



Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
University of Oviedo

# Cambios en el perfil de expresión de ARN y microARN circulantes en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 1



Laboratorio de Endocrinología, Nutrición, Diabetes y Obesidad (ENDO) del  
Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA)

Ana Victoria García Gómez

2022/2023

Junio



## Abreviaturas:

**ACP:** Células presentadoras de antígenos (siglas en inglés)

**ADNc:** ADN complementario

**CTLA-4:** Antígeno 4 de los linfocitos T citotóxicos

**CV:** Coeficiente de variación de glucosa

**DM:** Diabetes mellitus tipo 1 (**DM1**), tipo 2 (**DM2**), gestacional (**DMG**)

**HLA:** Antígeno leucocitario humano

**HbA1c:** Hemoglobina glicosilada

**IL-6:** Interleuquina 6; **IL-1 $\beta$** : Interleuquina 1 $\beta$

**ISCI:** Bombas de infusión subcutánea continua de insulina

**miARN:** MicroARN

**NGS:** Secuenciación masiva de nueva generación (siglas del inglés)

**OGTT:** Prueba oral de tolerancia a la glucosa

**PBL:** Linfocitos de sangre periférica (siglas en inglés)

**PCR:** Proteína C reactiva

**RISC:** complejo silenciador inducido por ARN (siglas en inglés)

**RT-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (siglas en inglés)

**TIR:** Tiempo en Rango

**TNF- $\alpha$** : Factor de crecimiento tumoral alfa

**VEGF:** factor de crecimiento del endotelio vascular (siglas en inglés)

**VG:** Variabilidad glucémica



## **Resumen:**

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) es una enfermedad metabólica autoinmune caracterizada por la destrucción de las células  $\beta$ -pancreáticas, produciendo un fallo en la secreción de insulina y, haciendo que los pacientes dependan de una aportación exógena de esta. Existen diferentes factores que pueden afectar al desarrollo de las enfermedades, entre ellos se encuentran los cambios epigenéticos, en concreto los miARNs, que pueden influir en el desarrollo y evolución de la DM1 y sus complicaciones. Desde un punto de vista terapéutico, en los últimos años se han producido importantes avances, destacando el desarrollo de sistemas de asa cerrada híbridos que permiten medir la glucosa de forma continua y, mediante la aplicación de un algoritmo, administrar automáticamente al paciente la cantidad de insulina necesaria. Con todo esto, en este estudio se pretende **identificar aquellos miARNs que podrían servir como biomarcadores pronósticos en el desarrollo de complicaciones asociadas en pacientes con DM1. Paralelamente, estudiar los cambios en el perfil glucémico e inflamatorio de aquellos pacientes que están empleando los sistemas de asa cerrada.** Para llevarlo a cabo, se validaron por RT-PCR 4 miARNs previamente identificados mediante secuenciación masiva de nueva generación. Por otro lado, en aquellos pacientes que utilizaban sistemas de asa cerrada híbrido, se analizaron, mediante herramientas estadísticas, los cambios en el control glucémico, así como el cambio en perfil inflamatorio mediante RT-PCR. Los resultados obtenidos muestran diferencias en la expresión del hsa-miR-1-3p, aumentado en DM1 respecto a los controles. Con respecto a los pacientes con sistemas de asa cerrada, se observa una mejoría muy rápida en los parámetros glucométricos, sin embargo, los resultados asociados a inflamación no muestran diferencias, siendo necesario llevar a cabo una validación con una cohorte mayor. Como conclusión, el hsa-miR-1-3p podría ser empleado como biomarcador pronóstico del desarrollo de complicaciones en pacientes con DM1.

## **Abstract:**

*Type 1 diabetes mellitus (DM1) is a metabolic autoimmune disease characterised by a destruction of the pancreatic  $\beta$ -cells, producing a defect of insulin secretion, which makes patients dependent on an exogenous supply of insulin. Nowadays, there are different factors that can influence the progression of diseases, such as epigenetic changes, like miRNAs, that can affect the development of DM1 and its complications. From a therapeutic point of view, in the last years there have been important advances, highlighting the development of closed loop systems that allow continuous glucose measurement, and by applying an algorithm, provide the required amount of insulin to the patient. Therefore, the aim of this study is to **identify which miRNAs could be used as biomarkers in the prognosis of the development of associated complications to DM1. Simultaneously, to study the changes in glycaemic and inflammatory profile of patients who are using closed loop systems.** To carry it on, 4 miRNAs previously identified by next generation sequencing, were validated by RT-PCR. On the other side, in those patients who have the closed loop system, the glycaemic control parameters were analysed by using statistical tools, while their inflammatory profile analysis was done by RT-PCR. The results obtained show differences in hsa-miR-1-3p expression, being up-regulated in DM1 compared to controls. In case of patients who have the closed loop system it could be seen a fast improvement in glycaemic parameters after implantation of those systems. However, there were not significant results related to inflammation, therefore it is necessary to carry on a validation with a bigger cohort. To conclude, hsa-miR-1-3p could be used as a biomarker in the prognosis of the development of complications in patients with DM1.*



## Índice

1. Introducción.....	1
1.1 Diabetes.....	1
1.1.1 Diabetes tipo 1.....	2
1.1.2 Fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 1.....	5
1.1.3 Nuevas tecnologías de manejo de diabetes mellitus tipo 1.....	6
1.2 Marcadores relacionados con la diabetes tipo 1.....	9
1.2.1 Perfil de inflamación.....	10
1.2.2 Micro ARNs.....	12
Antecedentes.....	14
2. Objetivos.....	15
3. Material y métodos.....	16
a. Estudio de los miARN circulantes en pacientes con DM1 establecida	16
b. Efecto de la implantación de un sistema de infusión continua de glucosa híbrido en el perfil glucémico e inflamatorio de pacientes con DM1. ....	21
4. Resultados.....	24
Perfil diferencial de miARN en personas con DM1 establecida.....	24
Efecto de la implantación de un sistema de asa cerrada en pacientes con DM1 establecida.....	26
5. Discusión.....	31
6. Conclusión.....	34
7. Bibliografía.....	35

## 1. Introducción

### 1.1 Diabetes

El término diabetes hace referencia a un conjunto de enfermedades metabólicas caracterizadas principalmente por un estado de hiperglucemia, como resultado del fallo en la secreción y/o acción de la insulina (American Diabetes Association, 2013).

La diabetes es un problema grave, reconocido mundialmente, cuyas cifras se han incrementado significativamente en los últimos años, pasando de cifras de 108 millones en 1980 a 422 millones en 2014, y siendo la causa de muerte de 2 millones de personas en 2019 (WHO, 2019).

En 2021, a nivel europeo se estimaba que 61 millones de personas entre 20 y 79 años padecían diabetes, lo que supone que, 1 de cada 11 adultos viven con la enfermedad (**Figura 1**). Sin embargo, es importante destacar que 1 de cada 3 personas no está diagnosticada, lo que corresponde con un 36% de la población europea sin diagnosticar, por lo que esas cifras de incidencia son aún mayores. España es el segundo país con mayor incidencia después de Turquía, con una prevalencia del 14,8 % de personas entre 20 y 79 años, suponiendo un coste de aproximadamente 2.723,44 € por persona/año (*International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 10th Edn., 2021*).

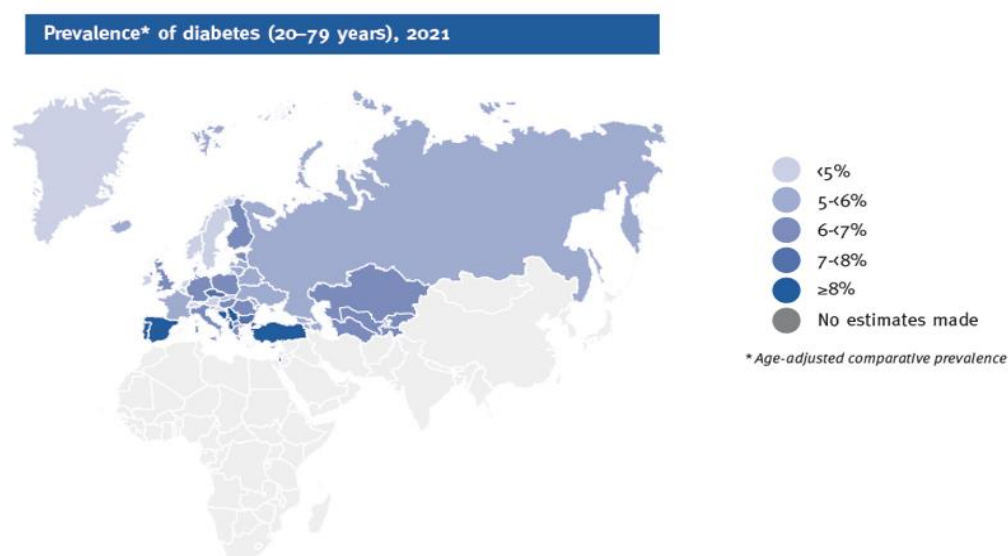


Figura 1: Prevalencia de la diabetes a nivel europeo en personas entre 20-79 años en 2021.  
Figura adaptada de International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 10th Edn., 2021.

