera eficaz. Se trata, al fin y al cabo, de una armonía personal como requisito para ayudar, comparable a la de una orquesta, una sinfonía de notas y de personas habilidosas en diferentes instrumentos.

Comentarios de Literatura Destacada

Nonsuppressed glucagon after glucose challenge as a potential predictor for glucose tolerance

Róbert Wagner, Liisa H. Hakaste, Emma Ahlqvist, Martin Heni, Jürgen Machann, Fritz Schick, Emmanuel Van Obberghen, Norbert Stefan, Baptist Gallwitz, Tiinamaija Tuomi, Hans-Ulrich Häring, Leif Groop, and Andreas Fritsche.

Diabetes 2017; 66: 1373-1379

El glucagón es una hormona peptídica pequeña, de tan sólo 29 aminoácidos, producida y secretada por las células α pancreáticas en respuesta a la disminución de la glicemia. Su principal acción la ejerce en el hígado, donde induce la liberación de glucosa endógena a partir de la estimulación de la glicogenólisis y gluconeogénesis. Si bien es desde la década de 1970 que se postula que la desregulación de la secreción de glucagón participa de la patogénesis de la diabetes mellitus, no es sino hasta hace aproximadamente 15 años que el interés por esta hormona y su papel en la diabetes ha vuelto a captar la atención. Distintos estudios muestran que los individuos que padecen de diabetes presentan una serie de alteraciones en la regulación de la secreción de glucagón: aumento en la concentración de glucagón plasmático en ayunas, ausencia de supresión de la secreción de glucagón en respuesta a la glucosa y falla en la secreción de glucagón en respuesta a la hipoglicemia. Es en este contexto en el cual los autores de este estudio se plantearon evaluar si una disminución en la supresión de la secreción de glucagón se asocia con la intolerancia a la glucosa (IGT). Para esto realizaron un estudio de corte-transversal en el cual analizaron los datos de tres cohortes: Tübingen Family Study (TUEF, 602 individuos), Prevalence, Prediction and Prevention of Diabetes-Botnia Study (PPP-Botnia, 1.369 individuos) y Malmö Diet and Cancer Study (MDCS, 2.223 individuos). Los sujetos incluidos en este análisis no debían padecer de diabetes y en todos los casos la concentración plasmática de glucagón fue medida durante una OGTT en los tiempos 0, 30 y 120 min. Adicionalmente, en el caso del estudio TUEF los datos de glucagón se obtuvieron también a los 60 y 90 min. La cantidad de grasa hepática fue abordada en 148 individuos del estudio TUEF mediante espectroscopía con resonancia magnética (MRS) y 50 individuos de la misma cohorte fueron sometidos a una intervención que contempló la realización de actividad física moderada y modificación de la dieta durante nueve meses, luego de lo cual fueron reevaluados (estudio TULIP).

En concordancia con datos de literatura reportados previamente, los resultados de glucagón en ayunas indi-

caron que los individuos con glicemia elevada en ayunas (IFG) e IGT presentaban una concentración plasmática de glucagón elevada respecto de los individuos con tolerancia normal a la glucosa (NGT). Este resultado sólo viene a reforzar la hipótesis de que el defecto en la regulación de la secreción de glucagón aparece precozmente en los trastornos de la homeostasis de la glucosa y podría ser un factor importante en la aparición de diabetes.

En cuanto a la novedad de este estudio, ésta radica en el resultado observado respecto de la supresión de la secreción de glucagón en respuesta a la carga de glucosa. En primer lugar, la proporción de sujetos que no presentaron supresión de la secreción de glucagón a los 120 min fue de 21-34% dependiendo de la cohorte evaluada, lo que aparece como un valor elevado considerando que se ha postulado a la falta de supresión de la secreción de esta hormona como un fenómeno negativo asociado a la pérdida de la inhibición de la célula α en pacientes diabéticos. Además, este grupo de sujetos fue más esbelto, presentó mayor sensibilidad a la insulina y un menor riesgo de IGT (OR: 0,44-0,53, $P \leq 0,009$), el cual se mantuvo luego de realizados los ajustes por sexo, edad, IMC y concentración basal de glucagón. En esta misma línea, el incremento en la relación glucagón_{120/0} observada durante la intervención del estudio TULIP se asoció con un aumento en la insulino-sensibilidad de los sujetos.

Tomando en cuenta estos resultados, es interesante cuestionarse respecto de lo que se entiende como desregulación de la secreción de glucagón. Si bien hasta el momento se acepta que la falta de supresión de esta hormona en respuesta a la glucosa mantiene elevada la liberación de glucosa endógena y contribuye a la hiperglicemia postprandial, los autores de este trabajo plantean una alternativa distinta, en la cual la mantención de la concentración de esta hormona podría simplemente evitar una caída importante en la glicemia producto de la acción de la insulina en personas con mayor sensibilidad a esta última.