Se pueden distinguir tres variantes de la enfermedad:

- **Diabetes mellitus tipo 1 (DM1):** Se trata de una enfermedad de tipo autoinmune, caracterizada por una destrucción progresiva de las células  $\beta$  pancreáticas, causando deficiencia absoluta en la secreción de insulina, lo que conlleva una dependencia fisiológica de insulina exógena (Chiang et al., 2014).
- **Diabetes mellitus tipo 2 (DM2):** Se basa en la resistencia a la acción de la insulina, lo que va a conducir con el tiempo un fallo pancreático (American Diabetes Association, 2015).
- **Diabetes mellitus gestacional (DMG)** aquella alteración de la tolerancia a la glucosa que se diagnostica durante el embarazo, generalmente en el segundo o tercer trimestre y desaparece tras el parto. El 50 % de las mujeres que han padecido esta enfermedad durante el embarazo van a desarrollar algún tipo de intolerancia a la glucosa a los 15 años (Ares Blanco et al., 2023).

El hecho de padecer alguno de los tipos de diabetes puede implicar el desarrollo de complicaciones a largo plazo, destacando las enfermedades cardiovasculares y la retinopatía diabética como dos de las complicaciones más habituales en las personas con diabetes. Estas complicaciones están ligadas principalmente a no cumplir los objetivos de control glucémico, lo que va a condicionar la esperanza de vida del paciente (American Diabetes Association, 2013).

### 1.1.1 Diabetes tipo 1

La DM1, también conocida como diabetes autoinmune, o diabetes de inicio juvenil, corresponde a un 5-10 % de los casos totales de diabetes, es en Europa donde mayor número de niños y adolescentes la padecen, con un total de 295.000 casos (Li et al., 2017). El grupo de endocrinología y nutrición del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) ha llevado a cabo recientemente un estudio con el objetivo de conocer la incidencia de la DM1 en Asturias durante los años 2011-2020. Se identificaron 815 nuevos casos de DM1 en este intervalo, con una tasa de incidencia de 7,82 casos por cada



100.000 habitantes con un pico entre los 10 y 14 años. Los datos recogidos sitúan Asturias con una incidencia alta según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (Rodríguez Escobedo et al., 2023).

Como ya se mencionó anteriormente, se trata de una enfermedad autoinmune, existiendo una relación de la enfermedad con el antígeno leucocitario humano (HLA). Se observan mayoritariamente cuatro asociaciones entre la expresión de distintos genes y el desarrollo de la DM1 (Gillespie, 2006).

1. El cromosoma 6, que codifica para dos haplotipos diferentes, es considerado uno de los más importantes dado su contribución en la mitad de los casos familiares de DM1. El 90% de los niños con DM1 presentan alguna de las dos combinaciones de haplotipos de este cromosoma DR4-DQ8 y DR3-DQ2.
2. Contribuyendo con un 10% a la susceptibilidad a padecer DM1 se encuentra el segundo factor más importante, el gen de insulina del cromosoma 11.
3. Por otro lado, el alelo de un gen ubicado en el cromosoma 2q33, que actúa como regulador negativo en la activación de las células T, conocido como antígeno 4 de los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4). Se relaciona con un aumento en los niveles circulantes de CTLA-4 y alteración en la frecuencia de células T reguladoras.
4. Finalmente, una variante de PTPN22, el gen que codifica la tirosinofosfatasa linfoide, también supresora de la activación de las células T (Gillespie, 2006).

Sin embargo, estas son sólo una muestra de las muchas asociaciones genéticas que tiene la DM1, estando relacionadas principalmente con el sistema inmunitario y actuando sobre vías importantes en el desarrollo de la enfermedad (DiMeglio et al., 2018).

Para el diagnóstico de la diabetes se emplean principalmente dos métodos: Por un lado, la medición de los niveles de la glucosa en plasma venoso, y por otro lado la prueba de hemoglobina glicosilada (HbA1c). Sin embargo, esta última no se recomienda para el diagnóstico de DM1, ya que en estos pacientes las



variaciones en la glucemia pueden ser rápidas, siendo poco sensible para el diagnóstico. En cuanto a los niveles de la glucosa en plasma existen tres formas de diagnóstico (Petersmann et al., 2019):

1. Cuando la concentración de glucosa en sangre en ayunas es superior a 126 mg/dL (7mmol/L).
2. Cuando la medida se hace en cualquier momento aleatorio del día y se obtiene una concentración de glucosa en sangre superior a 200 mg/dL (11,1 mmol/L).
3. Finalmente, cuando se obtiene un resultado anormal tras una prueba oral de tolerancia a la glucosa (OGTT).

Una vez diagnosticada la diabetes, es necesario llevar a cabo la detección de anticuerpos y HLA para determinar el tipo de diabetes. Actualmente, en el 90% personas diagnosticadas con DM1 se pueden medir los niveles de anticuerpos frente a proteínas específicas de las células  $\beta$  pancreáticas, como son la insulina y el glutamato descarboxilasa entre otros. Como se observa en la **Figura 2** existe un modelo que divide la enfermedad en distintas fases de acuerdo con su progresión y el desarrollo autoinmune (DiMeglio et al., 2018):

- **Estado preclínico 1:** Esta caracterizado por la presencia de 2 o más anticuerpos y una glucemia normal.
- **Estado preclínico 2:** Se diferencia con el anterior, por una situación de glucemia alterada.
- **Estado 3 momento del diagnóstico:** Se observa una clara progresión de las anormalidades metabólicas derivadas de una glucemia alterada, y se diagnostica según los criterios previamente mencionados.
- **Estadio 4:** Enfermedad ya establecida.



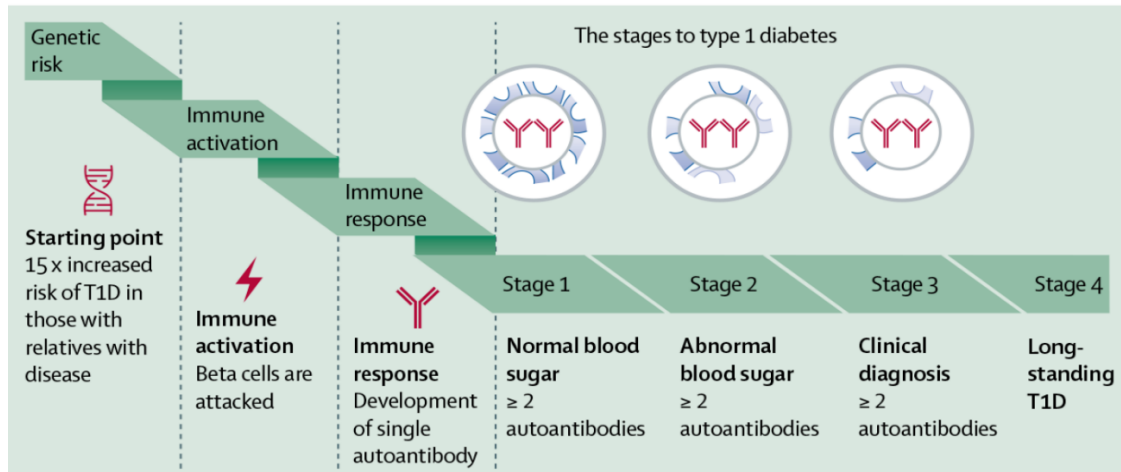


Figura 2: Fases de la progresión y el desarrollo de la DM1. Figura tomada de (DiMeglio et al., 2018).

Conocida la estratificación de las diferentes etapas de la enfermedad, y sabiendo que, la duración de los estadios tempranos puede prolongarse durante varios meses e incluso años, hace viable que se puedan llevar a cabo estudios e intervenciones inmunitarias previas al debut clínico de la enfermedad, con la finalidad de retrasar o evitar la aparición de la enfermedad (Herold et al., 2019).

### 1.1.2 Fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 1

El origen de la DM1 viene de la interacción de las células  $\beta$  pancreáticas con los sistemas inmune innato y adaptativo (DiMeglio et al., 2018). Lo que continua en duda es si existe un factor desencadenante de la respuesta inmunitaria. Existen numerosos estudios que han relacionado el momento de aparición de la enfermedad con infecciones por enterovirus, alteraciones en la microbiota, así como ingesta de gluten, entre otros, sin embargo no hay datos concluyentes que lo demuestren (Buschard, 2022).

El mecanismo por el que se inicia la destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas se cree que es el que se muestra en la **Figura 3**. Las células presentadoras de antígenos (APC, de sus siglas en inglés *antigen-presenting cell*) van a presentar péptidos pancreáticos a los linfocitos TCD4, que a su vez van a activar a los linfocitos TCD8. Los TCD8 van a ser los encargados de destruir a las células del islote que presenten esos antígenos en su superficie, esta destrucción va a ser promovida por la liberación de citocinas proinflamatorias y especies

reactivas de oxígeno, por parte de células inmunitarias. Los linfocitos T activados dentro del ganglio linfático pancreático van a estimular a linfocitos B para que produzcan anticuerpos contra las proteínas procedentes de estas células. Estos autoanticuerpos producidos son los que se van a poder medir en sangre como biomarcador en los primeros estadios de la enfermedad (DiMeglio et al., 2018).

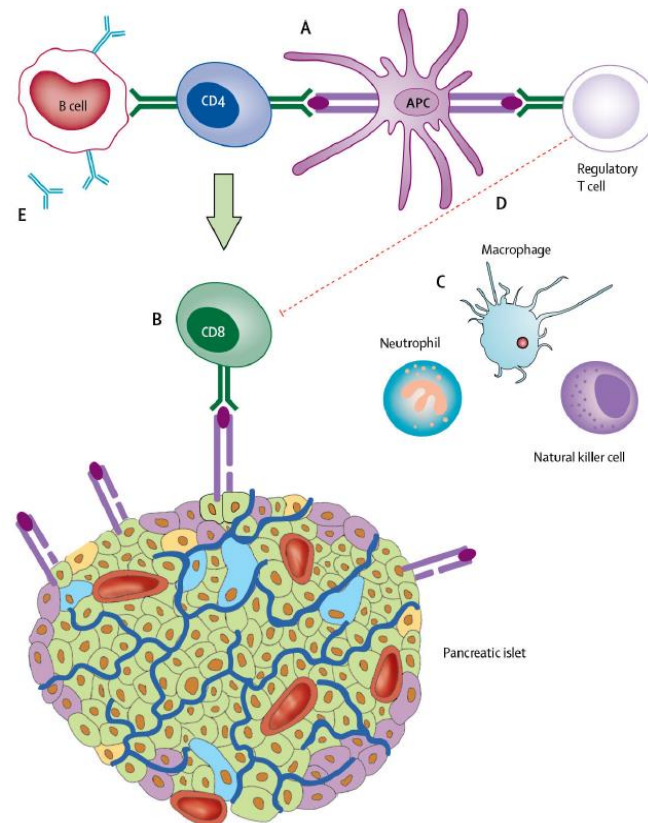


Figura 3: Inmunopatogénesis de DM1. Extraída de (DiMeglio et al., 2018).

### 1.1.3 Nuevas tecnologías de manejo de diabetes mellitus tipo 1

El tratamiento de las personas con DM1 ha cambiado mucho a lo largo de la historia. Uno de los mayores hitos en el tratamiento de esta patología fue el descubrimiento y síntesis de la insulina, hace ahora 100 años (Bliss et al., 1982). A partir de ese momento hubo grandes progresos en el tratamiento de la diabetes con insulina y su forma de administrarla. Previo al uso de la insulina en pacientes diabéticos, la esperanza de vida era de unos meses. No fue hasta 1922, cuando la vida de mucha gente cambió, se comenzaron a usar extractos crudos de insulina obtenidos a partir del páncreas de animales. Gracias a numerosas investigaciones, con el tiempo estas insulinas sintéticas se fueron

mejorando y obteniendo las concentraciones óptimas de uso. Además, se desarrollaron insulinas más puras, evitando el uso de aditivos como el zinc, con el objetivo de reducir la inmunogenicidad. Este campo fue evolucionando hasta que, en 1990 se obtuvieron nuevos análogos de la insulina, la denominada “Insulina lenta” que permitían que esta se fuese liberando poco a poco en el organismo, y disminuyendo en número de administraciones de insulina que tiene que ponerse el paciente (Lewis & Brubaker, 2021). Con respecto al tratamiento con insulina ha habido grandes desarrollos, dentro de los que destacan los sistemas que permiten la liberación de insulina de una forma más cómoda y sencilla:

- **Bombas de infusión subcutánea continua de insulina (ISCI):** El principal objetivo de estos aparatos programables es imitar la liberación fisiológica de insulina por parte de las células beta del páncreas, para lograr un control glucémico óptimo. Para ello, las ISCI administran la insulina en el tejido subcutáneo, a través de catéteres, cuya velocidad puede ser controlada por el paciente. Estas bombas, además, permiten administrar cantidades muy pequeñas de insulina (desde tan sólo 0,01 unidades), lo que permite al usuario administrar bolos según sus necesidades o ingesta (Templer, 2022; Ware & Hovorka, 2022).

Las nuevas aproximaciones terapéuticas están centradas en la administración de insulina ligada a la medición de glucosa, reduciendo así las variaciones glucémicas. A lo largo del tiempo, los sistemas de auto medición de glucosa en sangre han evolucionado significativamente, siendo cada vez más fáciles de usar y con una mayor precisión. Sin embargo, estos sistemas tienen un gran inconveniente, ya que ofrecen información estática de los niveles de glucosa, sin tener en consideración los cambios dinámicos que ocurren de forma natural en el organismo. Se han desarrollado monitores continuos de glucosa que, a diferencia de los medidores clásicos de glucosa, pueden brindar información en tiempo real sobre tendencias y patrones, lo cual es un gran avance, especialmente para aquellos individuos que requieren ajustes frecuentes en los niveles de insulina, reduciendo la cantidad de pinchazos necesarios en el día (Kravarusic & Aleppo, 2020).

- **Monitores continuos de glucosa:** su uso está aprobado por la Agencia de Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), tanto para pacientes con DM1, como aquellos pacientes con DM2 que tengan un régimen de insulina intensivo. Son

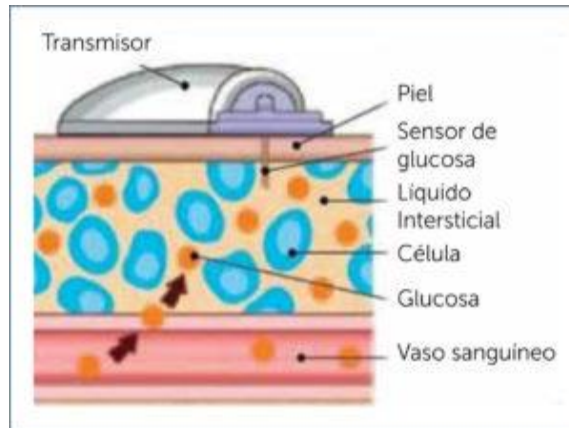


Figura 4: Monitor continuo de glucosa sobre la piel  
de: <https://diabetesmadrid.org/medidores-continuos-glucosa/>

sistemas capaces de medir los niveles de glucosa del líquido intersticial de forma continuada, basándose en una reacción enzimática con la glucosaoxidasa como sustrato. Los datos obtenidos en este sensor son enviados a un transmisor y pueden estar disponibles en diversos receptores como pueden ser el propio sensor, o bien mediante aplicaciones en los smartphones (**Figura 4**). Desde su implantación, los pacientes han mejorado sus niveles de HbA1c y, más importante, han disminuido sus hipoglucemias (Kravarusic & Aleppo, 2020). Este tipo de sensores puede ser de dos tipos:

- **A tiempo real:** Da información de forma continuada al paciente, además dispone de alertas y alarmas para avisar de hipoglucemias o hiperglucemias. Su uso es recomendable en pacientes con DM1, sobremanera en individuos con riesgo de hipoglucemia y antecedentes de hipoglucemia nocturna frecuente (Kravarusic & Aleppo, 2020).
- **Sistema de escaneo intermitente tipo flash:** mide los niveles de glucosa de forma continuada, y graba las lecturas cada 15 minutos, sin embargo, se requiere de un dispositivo o un smartphone para escanear el sensor, de tal forma que proporcione la información al paciente. (Kravarusic & Aleppo, 2020).

A pesar de todos los avances anteriormente mencionados que se han producido en el tratamiento de esta enfermedad, hay muchos pacientes que no

alcanzaban un buen control glucémico para prevenir o frenar el desarrollo de complicaciones asociadas a la enfermedad (Rawshani et al., 2017). Fue entonces cuando, uniendo todas las anteriores tecnologías que habían aparecido hasta la fecha, surgieron los sistemas de asa cerrada híbrido:

- **Sistema de asa cerrada híbrido:** también llamado sistema de infusión automatizada de insulina, integra tres componentes: un monitor continuo de glucosa en tiempo real, que hace medidas de glucosa intersticial en intervalos regulares, un algoritmo de control, el cual puede estar integrado en la bomba de insulina, en un aparato externo o en una aplicación de móvil, y finalmente, una bomba de insulina que permita su liberación continua (*Guía de Uso de Sistemas de Asa Cerrada | Sociedad Española de Diabetes, 2021; Ware & Hovorka, 2022*). Desde la implantación de los sistema de asa cerrada, su uso se ha incrementado exponencialmente, y actualmente, un 60% de los pacientes con DM1 en EEUU las emplean, con cifras mayores si nos centramos en los grupos de edad más jóvenes (Ware & Hovorka, 2022). Para este trabajo nos vamos a centrar en tres sistemas que se encuentra disponibles en el mercado (**Tabla 1**) (*Guía de Uso de Sistemas de Asa Cerrada | Sociedad Española de Diabetes, 2021*).

Tabla 1: Comparativa de los sistemas híbridos empleados para llevar a cabo este trabajo

	<b>Medtronic MiniMed780G</b>	<b>Roche Diabeloop</b>	<b>Tandem Control IQ</b>
<b>Indicaciones</b>	>7 años	>18 años	>6 años
<b>Gestantes</b>	Sí	No	Sí
<b>¿Dónde ver la información?</b>	Smartphone	Sistema aparte	Bomba
<b>Coste mensual</b>	550€	447€	490€

## 1.2 Marcadores relacionados con la diabetes tipo 1

Como ya se mencionó anteriormente la diabetes causó 2 millones de muertes en 2019, estando estas muertes relacionadas con las complicaciones asociadas a la enfermedad, más que a la enfermedad *per se*. Por ello, es importante estudiar los mecanismos que conllevan el desarrollo de estas





complicaciones, buscando posibles marcadores pronósticos del desarrollo de comorbilidades, con el fin de reducir esta cifra de mortalidad.