Cabe destacar, finalmente, que en el subgrupo de sujetos a los cuales se les evaluó la cantidad de grasa hepática mediante MRS, aquellos individuos que presentaron una menor supresión de la secreción de glucagón también presentaron menor cantidad de grasa. Las conclusiones que se pueden extraer de esto son limitadas debido al diseño del estudio, sin embargo, es un dato que vale la pena explorar considerando la importancia que tiene hoy en día el hígado graso no alcohólico.

Análisis estadístico

Sin desconocer la importancia e impacto señalado en el artículo, en orden a la predicción de la tolerancia a la glucosa, conviene mencionar lo desactualizado del método estadístico utilizado. Pues, fundamentalmente, la idea central del artículo es analizar la tendencia (evolución

Comentarios de Literatura Destacada

temporal) del glucagón en dos grupos de pacientes seguidos en el tiempo, y asociar esta tendencia con la tendencia (evolución temporal) de la glucosa e insulina. (Ver la Figura 1 del artículo).

Los autores comparan las respuestas temporales por grupo de comparación, mediante test de diferencia de medias o medianas en cada uno de los distintos tiempos, esta es una estrategia demasiado anticuada de análisis, pues considera sólo como fuente de variación el pertenecer o no al grupo de comparación, pero cuando se consideran tendencias (cada sujeto es medido en el tiempo y además pertenece o no a un determinado grupo) se agrega como fuente de variabilidad el tiempo, es decir, las respuestas medidas tiempo a tiempo no son independientes entre sí, que es el fundamento teórico del test t-Student o el test de Wilcoxon para muestras independientes.

La propuesta más eficiente y actual de análisis, es modelar las tendencias mediante una sofisticación de la ANOVA o ANCOVA estimada a través de Modelos Mixtos, estos deben su nombre a que consideran distintas fuentes de variabilidad debidas a efectos fijos y aleato-

rios, en el artículo los efectos fijos son los grupos y los tiempos. Mientras que los efectos aleatorios están dados por la evolución propia de cada sujeto. Es claro que los resultados que son inferibles se relacionan con los efectos fijos, pues se intenta contestar cuál es el efecto de suprimir el glucagón. Así las estimaciones de las respuestas, tal como se muestran en el artículo, necesariamente presentan una sobredispersión (errores de estimación más grandes que los verdaderos), estos errores habrían sido minimizados si se hubiesen controlado las dos fuentes de variabilidad detectadas.

Un modelo más real de análisis, para cualquiera de las tendencias analizadas, habría sido de la forma:

$Y = \beta_0 + \text{efecto grupo} + \text{efecto tiempo} + \text{Error debido al grupo} + \text{Error debido al sujeto}.$

Álvaro Pérez Bazán¹ y Gabriel Cavada Ch.²

¹Departamento de Nutrición, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

²Facultad de Medicina. Escuela de Salud Pública, Universidad de Chile.

Calendario Cursos y Congresos

Direcciones electrónicas de Sociedades Científicas

- **ETA** – European Thyroid Association
www.eurothyroid.com
- **LAST** – Latin America Thyroid Society
www.last.org
- **ATA** – American Thyroid Society
www.thyroid.com
- **AACE** – American Association of Clinical Endocrinologists
www.aace.com
- **The Endocrine Society**
www.endo-society.org
- **EAN M** – European Association of Nuclear Medicine
www.eanm.org
- **SAEM** – Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo
www.saem.org.ar
- **SNM** – Society of Nuclear Medicine
www.snm.org
- **AAES** – American Association of Endocrine Surgeons
www.endocrinesurgery.org
- **AHNS** – American Head and Neck Society
www.headandneckcancer.org

Alcance y política editorial

La Revista Chilena de Endocrinología y Diabetes publica trabajos originales sobre temas de Endocrinología y Diabetes clínica de adultos y niños y de Ciencias Básicas relacionadas a esas disciplinas.

En el primer número de cada año, y también en la página electrónica de SOCHED (www.soched.cl), se explicitan como Instrucciones a los Autores, los requisitos formales para acceder a la publicación de trabajos en la Revista.

Los trabajos que cumplan con los requisitos señalados, serán sometidos a revisión por pares expertos. La Revista cuenta con un Comité Editorial Asesor (nacional e internacional) cuya función es fomentar la Revista en medios regionales e internacionales. El proceso de revisión se realiza con dos expertos ajenos al Comité Editorial. Además, en caso de evaluaciones no concordantes, la Revista recurre a un tercer revisor como arbitraje.

Forma y preparación de manuscritos

Los trabajos enviados a la Revista Chilena de Endocrinología y Diabetes deberán cumplir cabalmente con las instrucciones que se detallan a continuación, que consideran la naturaleza de la Revista y los “Requisitos Uniformes para los Manuscritos Sometidos a Revistas Biomédicas”, establecidos por el International Committee of Medical Journal Editors, actualizados en octubre de 2008 y disponible en el sitio web: www.icmje.org

1. El trabajo debe ser escrito en papel tamaño carta (21,5 x 27,5 cm), dejando un margen de al menos 3 cm en los 4 bordes. Todas las páginas deben ser numeradas en el ángulo superior derecho, empezando por la página del título. El texto debe escribirse con espaciado a 1,5 líneas, con letra “Times New Roman”, tamaño de 12 puntos y justificado a la izquierda. Las Figuras que muestren imágenes (fotografías, radiografías, histología, etc.) deben adjuntarse en copias de buena calidad fotográfica (ver 3.10).

Al pie de la página del título debe indicarse el recuento de palabras, contadas desde el comienzo de la Introducción hasta el término de la Discusión, excluyendo las páginas del Título, Resumen, Agradecimientos, Referencias, Tablas y Figuras.

En este conteo los “Artículos de Investigación” no deben sobrepasar 2.500 palabras, y los “Artículos de Revisión” 3.500 palabras. Los “Casos Clínicos” no pueden extenderse más allá de 1.500 palabras, pudiendo incluir hasta 2 Tablas y Figuras y no más de 20 referencias. Las “Cartas al Editor” no deben exceder las 1.000 palabras, pudiendo incluir hasta 6 referencias y 1 Tabla o Figura.

El trabajo debe enviarse por vía electrónica a revendo-diab@soched.cl en archivos independientes manuscrito, tablas, figuras y guía de recomendaciones para los autores con sus respectivas firmas.

2. Los “Artículos de Investigación” deben estar constituidos por las secciones tituladas “Introducción”, “Sujetos y Métodos” o “Material y Métodos”, según corresponda, “Resultados” y “Discusión”. Otros tipos de artículos, como los “Casos Clínicos” y “Artículos de Revisión”, “Artículos Especiales”, “Comentarios”, “Cartas al Editor”, pueden estructurarse en otros formatos, los que deben ser aprobados por el Editor.

Todos los artículos deben incluir un resumen en español de no más de 300 palabras. Es optativo agregar el resumen en inglés.

3. Cada trabajo deberá respetar la siguiente secuencia:

3.1 Página del Título

La primera página del manuscrito debe contener:

- 1) Título del trabajo, que debe ser un enunciado conciso, pero informativo sobre lo medular del contenido de la publicación; no emplee abreviaturas y use mayúsculas sólo para el inicio de las palabras importantes. Agregue en renglón separado un título abreviado de no más de 90 caracteres (incluyendo espacios) que sintetice el título original y pueda ser usado como “cabeza de página”.
- 2) Identificación del o de los autores con su nombre y apellido paterno; la inicial del apellido materno queda al criterio del autor de incluirla o excluirla. Se recomienda que los autores escriban su nombre en un formato constante en todas sus publicaciones en revistas indexadas en el *Index Medicus* u otros índices, especialmente si se trata de apellidos compuestos; cada identificación de autor debe completarse con un número arábico en ubicación de “superíndice” al final del nombre.
- 3) Nombre del o los Departamentos, Servicios e Instituciones de pertenencia de dicho autor en el tiempo de la realización del trabajo; señale con letras minúsculas en superíndice a los autores que no sean médicos para identificar su título profesional, grado de doctorado en ciencias (PhD) o la calidad de alumno de una determinada escuela universitaria.
- 4) Nombre y dirección del autor con quien establecer correspondencia o a quien solicitar separatas. Debe incluir número de fax y correo electrónico.

Instrucciones a los autores

5) Origen del apoyo financiero, si lo hubo, en forma de subsidio de investigación (“grants”), equipos, drogas, o todos ellos. Debe mencionarse toda ayuda financiera recibida, especificando si la organización que la proporcionó tuvo o no influencia en el diseño del estudio, en la recolección, análisis o interpretación de los datos y en la preparación, revisión o aprobación del manuscrito. Los autores deberán adjuntar el formulario uniforme para declaración de conflictos de intereses elaborado por el International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) y actualizado el 2010. Una versión en español del formulario se puede obtener en el sitio web www.soched.cl

Al pie de página del título coloque el recuento computacional de palabras, según lo explicitado en el acápite 1.

Cada una de las secciones siguientes (3.2 a 3.8) debe iniciarse en páginas nuevas.

3.2 Resumen

La segunda página debe contener un resumen que no sobrepase 300 palabras, y que describa los propósitos del estudio, los sujetos o el material, los métodos empleados y los resultados y conclusiones más importantes. Se recomienda utilizar el modelo de resumen «estructurado». No emplee abreviaturas que no estén estandarizadas. Al final de este instructivo se listan las abreviaciones más corrientes aceptadas por la Revista Chilena de Endocrinología y Diabetes.