### 1.2.1 Perfil de inflamación

La variabilidad glucémica (VG) junto con niveles altos de glucosa, hiperglucemia, se han asociado con complicaciones microvasculares y macrovasculares. La VG en diabetes se define como la fluctuación en los niveles de glucosa en sangre, que puede variar en frecuencia y duración. Dentro de los cambios bioquímicos y fisiopatológicos inducidos por las fluctuaciones en los niveles de glucosa se encuentran el estrés oxidativo y la inflamación crónica de bajo grado (Klimontov et al., 2021).

El estrés oxidativo ocurre debido a que la hiperglicemia conlleva la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno. Asimismo, se sabe que cambios intermitentes hacia niveles elevados de glucosa, producen un mayor estrés oxidativo que una situación de glucosa elevada de forma continuada (Klimontov et al., 2021).

Con respecto a la respuesta inflamatoria, se ha demostrado que una exposición a niveles de glucosa elevados de forma intermitente promueve la secreción de la interleuquina 6 (IL-6), el factor de crecimiento tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y diferentes citocinas inflamatorias. Sin embargo, no solo los episodios de hiperglucemia desencadenan estos procesos inflamatorios, sino que los episodios intermitentes de hipoglucemia también están involucrados. En un estudio llevado a cabo con macrófagos en cultivo sometidos a VG, se observó la secreción de integrina  $\alpha$ , interleuquina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), TNF- $\alpha$  e IL-6 como respuesta inflamatoria. Se ha evidenciado que la hipoglucemia estimula la circulación de ciertos subgrupos de leucocitos en la sangre y provoca alteraciones proinflamatorias, tanto en sujetos sanos, como en pacientes con diabetes tipo 1 (Klimontov et al., 2021).

Por todos los argumentos mencionados anteriormente, las moléculas en las que nos vamos a centrar a lo largo del trabajo son las interleuquinas IL-1 $\beta$  y IL-

6, el TNF- $\alpha$ , la proteína C reactiva (PCR) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (Wang et al., 2020),.

- **IL-1 $\beta$**  pertenece a la familia de las IL-1, relacionadas especialmente con enfermedades inflamatorias. Llevan a cabo numerosas funciones, actuando sobre varios tipos celulares produciendo una gran diversidad de efectos, lo que va a provocar procesos inflamatorios. Como consecuencia de la señalización de la familia IL-1, se produce un aumento en los niveles de las moléculas de adhesión, reclutando linfocitos y activando células inmunitarias y por tanto, amplificando la inflamación (Wang et al., 2020).
- **TNF- $\alpha$**  se trata de una citoquina proinflamatoria pleiotrópica. La alteración en los niveles de esta se encuentra relacionada con una amplia variedad de patologías como infecciones y enfermedades autoinmunes como la DM1, cáncer, Alzheimer, etc. Participa en numerosos procesos inmunológicos entre los que se incluye inflamación, diferenciación, metabolismo lipídico y apoptosis (Wang et al., 2020).
- **IL-6** es una glucoproteína secretada por los macrófagos, células T, células endoteliales y fibroblastos. Esta interleucina tiene actividad dual antiinflamatoria y proinflamatoria, su liberación está inducida por la IL-1 y se incrementa en respuesta a TNF $\alpha$  (Rose-John, 2018).
- **Proteína C reactiva (PCR)** es una proteína homopentamérica inflamatoria de fase aguda. La inducción de la transcripción de esta proteína se da en el hígado como respuesta al aumento en los niveles de IL-6. Se observan niveles elevados de expresión durante condiciones inflamatorias como artritis, enfermedades cardiovasculares e infección (Sproston & Ashworth, 2018). La PCR está muy estudiada en diabetes, dado que se observa un aumento en los niveles en sangre, sirve por tanto como un buen marcador de inflamación sistémica, además de relacionarse con mayor riesgo de sufrir eventos cardiovasculares en pacientes con DM1 (Słomiński et al., 2022).
- **Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF):** Se trata de una quimiocina de las células endoteliales, factor estimulante de la mitosis. Su principal función es la regulación de la angiogénesis fisiológica y la



revascularización patológica, además aumenta la permeabilidad vascular (Lou et al., 2022). La alteración de los niveles de expresión de este factor están asociados con el desarrollo de un dolor crónico, propio de patologías como la diabetes, la artritis y el cáncer (Hulse, 2017).

### 1.2.2 Micro ARNs

Como ya se mencionó anteriormente, la DM1 es una enfermedad autoinmune, y aunque los factores genéticos sean considerados la principal causa del desarrollo de la enfermedad, el estudio de la epigenética y su papel en las enfermedades metabólicas está en auge. La epigenética se define clásicamente como aquellos cambios heredables en la función de los genes, que ocurren sin alterar la secuencia del ADN. Aunque las marcas epigenéticas pueden permanecer estables y transmitirse a las generaciones posteriores, también se pueden modificar en respuesta a estímulos ambientales endógenos y exógenos. En el estudio del epigenoma se incluyen la metilación del ADN, la modificación postraduccional de histonas y los ARNs no codificantes (Ling & Rönn, 2019; Reik, 2007).

Los ARNs no codificantes constituyen un 99 % del contenido celular total de ARN, y aunque se encuentran codificados por ADN y se transcriben a ARN, no son traducidos a proteínas. Dentro de este gran grupo los más conocidos son los microARNs (miARN), en los cuales nos vamos a centrar en este trabajo (Ali et al., 2021). Los miARN son una clase de ARNs no codificantes monocatenarios de 18-24 nucleótidos de longitud, presentes en animales, plantas y algunos virus. Su función principal es regular de forma negativa la expresión genética a nivel de ARN mensajero, en concreto, se cree que están detrás de la regulación de aproximadamente un tercio de los genes que codifican proteínas. Aunque se descubrieron por primera vez en 1993 en *Caenorhabditis elegans*, no fue hasta el año 2000 cuando se identificaron en humanos, y a día de hoy hay registrados 2.656 miARNs humanos maduros en la base de datos miRBase (Kozomara et al., 2019). La mayoría de las secuencias maduras de miARN se encuentran en intrones o exones de ARN no codificantes (Ali et al., 2021; Saliminejad et al., 2019).

- **Biosíntesis de miARN:** El proceso de biosíntesis de miARN tiene lugar en varias etapas y en dos lugares dentro de la célula, tal como se muestra en la **Figura 5**. La primera fase ocurre en el núcleo, donde el ARN primario (pri-miARN) es transcrito por la ARN polimerasa II, para ser procesado o bien por el complejo DROSHA-DGCR8 o por componentes de la maquinaria de splicing. El producto que se obtiene es el pre-miARN, de unos 70 nucleótidos aproximadamente, va a ser transportado al citoplasma por la proteína exportina-5. Una vez en el exterior del núcleo, va a ser procesado por la endoribonucleasa DICER en asociación con sus proteínas de unión, va a escindir el pre-miARN, obteniendo un miARN maduro de doble cadena. Para ejercer su función, este miARN maduro resultante tiene que cargar una de sus hebras en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC del inglés, *RNA-induced silencing complex*). Con la ayuda de proteínas argonauta y chaperonas, se va a mediar la interacción de la cadena guía del miARN con su ARNm diana, lo que provoca la inhibición de la traducción del ARNm (Hill & Tran, 2021; Mori et al., 2019).

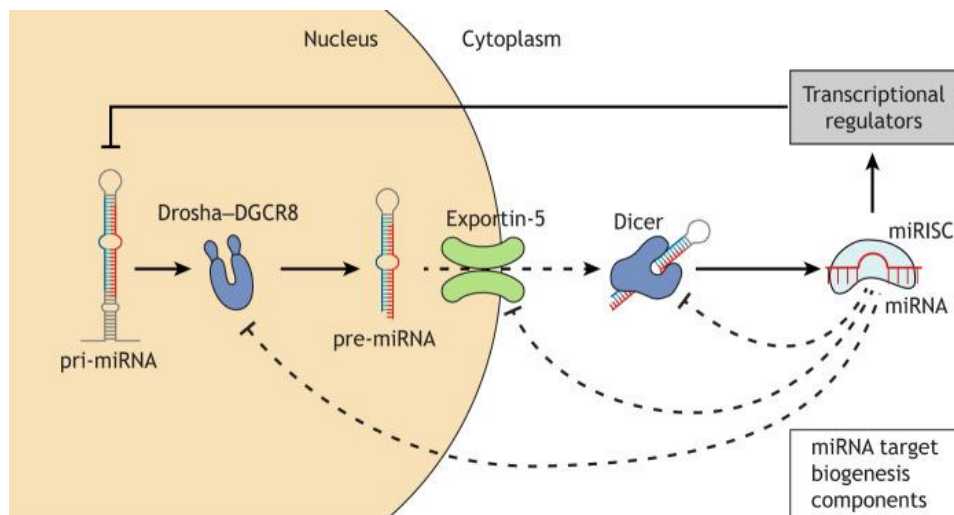


Figura 5: Proceso de biosíntesis de miARN. Extraída de (Hill & Tran, 2021)

Al igual que ocurre con los ARNs mensajeros, el perfil de expresión de los miARNs puede ser signo de identidad celular, por ejemplo, en células musculares aparecen niveles elevados de ciertos miARN como el hsa-miR-1, el hsa-miR-133 y el hsa-miR-206 entre otros. Además, su actividad no está limitada al interior celular, sino que se ha demostrado que estos miARNs también se encuentran en fluidos corporales, siendo transportados mediante



exosomas a los distintos tejidos, actuando por tanto como factores paracrinos. Este hecho hace que puedan ser utilizados como biomarcadores, no sólo para la detección de diferentes patologías, sino también para predecir el pronóstico de una enfermedad ya diagnosticada (Mori et al., 2019).