Es recomendable que los autores proporcionen una traducción al inglés del resumen, que incluya el título del trabajo; para quienes no estén en condiciones de hacerlo, la Revista efectuará dicha traducción. Los Editores podrán modificar la redacción del resumen entregado si estiman que ello beneficiará la comprensión y difusión del trabajo, pero solicitarán su aprobación a los autores. Los autores deben seleccionar 3 a 5 «palabras clave» en inglés y español, las cuales deben ser elegidas desde la lista del *Index Medicus* (Medical Subjects Headings), accesible en www.nlm.nih.gov/mesh/. Las cartas al editor no requieren resumen.

3.3 Introducción

Describa la razón que motivó la ejecución del estudio y exprese claramente su propósito. Cuando sea pertinente, haga explícita la hipótesis cuya validez pretendió analizar. Revise el tema en lo esencial y cite sólo las referencias bibliográficas que sean estrictamente atingentes y relacionadas a su propio estudio.

3.4 Sujetos y Material y Métodos

Describa el carácter de lo estudiado: personas, animales de experimentación, órganos, tejidos, células, etc., y sus respectivos controles. Identifique los métodos, instrumen-

tal y procedimientos empleados, con la precisión adecuada para permitir que otros investigadores puedan reproducir sus resultados. Si se emplearon métodos establecidos y de uso frecuente (incluye métodos estadísticos), límitese a nombrarlos y citarlos en las referencias respectivas.

Cuando los métodos han sido publicados, pero no son ampliamente conocidos, proporcione las referencias y agregue una breve descripción de ellos. Si son nuevos o introdujo modificaciones a métodos establecidos, descríbalas con precisión, justifique su empleo y enuncie sus limitaciones.

Cuando se han efectuado experimentos en seres humanos, explicito si los procedimientos respetaron normas éticas concordantes con la Declaración de Helsinki (actualizada en 2008) y si fueron revisados y aprobados por un Comité de Ética de la institución en que se efectuó el estudio, debiendo adjuntar el documento de aprobación respectivo. Los estudios que incluyan animales de experimentación deben incorporar el documento de aprobación por el comité institucional respectivo.

Señale los fármacos y compuestos químicos empleados, con su nombre genérico, dosis y vías de administración. Identifique a los pacientes mediante números correlativos y no use sus iniciales ni los números de sus fichas clínicas.

Indique siempre el número de pacientes o de observaciones, los métodos estadísticos empleados y el nivel de significación elegido previamente para evaluar los resultados.

3.5 Resultados

Presente sus resultados siguiendo una secuencia lógica que facilite su comprensión en el texto y en las Tablas y Figuras. Los datos que no están incorporados en el texto pueden mostrarse en Tablas o Figuras, pero no en ambas a la vez.

En el texto, destaque las observaciones importantes, sin repetir los datos que se presentan en las Tablas o Figuras. No mezcle la presentación de los resultados con la discusión de su significado, la cual debe incluirse en la sección de Discusión, propiamente tal.

3.6 Discusión

Debe atenerse al análisis crítico de los resultados obtenidos en este trabajo y no transformarlo en revisión general del tema. Discuta únicamente los aspectos nuevos e importantes que aporta su trabajo y las conclusiones que se proponen a partir de ellos. No repita en detalle datos que aparecen en «Resultados». Haga explícitas las concordancias o discordancias de sus hallazgos y señale sus limitaciones, comparándolas con otros estudios relevantes, identificados mediante las citas bibliográficas respectivas.

Relacione sus conclusiones con los propósitos del estudio según lo que señaló en la «Introducción». Evite formular conclusiones que no estén respaldadas por sus hallazgos, así como apoyarse en otros trabajos aún no terminados. Plantee nuevas hipótesis cuando le parezca adecuado, pero califíquelas claramente como tales. Cuando sea apropiado, proponga sus recomendaciones.

3.7 Agradecimientos

Expresé su agradecimiento sólo a personas e instituciones que hicieron contribuciones substantivas a su trabajo. Los autores son responsables por la mención de personas o instituciones a quienes los lectores podrían atribuir un apoyo o relación con los resultados del trabajo y sus conclusiones.

3.8 Referencias

Acote el número de referencias bibliográficas, idealmente a 40. Prefiera las que correspondan a trabajos originales publicados en revistas incluidas en el *Index Medicus*, *National Library of Medicine*, *USA*. Numere las referencias en el orden en que se las menciona por primera vez en el texto. Identifíquelas mediante numerales arábigos, colocados (como “superíndice”) al final de la frase o párrafo en que se las alude. Las referencias que sean citadas únicamente en las Tablas o en las leyendas de las Figuras, deben numerarse en la secuencia que corresponda a la primera vez que dichas Tablas o Figuras sean citadas en el texto.

Cuando la cita incluye dos referencias seguidas, los números que las identifican se separan por una coma; si son más de dos, también seguidas, se indica la primera y la última de la secuencia separadas con un guión.