## Antecedentes

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, existen numerosos factores que pueden influir en el desarrollo y progresión de la DM1 y sus complicaciones, incluidos los miARNs. En la actualidad han aparecido diversos estudios que buscan analizar el perfil de expresión diferencial de miARNs en pacientes con DM1, (Butz et al., 2016; Snowwhite et al., 2017). Entre estos artículos destaca un estudio realizado en el grupo de investigación de Endocrinología Nutrición, Diabetes y Obesidad (ENDO) del ISPA, en el que analizaron de perfil de expresión de miARNs circulantes en personas con diabetes tipo 1 (n=20), comparado con controles sanos (n=10), mediante secuenciación masiva de nueva generación (NGS, del inglés Next Generation Sequencing). Se identificaron un total de 1.679 miARNs, de los cuales 22 presentaban un perfil diferencial entre grupos ( $p$  valor  $<0.05$  y  $\log_2$  fold change ( $\logFC$ )  $\geq 1$  o  $\leq -1$ ). De entre ellos, 5 miARNs estaban regulados a la baja, y 17 al alza en las personas con DM1.

Para este trabajo se seleccionaron 4 miARNs (hsa-miR-1-3p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-9-5p y hsa-miR-1200), para su validación en una cohorte mayor de pacientes (n=55).

Lo que se pretende es encontrar miARNs que puedan servir como biomarcador pronóstico para el desarrollo de complicaciones cardiovasculares, de pacientes adultos con diabetes tipo 1.

Los pacientes incluidos en este primer estudio no tenían complicaciones asociadas, sin embargo, el control de la glucemia era variante. Este control glucémico es importante a la hora del desarrollo futuro de otras patologías, como son las cardiovasculares. Es por ello por lo que, muchos pacientes que no son capaces de alcanzar un buen control con las inyecciones de insulina



habituales, son candidatos al uso de sistemas de infusión continua de insulina, para así mejorar dicho control y reducir la variabilidad glucémica.

## 2. Objetivos

Basándonos en lo mencionado anteriormente, los objetivos planteados de este trabajo son:

1. Validar los cambios en los miARNs circulantes hsa-miR-1-3p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-9-5p y hsa-miR-1299 en personas con diabetes tipo 1 establecida, comparado con un grupo control normoglucémico, a partir de muestras de plasma sanguíneo.
2. Estudiar los cambios en el perfil glucémico e inflamatorio en pacientes que iniciaron tratamiento con sistemas de asa cerrada híbridos durante 1 año.



### 3. Material y métodos

Todos los participantes en este estudio son conocedores del mismo y firman el consentimiento informado, de acuerdo con la Declaración de Helsinki de 1964. Todo participante puede, en cualquier momento que lo desee, revocar este consentimiento. Además, el protocolo ha sido aprobado por el comité de ética del HUCA (Proyecto nº32/19, Marzo 2019, Oviedo, Asturias, España).

Este trabajo está dividido en dos grupos experimentales:

#### a. Estudio de los miARN circulantes en pacientes con DM1 establecida

##### Obtención de muestras

Para llevar a cabo el estudio, 85 voluntarios fueron reclutados en el servicio de Endocrinología y Nutrición del HUCA entre junio de 2019 y diciembre de 2021.

Los pacientes fueron divididos en dos cohortes, una primera **cohorte de descubrimiento**, formada por 30 voluntarios (10 controles y 20 personas con DM1), y una **cohorte de validación**, constituida por 55 voluntarios (21 controles y 34 personas con DM1). Se aplicaron los siguientes criterios de inclusión: no haber padecido cáncer, ni otra enfermedad autoinmune, no haber padecido infecciones o procesos catarrales en los 15 días previos a la toma de la muestra, no superar un índice de masa corporal (IMC) de  $30\text{kg/m}^2$  y finalmente no tener ninguna complicación micro o macrovascular.

Las muestras de sangre periférica fueron recogidas en ayunas en tubos EDTA Vacutainer® (BD Biosciences). Inmediatamente después se centrifugaron a 2000 rpm durante 15 minutos y a una temperatura de 4°C. De tal forma que se obtienen dos fases, una fase superior que contiene el plasma y una fase inferior compuesta por sangre total. El plasma se dividió en alícuotas y se almacenó a -80°C hasta ser utilizado.

## Extracción de ARN

A partir de 200µl del plasma congelado se extrajo el ARN circulante, mediante columnas de membrana de sílice con el kit comercial miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen, Hildem Germany) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Además, a la mezcla del tampón de lisis se le añadió el 1.5 µg de ARN carrier del bacteriófago MS2 (Roche, Merck, Darmstadt, Germany) con el fin de aumentar el rendimiento de la extracción y aislamiento de ARN. El producto final se eluyó en 20µl de H<sub>2</sub>O libre de ARNasas y se almaceno a -80°C hasta su uso.

## Síntesis de ADNc

Con el producto del paso anterior se sintetizó el ADN complementario (ADNc) empleando el miRNA cDNA Synthesis Kit (TaqMan, Applied Biosystems), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Este proceso se lleva a cabo en un termociclador, a partir de 2µl de ARN y consta de 3 reacciones:

1. **PolyA:** Es la poliadenilación del extremo 3' del ARN facilitando la estabilización y mejorando la eficacia de la transcripción (**Tabla 2**).

*Tabla 2: Reactivos para la reacción de la PolyA*

Compuesto	Volumen/muestra
10X PolyA Buffer	0.5 uL
ATP	0.5 uL
PolyA Enzyme	0.3 uL
RNase free H <sub>2</sub> O	1.35 uL
miRNA	2 uL
<b>Total</b>	<b>5.0 uL</b>

Esta reacción tiene lugar en dos pasos en el termociclador, la poliadenilación a 37°C durante 45 minutos, a continuación, se para la reacción a 65°C durante 10 minutos. La mezcla se conserva a 4°C hasta el siguiente paso.

2. **Ligación:** adición del adaptador de ligación en el extremo 5'. Sobre el tubo de la anterior reacción se añaden los reactivos de la **Tabla 3**.

Tabla 3: Reactivos para la reacción de ligación

Compuesto	Volumen
5X DNA Ligase Buffer	3uL
50% PEG 8000	4.5uL
25X Ligation adaptor	0.6uL
RNA Ligase	1.5uL
RNase free H2O	0.4uL
<b>Total</b>	<b>10uL</b>

La mezcla se incuba en el termociclador durante 60 minutos a 16°C y nuevamente se conserva a 4°C hasta el siguiente paso.

- 3. Transcripción reversa:** Sobre la mezcla anterior se echan los siguientes reactivos (**Tabla 4**) para que tenga lugar la última reacción de síntesis del ADNc.

Tabla 4: Reactivos para la reacción de transcripción reversa

Compuesto	Volumen
5X RT Buffer	6uL
dNTP mix (25nM each)	1.2uL
20X Universal RT Primer	1.5uL
10X RT Enzyme Mix	3uL
RNase free H2O	3.5uL
<b>Total</b>	<b>15uL</b>

Esta mix se incuba a 42°C durante 15 minutos para que la reacción de transcripción tenga lugar y posteriormente se para la reacción dejando la muestra 10 minutos a 85°C. La muestra se conserva a 4°C hasta que se continúa con la siguiente reacción.

Una vez que ha finalizado la reacción de transcripción reversa se obtienen 45µl de ADNc. A continuación, para estudiar los miARNs es necesario llevar a cabo una amplificación a partir de 5µl del producto anterior. Sin embargo, los otros 40µl de ADNc pueden ser almacenados sin amplificar a -20 °C durante al menos 2 meses.



**4. miR-Amp reaction:** La reacción de amplificación tiene lugar a partir de 5µl del paso anterior con los siguientes reactivos (**Tabla 5**):

*Tabla 5: Reactivos para la reacción de amplificación*

Compuesto	Volumen/muestra
2X miR-Amp Master Mix	25 uL
20X miR-Amp Primer Mix	2.5 uL
RNase free H2O	17.5 uL
<b>Total</b>	<b>45 uL</b>

Esta reacción es más compleja, en primer lugar se produce la activación de la enzima, posteriormente se realizan 14 ciclos de desnaturalización-anillamiento y finalmente se para la reacción dejando la muestra 10 minutos a 99 °C (**Tabla 6**).

*Tabla 6: Pasos para la amplificación del ADNc en el termociclador*

Paso	Temperatura	Tiempo	ciclos
<b>Activación de la enzima</b>	95 °C	5 min	1
<b>Desnaturalización</b>	95 °C	3 seg	14
<b>Anillamiento</b>	60 °C	30 seg	
<b>Parar reacción</b>	99 °C	10 min	1
<b>Hold</b>	4 °C	Hold	1

El producto que se obtiene puede ser conservado a -20°C hasta su nuevo uso.