Los resúmenes de presentaciones a congresos pueden ser citados como referencias sólo cuando hayan sido publicados en revistas de circulación amplia. Si se publicaron en “Libros de Resúmenes”, pueden mencionarse en el texto, entre paréntesis, al final del párrafo correspondiente.

Se pueden incluir como referencias trabajos que estén aceptados por una revista, aunque no publicados; en este caso, se debe anotar la referencia completa, agregando a continuación del nombre abreviado de la revista con la expresión “en prensa” o “aceptado para publicación”, según corresponda. Los trabajos enviados a publicación, pero todavía no aceptados oficialmente, pueden ser citados en el texto (entre paréntesis) como “observaciones no publicadas” o “sometidas a publicación”, pero no deben incorporarse entre las referencias.

Al listar las referencias, su formato debe ser el siguiente:

- a) Para Artículos en Revistas. Empezar con el apellido e inicial del nombre del o los autores (la inclusión del apellido materno es variable), con la primera letra de cada palabra

en mayúscula; no coloque punto después de cada letra de abreviación del nombre y apellido materno.

Mencione todos los autores cuando sean seis o menos; si son siete o más, incluya los seis primeros y agregue «*et al.*». Limite la puntuación a comas que separen los autores entre sí. Luego de los nombres sigue el título completo del artículo, en su idioma original, el nombre de la revista en que apareció, abreviado según el estilo usado por el *Index Medicus*: año de publicación con el volumen de la revista y luego los números de la página inicial y final del artículo. Ejemplo: 11. Lam JE, Maragaño PL, Lépez BQ y Vásquez LN. Miocardiopatía hipocalcémica secundaria a hipoparatiroidismo posttiroidectomía. Caso clínico. *Rev Med Chile* 2007; 135: 359-364.

- b) Para Capítulos de Libros.

Ejemplo: 12. Rodríguez JP. Hipocalcemia. En: Rodríguez JP, ed. *Manual de Endocrinología*. Santiago, Editorial Mediterráneo 1994, p. 199-202.

- c) Para artículos en formato electrónico: citar autores, título del artículo y revista de origen tal como si fuera para su publicación en papel, indicando a continuación el sitio electrónico donde se obtuvo la cita y la fecha en que se hizo la consulta. Ej.: *Rev Med Chile* 2007; 135: 317-325. Disponible en: www.scielo.cl [consultado el 14 de mayo de 2009].

Para otros tipos de publicaciones, aténgase a los ejemplos dados en los “Requisitos Uniformes para los Manuscritos Sometidos a Revistas Biomédicas” del ICMJE.

Los autores son responsables de la exactitud de sus referencias.

3.9 Tablas

Presente cada tabla impresa en hojas aisladas, separando sus contenidos con doble espacio (1,5 líneas) y no envíe fotografías de ellas. Numérelas con números arábigos en orden consecutivo y coloque un título breve para cada tabla que sea explicativo de su contenido. (Título de la Tabla). Como cabeza de cada columna ponga una descripción sintética. Separe con líneas horizontales solamente los encabezamientos de las columnas y los títulos generales; en cambio, las columnas de datos deben separarse por espacios y no por líneas verticales. Cuando se requieran notas aclaratorias, agréguelas al pie de la tabla y no en el encabezamiento. Use notas aclaratorias al pie de la tabla para todas las abreviaturas no estandarizadas que figuran en ella. Cite cada tabla en orden consecutivo de aparición en el texto del trabajo.

3.10 Figuras

Considere figura a cualquier tipo de ilustración diferente a una tabla. Tenga presente que uno de los principales pa-

Instrucciones a los autores

rámetros de calidad de imagen utilizados para impresión es la concentración de puntos por unidad de superficie impresa, o resolución. Este parámetro se mide en puntos por pulgada (sigla inglesa dpi). A mayor concentración de estos puntos, mayor detalle en la impresión de la figura.

Los gráficos e imágenes entregados en MS Word, Power Point, Excel o WordPerfect son inadecuadas por su baja resolución (72 dpi). La excepción son los gráficos construidos en arte lineal. Tome en cuenta que las figuras con baja resolución se visualizan correctamente en un computador, pero no así al ser impresas sobre papel. En este último caso, la resolución debe situarse entre 150 y 300 dpi.

Los gráficos creados en arte lineal son clásicamente los de barra, los de torta y los de línea. Evite el uso de gris, “degradé” o de colores para el relleno de estos gráficos. Alternativamente, utilice barras o sectores en negro sólido, blanco sólido o texturizados. Los gráficos de línea deben diferenciar sus series con figuras geométricas como círculos, cuadrados, asteriscos o rombos. Las líneas deben ser negras y sólidas.

Las fotocopias son inadecuadas por su baja calidad. Las impresiones hechas en impresoras de matriz de punto no sirven ya que al ser “escaneadas” aparecen patrones y tramas visualmente confusas. Usar impresora láser sobre papel fotográfico.