#### RT-PCR

Una vez que se ha sintetizado el ADNc y se ha amplificado para una mejor detección, se va a realizar la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR *Real Time Polymerase Chain Reaction* de sus siglas en inglés). A diferencia de la PCR clásica, que es cualitativa, se trata de una prueba cuantitativa, que nos va a permitir analizar la expresión relativa de los miARN. Se analizaron las 55 muestras de la cohorte de validación empleando reactivos de TaqMan® Gene Expression con el equipo de detección Applied Biosystems Prism 7900HT y el programa SDS 2.4 (Applied Biosystems). Para llevarla a cabo, es necesario hacer previamente una dilución 1:10 de las muestras en agua libre de ARNasas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizaron placas de 384 pocillos, en las que se cargaron en duplicado 9µl por pocillo de la mezcla de muestra y reactivos (**Tabla 7**). Además, se incluyeron

un control negativo en forma de agua y un *pool* de muestras que servirá para normalizar los resultados entre las placas.

Tabla 7: Reactivos para la RT-PCR

Compuesto	Volumen
TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2X)	10uL
TaqMan® Advanced miRNA Assay (20X)	1uL
RNase-free water	4uL
cDNA	5uL
Total PCR Reaction Mix	20uL

Es importante incluir un control endógeno en las PCR, es por ello, por lo que mediante un ranking con la herramienta RefFinder aplicado a los resultados de NGS, se determinó que el control endógeno sería el hsa-miR-191-5p. Es importante estudiarlo siempre, dado que, en los miARNs (**Tabla 8**), la estabilidad de control va a variar dependiendo de la cohorte.

Tabla 8: Primers empleados en este estudio

miARN	Referencia TaqMan	Secuencia
hsa-miR-191-5p	477952_mir	5'- CAACGGAAUCCCAAAAAGCAGCUG-3'
hsa-miR-200b-3p	477963_mir	5'-UAAUACUGCCUGGUAUGAUGA-3'
hsa-miR-1-3p	477820_mir	5'-UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU-3'
hsa-miR-9-5p	478214_mir	5'-UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA-3'
hsa-miR-1299	478696_mir	5'- UUCUGGAAUUCUGUGUGAGGGA -3'

La reacción de RT-PCR consiste en las siguientes fases:

- **Activación de la enzima:** 95°C, 20 segundos
- **Amplificación:** 40 ciclos de:
  - 95°C, 3 segundos
  - 60°C, 30 segundos

#### Análisis de los resultados

Para analizar los resultados de la PCR se descartaron todos los valores de  $C_T > 35$  ( $C_T$  ciclo a partir del cual se inicia la amplificación, en el que se comienza a detectar fluorescencia), asumiendo que la muestra no había amplificado. Para calcular la expresión relativa de los miARNs se empleó la siguiente fórmula:  $2^{-\Delta C_T}$ . Donde  $\Delta C_T = C_T \text{ miARN} - C_T \text{ del miARN endógeno}$ .

Las diferencias estadísticas se analizaron mediante el test del Wilcoxon (para dos grupos) realizando pruebas Dunn para comparaciones post Hoc, considerando p-valor < 0,05 como significativo. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con la herramienta R.

**b. Efecto de la implantación de un sistema de infusión continua de glucosa híbrido en el perfil glucémico e inflamatorio de pacientes con DM1.**

Se incluyeron en este estudio datos de 31 pacientes con DM1, mayores de 18 años que iniciaron su tratamiento con sistema integrado entre noviembre de 2019 y noviembre de 2022.

**I) Estudio del perfil glucémico**

Para analizar los cambios en el perfil glucémico de estos pacientes, empleando la base de datos de RedCap, se recogieron distintos datos demográficos, de composición corporal y bioquímicos de los pacientes en 4 tiempos: previo a la implantación del sistema, 3 meses, 6 meses y 1 año tras la implantación del dispositivo. Además, se analizaron los datos glucómetros extraídos de los monitores continuos de glucosa, principalmente, el tiempo en rango (TIR = porcentaje de tiempo al día con valores entre 70–180 mg/dl glucosa), y el coeficiente de variación de glucosa (CV), de todos los valores registrados. Por otro lado, se estudiaron los niveles de HbA1C y glucosa en sangre tras la implantación de estos sistemas. Estos datos fueron analizados con la herramienta estadística JASP.

**II) Estudio del perfil inflamatorio**

Además de los datos demográficos anteriormente citados, se recogieron muestras de sangre de estos pacientes en cada una de las 4 visitas.

Inicialmente, el estudio del perfil inflamatorio se llevó a cabo con el plasma de los 31 pacientes que completaron el año. Se precisó de la ayuda del servicio de bioquímica del HUCA, en el que se analizaron los niveles de expresión proteicos de los siguientes marcadores de inflamación: IL-6 y PCR.



Por otro lado, a partir de las muestras de sangre de 2 pacientes en 4 tiempos, se llevó a cabo la extracción de linfocitos de sangre periférica (PBL de sus siglas en inglés), para realizar un análisis piloto de expresión de diferentes marcadores de inflamación. Mediante RT-PCR se analizó la de los siguientes marcadores:  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$  y VEGF.

A partir de muestras sanguíneas recogidas en tubos EDTA se aislaron los PBL mediante el uso del reactivo Lymphoprep™. Este reactivo actúa generando un gradiente de densidad aislando las células mononucleares, de forma que, llevando a cabo diferentes ciclos de centrifugación, y tras periodos de incubación a partir de sangre se obtiene un pellet celular. Este pellet puede ser congelado y almacenado a  $-80^{\circ}C$  hasta su uso.

#### Extracción de ARN por columnas

Con el pellet celular de PBL extraído del paso anterior, se llevó a cabo la extracción de ARN. En este caso se quiere estudiar material genético de mayor tamaño, por lo que el protocolo de extracción de ARN es diferente. De manera breve, lo primero, se llevó a cabo una disgregación mecánica del pellet celular con jeringuilla y aguja, a continuación, aislamos en ARN con el buffer de lisis celular RLT (Qiagen) y las columnas RNeasy Mini Spin (Qiagen), mediante diversos procesos de centrifugación. El producto final va a ser el ARN diluido en 20  $\mu$ l de  $H_2O$  libre de ARNasas. El ARN es entonces cuantificado mediante Nanodrop 1000 (ThermoScientific, Applied Biosystems) y almacenado a  $-80^{\circ}C$  hasta su uso.

#### Síntesis de ADNc con el Kit High Capacity

El protocolo a seguir para obtener el ADN complementario, en este caso es más sencillo que el llevado a cabo para las muestras de miARN. Para ello, se empleó el Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (**Tabla 9**, Applied

Biosystems). En el que en tan solo un paso en el termociclador se obtiene el ADNc del ARN previamente extraído.

*Tabla 9: Reactivos empleados para la síntesis de ADNc con el Kit High Capacity*

10X RT Buffer	2,0 $\mu$ l
25X dNTPs Mix (100mM)	0,8 $\mu$ l
10X RT Random Primers	2,0 $\mu$ l
MultiScribe™ RT	1,0 $\mu$ l
RNase Inhibitor	1,0 $\mu$ l
RNase Free H2O	3,2 $\mu$ l
TOTAL/muestra	10 $\mu$ l

En el termociclador a partir de un volumen de 20 $\mu$ l se lleva a cabo la retrotranscripción en 4 etapas (**Tabla 10**):

*Tabla 10: Pasos para la amplificación del ADNc en el termociclador con el kit High Capacity*

	<b>Etapas 1</b>	<b>Etapas 2</b>	<b>Etapas 3</b>	<b>Etapas 4</b>
<b>Temperatura</b>	25°C	37°C	85°C	4°C
<b>Tiempo</b>	10 min	120 min	5 min	Hold

El producto que se obtiene es almacenado y congelado a -20°C hasta la realización de la PCR.

RT-PCR:

Para llevar a cabo la PCR se siguió el mismo protocolo, y los mismos reactivos que en el caso del análisis de los miARNs. En este caso, como control endógeno para la normalización de los resultados se empleó el gen GAPDH (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa).

## 4. Resultados

### Perfil diferencial de miARN en personas con DM1 establecida

Como ya se comentó anteriormente en la fase inicial de descubrimiento constituida por 30 personas, en la que se llevó a cabo el estudio de NGS, se identificaron 1679 miARNs. 22 miARNs cumplían los criterios establecidos de un pvalor  $< 0.05$  y  $\log_2$  fold change ( $\log_2FC$ )  $\geq 1$  o  $\leq -1$  como se puede ver en la **Figura 6**.

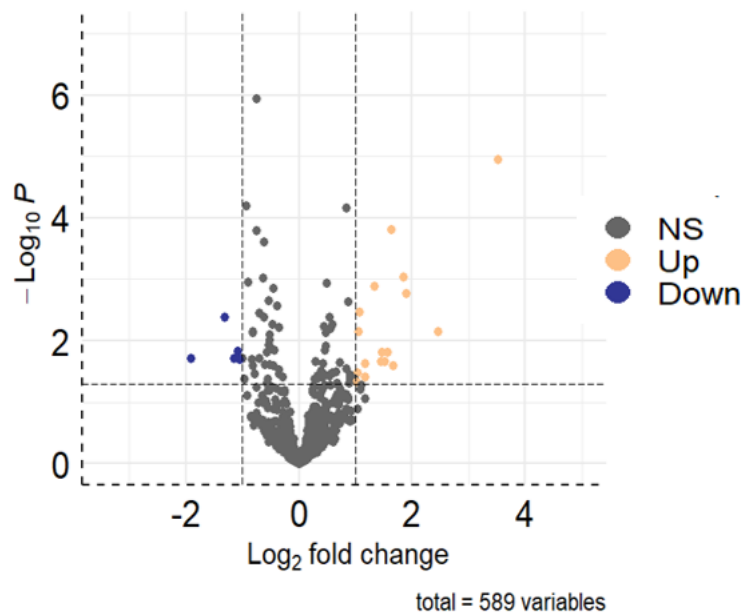


Figura 6: "Volcano plot" de NGS. Puntos naranjas miARNs sobreexpresados, azules regulados a la baja, según los criterios

De los 5 miARNs que estaban regulados a la baja, y los 17 al alza, se seleccionaron aquellos miARN con valores  $\log_2$ CPM superiores a 5. Tan solo 4 miARNs cumplían dicho criterio, y fueron seleccionados para su validación en la cohorte de validación compuesta por 55 nuevos voluntarios: hsa-miR-1-3p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-9-5p y hsa-miR-1299.

Como se ve en la **Figura 7A** los miARNs hsa-miR-1-3p, hsa-miR-200b-3p y hsa-miR-9-5p se encontraban sobreexpresados en pacientes con DM1 con respecto a los controles, al contrario que el hsa-miR-1299, que se encontraba regulado a la baja en pacientes con DM1 con respecto a los controles.

Sin embargo, en el análisis por RT-PCR de los niveles de expresión de los miARNs el hsa-miR-1299 se excluyó porque más de la mitad de las muestras no pudieron detectarse. Con respecto a los otros 3 miARNs como se puede observar en los boxplot de la **Figura 7B**, sólo el hsa-miR-1-3p mostró el aumento significativo que se esperaba en el grupo de pacientes con diabetes tipo 1. Por el contrario, no se observaron los cambios esperados en la expresión hsa-miR-200b-3p ni hsa-miR-9-5p.

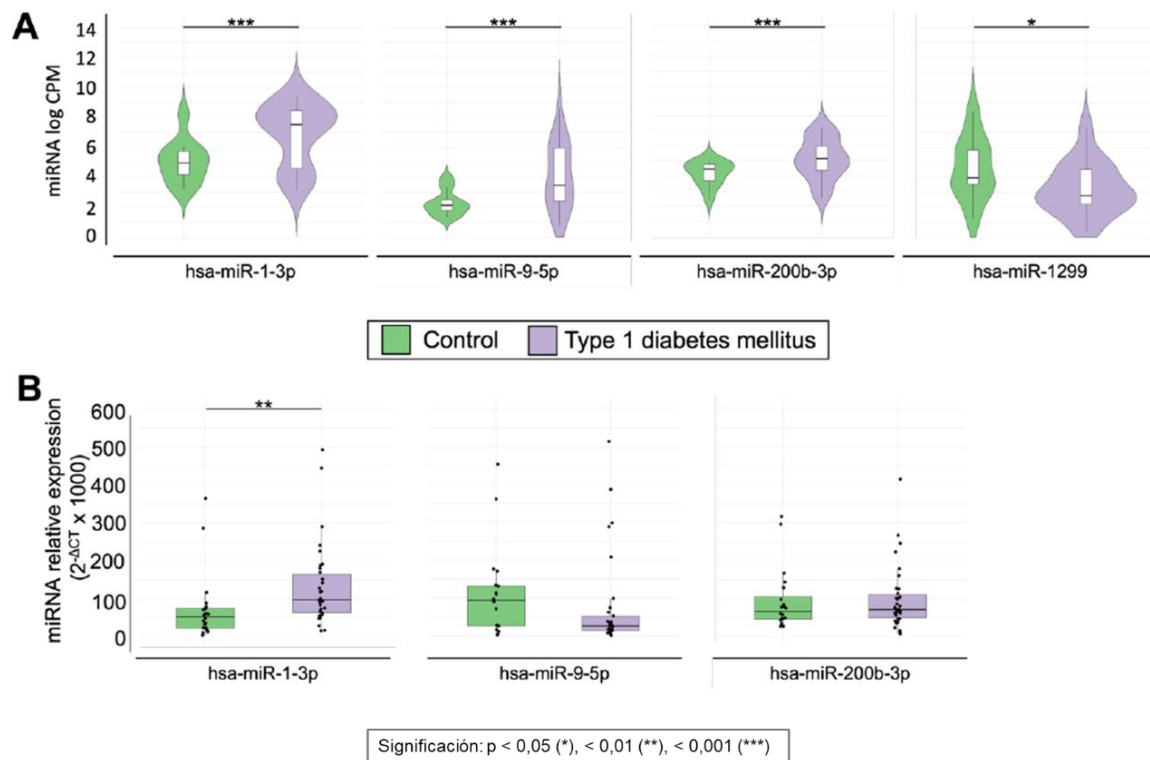


Figura 7: Boxplot de la expresión diferencial de miARNs (A) NGS miARNs seleccionados por logCPM (B) Expresión miARNs analizados por RT-PCR

La relación que tienen estos miARNs con diferentes enfermedades se estudió empleando la herramienta web miRNET. Destacando su relación con la diabetes en amarillo, y con enfermedades cardiovasculares en verde en la **Tabla 11**.



Tabla 11: Enfermedades relacionadas con la expresión de los miARNs

Nombre	Genes diana	p-Valor
Isquemia miocárdica	16	0.00143
Nefropatía diabética	7	0.00171
Ateroesclerosis	9	0.00255
Muerte súbita cardíaca	6	0.00282
Fibrilación atrial	6	0.00383
Diabetes Mellitus, No Insulinodependiente	15	0.00433
Diabetes Mellitus	10	0.0053
Enfermedad coronaria prematura	3	0.00539
Arterioesclerosis coronaria	3	0.00539

A continuación, en la **Figura 8** se puede observar los miARNs y los genes sobre los que actúan, de nuevo destacando en amarillo aquellos que afectan a enfermedad diabética y en verde corresponden con enfermedad cardiovascular.

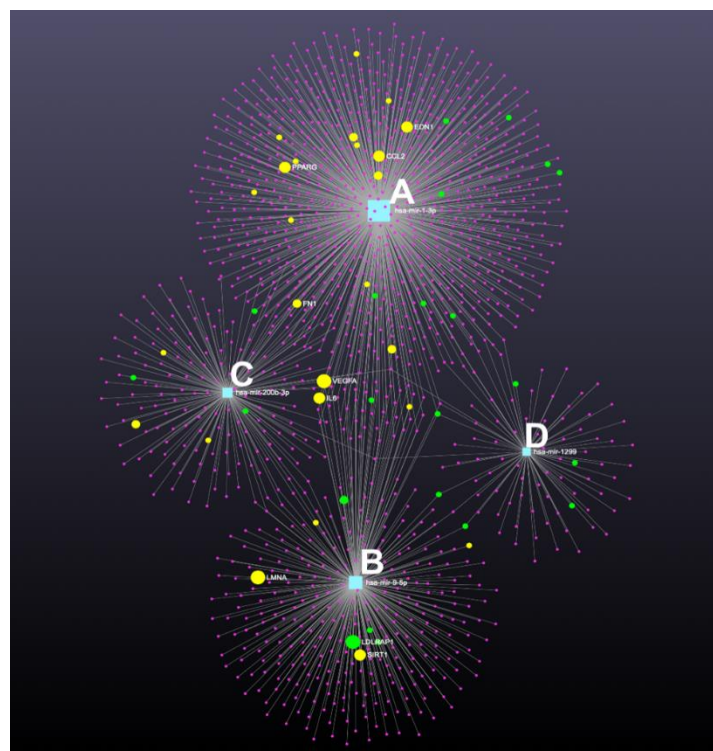


Figura 8: Relación de los miARNs con genes asociados a enfermedad diabética y cardiovascular. A: hsa-miR-1-3p; B: hsa-miR-9-5p; C: hsa-miR-200b-3p; D: hsa-miR-1299

Efecto de la implantación de un sistema de asa cerrada en pacientes con DM1 establecida

En cuanto a la descripción demográfica de los pacientes del segundo objetivo, en la **Tabla 12**, se pueden observar las diferencias.

Tabla 12: Perfil demográfico y efecto de la implantación del sistema

<b>EDAD</b> (años)	45,0 (12,7)			
<b>SEXO</b> (hombre/mujer)	6/13			
<b>SISTEMA</b>				
780G	5 (26,3%)			
Control IQ	5 (26,3%)			
Diabeloop	9 (47,4%)			
	T0	T1	T2	T3
TIR (%)	66,4 (14,7)	73,3 (11,6)	73,1 (14,1)	76,5 (8,39)
CV	36,9 (5,32)	32,5 (5,47)	32,8 (5,32)	32,4 (4,74)
HbA1c (%)	7,15 (0,93)	6,69 (0,57)	6,82 (0,61)	6,62 (0,90)
Glucosa (mg/dl)	156 (56,9)	140 (61,8)	123 (60,3)	92,8 (37,7)

Con respecto a los parámetros anteriores, se han observado diferencias estadísticamente significativas en el TIR, CV y glucosa en sangre (**Figura 9**).