El material “escaneado” debe ser de 150 dpi para figuras en escalas de grises, 300 dpi para figuras a color y 1.200 dpi para figuras en arte lineal. Si la figura de arte lineal ha sido creada en el computador, entonces se debe mantener sólo a 72 dpi. Todas las figuras escaneadas deben ser entregadas en un procesador de texto en archivos apartes, en formato tiff.

Las imágenes obtenidas de internet son inadecuadas, ya que son de 72 dpi. Si ésta es la única forma de obtenerlas, adjuntar la dirección de la página para que la Revista solucione el problema. Al usar cámaras digitales, se recomienda al menos una cámara de 5 megapíxeles de resolución.

Presente los títulos y leyendas de las Figuras en una página separada, para ser compuestas por la imprenta. Identifique y explique todo símbolo, flecha, número o letra que haya empleado para señalar alguna parte de las ilustraciones. En la reproducción de preparaciones microscópicas, explicita la ampliación usada y los métodos de tinción empleados.

Cite en orden consecutivo cada Figura según aparece en el texto. Si una Figura presenta material ya publicado, indique su fuente de origen y obtenga permiso escrito del autor y del editor original para reproducirla en su trabajo.

Las fotografías de pacientes deben cubrir parte de su rostro para proteger su anonimato, y debe cuidarse que en los documentos clínicos presentados (radiografías, etc.) se haya borrado su nombre.

La publicación de Figuras en colores debe ser consultada con la Revista; su costo es fijado por los impresores y deberá ser financiado por los autores.

3.11 Unidades de medida

Use unidades correspondientes al sistema métrico decimal. Las cifras de miles se separaran con un punto, y los decimales con una coma. Las abreviaturas o símbolos que se emplean con mayor frecuencia, aparecen listadas al final de este instructivo.

4. Separatas

Las separatas deben ser solicitadas por escrito a la Revista, después de recibir la comunicación oficial de aceptación del trabajo. Su costo debe ser cancelado por el autor.

5. Guía de exigencias para los trabajos y Declaración de responsabilidad de autoría

Ambos documentos deben ser entregados junto con el trabajo, cualquiera sea su naturaleza: artículo de investigación, caso clínico, artículo de revisión, carta al editor, u otra, proporcionando los datos solicitados y la identificación y firmas de todos los autores. En la Revista se publican facsímiles para este propósito (primer número del año), pudiendo agregarse fotocopias si fuera necesario por el gran número de autores. Cuando la revisión editorial exija una nueva versión del trabajo, que implique cambios sustantivos del mismo, los Editores podrán solicitar que los autores renueven la Declaración de Responsabilidad de Autoría para indicar su acuerdo con la nueva versión a publicar.

6. Declaración de Potenciales Conflictos de Intereses

Todos y cada uno de los autores de manuscritos presentados a la Revista Chilena de Endocrinología y Diabetes deben llenar el formulario “Updated ICMJE Conflict of Interest Reporting Form” disponible en la página Web www.icmje.org, cuya versión en español se puede obtener en www.soched.cl. El formulario, en formato PDF, puede ser transferido a la computadora personal del autor (para lo cual se requiere una versión 8.0 del programa Adobe Reader. Una vez completados los datos que se solicitan, cada Declaración debe adjuntarse al manuscrito en su formato impreso. El editor decidirá si procede poner estas declaraciones en conocimiento de los revisores externos.

Guía de exigencias para los manuscritos

EL AUTOR RESPONSABLE DEBE MARCAR SU CONFORMIDAD APROBATORIA EN CADA CASILLERO. TODOS Y CADA UNO DE LOS AUTORES DEBEN IDENTIFICARSE Y FIRMAR EL DOCUMENTO. AMBOS DOCUMENTOS DEBEN SER ENVIADOS JUNTO CON EL MANUSCRITO

1. Este trabajo (o partes importantes de él) es inédito y no se enviará a otras revistas mientras se espera la decisión de los editores de la Revista Chilena de Endocrinología y Diabetes.
2. El texto está escrito usando espacios de 1,5 pts., letra Time New Roman, tamaño 12, en hojas tamaño carta, numeradas secuencialmente.
3. El Título del trabajo se presenta en idioma castellano e inglés.
4. Los autores son presentados por su nombre, apellido paterno y en algunos casos inicial del apellido materno. El autor responsable ha sido identificado, incluyendo teléfono, fax y dirección electrónica.
5. Se explicita el lugar de pertenencia de cada uno de los autores al tiempo en que se realizó el trabajo.
6. Se explicita la presencia o ausencia de situaciones que signifiquen conflicto de intereses. Si las hay se explican las razones involucradas.
7. Se explica la o las fuentes de financiamiento del trabajo.
8. Se ha respetado el límite máximo de palabras permitido por esta Revista: 2.500 palabras para los “Artículos de Investigación”; 1.500 palabras para los “Casos Clínicos”; 3.500 palabras para los “Artículos de Revisión”, 1.000 palabras para “Cartas al Editor”.
9. Se ha respetado el uso correcto de abreviaturas.
10. Se han seleccionado de 3 a 5 palabras claves en español e inglés.
11. a) Incluye un Resumen de hasta 300 palabras, en castellano.
b) Incluye traducción al inglés del Resumen (opcional).
12. Las citas bibliográficas, libros, revistas o información electrónica, se presentan de acuerdo al formato exigido por la Revista Chilena de Endocrinología y Diabetes, el cual se explicita en las Instrucciones a los Autores.
13. Las referencias incluyen sólo material publicado en revistas de circulación amplia, o en libros. Estas referencias no incluyen trabajos presentados en congresos u otras reuniones científicas, publicados bajo la forma de libros de resúmenes.
14. a) Si este estudio comprometió a seres humanos o animales de experimentación, en “Sujetos y Métodos” se deja explícito que se cumplieron las normas éticas exigidas.
b) Se adjunta el certificado del Comité de Ética institucional que aprobó la ejecución del protocolo.
15. La escritura del trabajo fue organizada de acuerdo a las “Instrucciones a los Autores”.
16. Las Tablas y Figuras se prepararon considerando la cantidad de datos que contienen y el tamaño de letra que resultará después de la necesaria reducción en imprenta.
17. Si se reproducen Tablas o Figuras tomadas de otras publicaciones, se adjunta autorización escrita de sus autores o de los dueños de derechos de publicación, según corresponda.
18. Las fotografías de pacientes y las Figuras (radiografías, etc.) respetan el anonimato de las personas involucradas en ellas. Se adjunta el consentimiento informado de los pacientes o de su representante legal, para la publicación de fotografías que incluyan la cara.
19. Se indican números telefónicos, de fax y el correo electrónico del autor que mantendrá contacto con la Revista.

Nombre completo y firma del autor que se relacionará con la revista:

Teléfono: _____ Fax: _____ E-mail: _____

Declaración de la responsabilidad de autoría

El siguiente documento debe ser completado por todos los autores del manuscrito. Si es insuficiente el espacio para las firmas de todos los autores, agregar fotocopias de esta página.

TÍTULO DEL MANUSCRITO _____

DECLARACIÓN: Certifico que he contribuido directamente al contenido intelectual de este manuscrito, a la génesis y análisis de sus datos, por lo cual estoy en condiciones de hacerme públicamente responsable de él y acepto que mi nombre figure en la lista de autores.

En la columna “Códigos de Participación” he anotado personalmente todas las letras de códigos que identifican mi participación en este trabajo, según la Tabla siguiente:

Tabla: Códigos de Participación

- a. Concepción y diseño del trabajo.
- b. Aporte de pacientes o material de estudio.
- c. Recolección y/o obtención de resultados.
- d. Obtención de financiamiento.
- e. Análisis e interpretación de los datos.
- f. Asesoría estadística.
- g. Redacción del manuscrito.
- h. Asesoría técnica o administrativa.
- i. Revisión crítica del manuscrito.
- j. Otras contribuciones (explicitar).
- k. Aprobación de la versión final.

Nombre y firma de cada autor

Códigos de Participación

_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Envío de manuscritos:

Los trabajos deben enviarse por vía electrónica a revendodiab@soched.cl

Revista Chilena de Endocrinología y Diabetes

La lista siguiente señala las abreviaturas o siglas más usadas internacionalmente que identifican unidades de medida, procedimientos, instituciones, etc. Estas abreviaturas o siglas se deben usar en el texto, tablas y figuras de los manuscritos enviados para su publicación en la revista. En los títulos y en la primera aparición en el resumen use la denominación completa y no su abreviación.

Término	Abreviatura o Sigla	Término	Abreviatura o Sigla
Ácido desoxi-ribonucleico	DNA	Hora	h
Ácido ribonucleico	RNA	Hormona Antidiurética	ADH
Ácido 5-hidroxi-indol-acético	5-HIAA	Hormona de Crecimiento, Somatotropina	HC
Actividad de renina plasmática	PRA	Hormona Estimulante de Melanocitos	MSH
Adenosina 5' monofosfato, bifosfato, trifosfato	AMP, ADP, ATP	Hormona Foliculo Estimulante	FSH
Adrenocorticotropina	ACTH	Hormona Liberadora de ACTH	CRH
Adrenalina, Epinefrina	E	Hormona Liberadora de Gonadotropinas	GnRH, LHRH
Análisis de Varianza	ANOVA	Hormona Liberadora de TSH	TRH
Anticuerpos	Ac	Hormona Luteinizante	LH
Anticuerpos anti peroxidasa	Ac TPO	Hormona Paratiroidea	PTH
Antígeno carcino-embriionario	CEA	Hormona Liberadora de GH	GHRH
Calcitonina	CT	Immunoglobulina	Ig
Centi- (prefijo)	c	Interferón	IFN
Centímetro	cm	Interleukina	IL
Concentración de renina plasmática	PRC	Intramuscular	im
Cortisol	F	Intravenoso	iv
Corticosterona	B	Kilo- (prefijo)	k
Cromatografía líquida de alta resolución	HPLC	Kilogramo	kg
Cuentas por minuto	cpm	Litro	l
Cuentas por segundo	cps	Metro	m
Curie	Ci	Micro- (prefijo)	μ
Deci- (prefijo)	d	Mili- (prefijo)	m
Dehidro Testosterona	DHT	Milímetro cúbico	mm ³
Deoxicorticosterona	DOC	Minuto	min
Desintegraciones por minuto	dpm	Molar	M
Desintegraciones por segundo	dps	Mole	mol
Desviación Estándar	DS	Nano- (prefijo)	n
Día	d	No Significativo (término estadístico)	NS
Dopamina, Dihidroxi-fenilalanina	DOPA	Noradrenalina, Norepinefrina	NE
Ensayo inmuno enzimático en fase sólida	ELISA	Número de observaciones (término estadístico)	n
Equivalente	Eq	Osmol	osmol
Error Estándar	SE	Osteocalcina	OC
Error Estándar de la Media	SEM	PCR por transcripción reversa	RT-PCR
Estradiol	E2	Péptido Relacionado a PTH	PTHrP
Estriol	E3	Pico- (prefijo)	p
Estrona	E1	Probabilidad (término estadístico)	p
Factor de Crecimiento Símil a Insulina	IGF	Progesterona	P
Factor de Transformación de Crecimiento	TGF	Prolactina	Prl
Factor de Necrosis Tumoral	TNF	Promedio (término estadístico)	\bar{x}
Fosfatasa ácida	F Ac	Radioinmunoanálisis	RIA
Fosfatasa alcalina	F Al	Reacción de polimerasa en cadena	PCR
Globulina Transportadora de Corticosteroides	CBG	Revoluciones por minuto	rpm
Globulina Transportadora de Hormonas Sexuales	SHBG	Recién nacido	RN
Globulina Transportadora de Hormonas Tiroideas	TBG	Resonancia Magnética	RM
Grado Celsius	°C	RNA de Ribosomas	rRNA
Gramo	g	RNA Mensajero	mRNA

Abreviaturas

Término	Abreviatura o Sigla	Término	Abreviatura o Sigla
Segundo	s	Virus de Inmunodeficiencia Humana	VIH
Semana	sem	Vitamina D2, Ergocalciferol	Vit D2
Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida	SIDA	Vitamina D3, Colecalciferol	Vit D3
Sistema Nervioso Central	SNC	1,25-dihidroxi-vitamina D2,	1,25 (OH)2 D2
Somatostatina	SS	1,25-dihidroxi-ergocalciferol	1,25 (OH)2 D2
Subcutáneo	sc	1,25-dihidroxi-vitamina D3,	1,25 (OH)2 D3
Sulfato de Dehidro Epi Androsterona	DHEA-S	1,25-dihidroxi-colecalciferol	1,25 (OH)2 D3
Testosterona	T	3,5,3'-triyodotironina	T3
Tiroglobulina	Tg	3,3,5'-triyodotironina, T3 reversa	rT3
Tirotropina	TSH	3',5'-adenosina monofosfato cíclico	cAMP
Tiroxina	T4	17-hidroxi progesterona	17OHP
Tiroxina Libre	T4L	25-hidroxi-vitamina D2	25OHD2
Tomografía Axial Computarizada	TAC	25-hidroxi-ergocalciferol	25OHD2
Tuberculosis	TBC	25-hidroxi-vitamina D3	25OHD3
Ultravioleta	UV	25-hidroxi-colecalciferol	25OHD3
Unidad Internacional	IU	24,25-dihidroxi-vitamina D3	24,25 (OH)2 D3
Valor Normal o de referencia	VN	24,25-dihidroxi-colecalciferol	24,25 (OH)2 D3
Velocidad de Sedimentación Eritrocítica	VHS		
Versus	vs		

Abreviaturas de Instituciones

American Diabetes Association	ADA
Food and Drug Administration (EE. UU.)	FDA
Instituto de Salud Pública (Chile)	ISP
Ministerio de Salud (Chile)	MINSAL
Nacional Institute of Health (EE. UU.)	NIH
Organización Mundial de la Salud	OMS
Organización Panamericana de la Salud	OPS
Sociedad Chilena de Endocrinología y Diabetes	SOCHED

Nótese que a ninguna abreviatura o sigla se le agrega "s" para indicar plural.