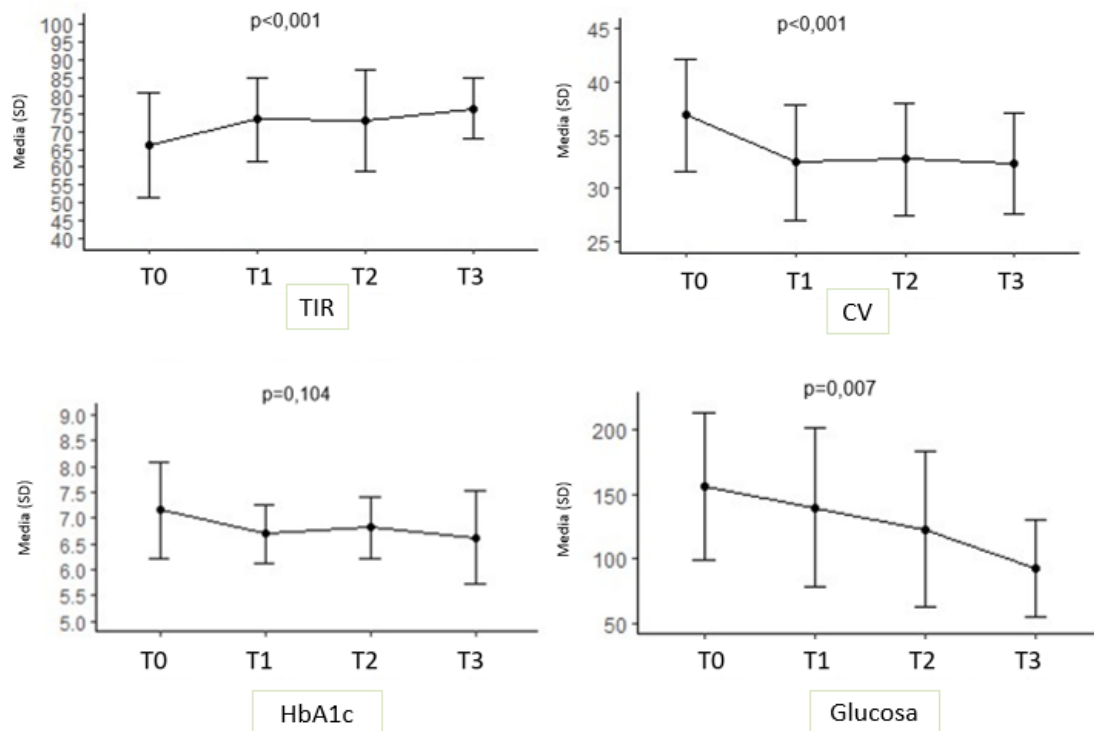


Figura 9: Comparativa de TIR, CV, HbA1c y glucosa a lo largo de los 4 tiempos

En las posteriores comparaciones post Hoc, mostradas en la **Tabla 13** se puede ver detalladamente las diferencias significativas para los parámetros anteriormente mencionados enfrentándolos a cada tiempo.

Tabla 13: Comparaciones post Hoc TIR, CV, HbA1c y glucosa

	TIR	CV	HBA1C	GLUCOSA
<b>T0 vs 3 meses</b>	<b>&lt; ,001</b>	<b>&lt; ,001</b>	0,244	0,895
<b>T0 vs 6 meses</b>	<b>&lt; ,001</b>	<b>0,002</b>	0,270	0,615
<b>T0 vs 1 año</b>	<b>&lt; ,001</b>	<b>&lt; ,001</b>	0,166	<b>0,015</b>
<b>3 meses vs 6 meses</b>	0,423	1,000	1,000	0,615
<b>3 meses vs 1 año</b>	0,383	1,000	1,000	<b>0,012</b>
<b>6 meses vs 1 año</b>	0,776	1,000	1,000	0,208

**Cambios significativos resaltados en negrita**

Efecto de la implantación de un sistema de asa cerrada en el perfil de inflamación

En el estudio de los niveles de expresión proteica en plasma de IL-6 y PCR en 19 pacientes que habían iniciado el tratamiento con un sistema de asa cerrada, no se observaron diferencias significativas. Teniendo esto en cuenta y para un mejor análisis del perfil inflamatorio en estos pacientes, se elaboró un estudio piloto que incluía a 2 pacientes en 4 tiempos, con el objetivo de validar la técnica, estudiando los marcadores de inflamación IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , y VEGF, en pellets celulares de PBLs, donde tampoco se observan diferencias significativas (**Figura 10**).

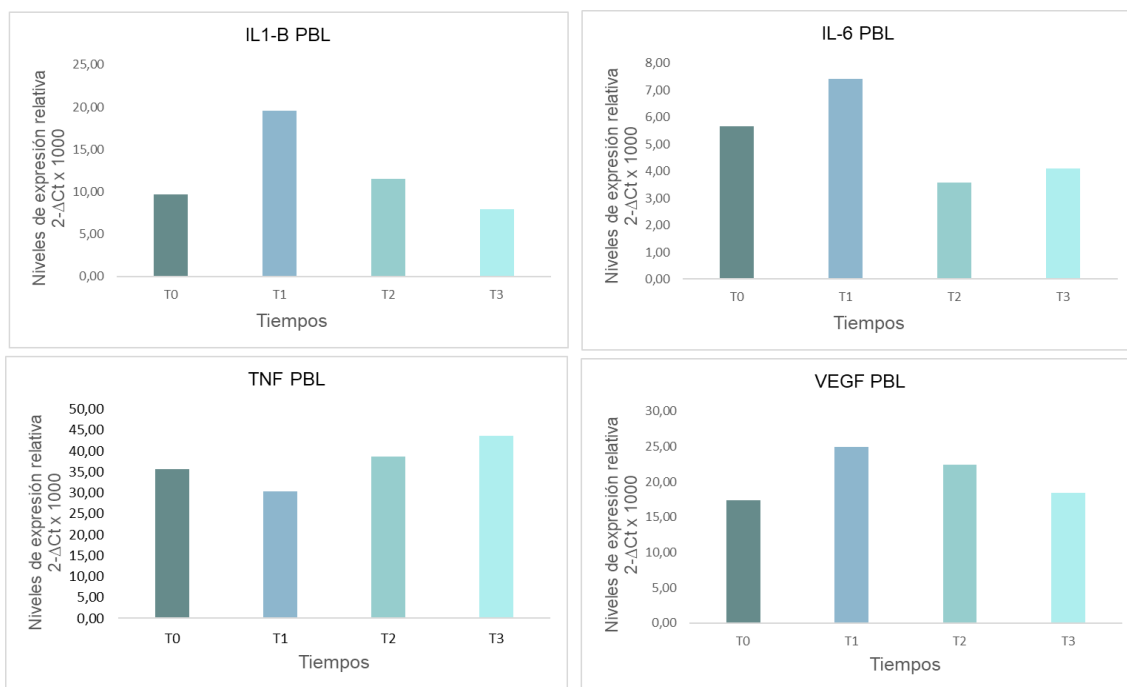


Figura 10: Niveles de expresión de los distintos marcadores de inflamación en los 4 tiempos estudiados en pellet de PBL

## Influencia del uso de ISCI previa en el efecto a largo plazo del uso de un sistema de asa cerrada

Finalmente, al estudiar los parámetros en base a si tenían una ISCI previa, aunque se observan distintas tendencias no hay diferencias estadísticamente significativas (**Tabla 14**).

Tabla 14: Cambios en los parámetros estudiados en base a ISCI previa

	ISCI previa	T0	T1	T2	T3
TIR (%)	No	63,8 (26,0)	69,4 (17,8)	65,8 (24,7)	83,7 (13,1)
	Sí	67,2 (10,7)	74,7 (8,90)	75,6 (7,59)	74,5 (6,15)
CV	No	32,1 (6,10)	30,1 (7,17)	31,7 (8,66)	29,3 (5,69)
	Sí	38,4 (4,26)	33,3 (4,77)	33,2 (3,92)	33,3 (4,37)
HbA1c (%)	No	7,74 (1,40)	6,86 (0,92)	7,30 (0,96)	6,58 (1,46)
	Sí	6,94 (0,64)	6,63 (0,40)	6,68 (0,41)	6,64 (0,74)
Glucosa (mg/dl)	No	171 (47,0)	151 (107)	123 (73,5)	83,5 (30,7)
	Sí	151 (60,7)	135 (38,9)	123 (58,0)	95,7 (40,2)

En la **Figura 11** se representan los cambios de la **Tabla 14**, en el caso del TIR aquellos pacientes con ISCI previa tienen un ascenso gradual, sin embargo, los que no habían tenido una ISCI previa alcanzan un mayor tiempo en rango al año. Aquellos pacientes que portaban una ISCI previa, partían de un porcentaje de HbA1c menor, alcanzando ambos un porcentaje similar al año. Con respecto a la glucosa, ocurre lo mismo, los pacientes que tenían una ISCI previa tenían unos niveles iniciales de glucosa menores en comparación con el otro grupo, sin embargo, alcanzan mejores niveles de glucosa los pacientes que no portaban la ISCI con anterioridad.

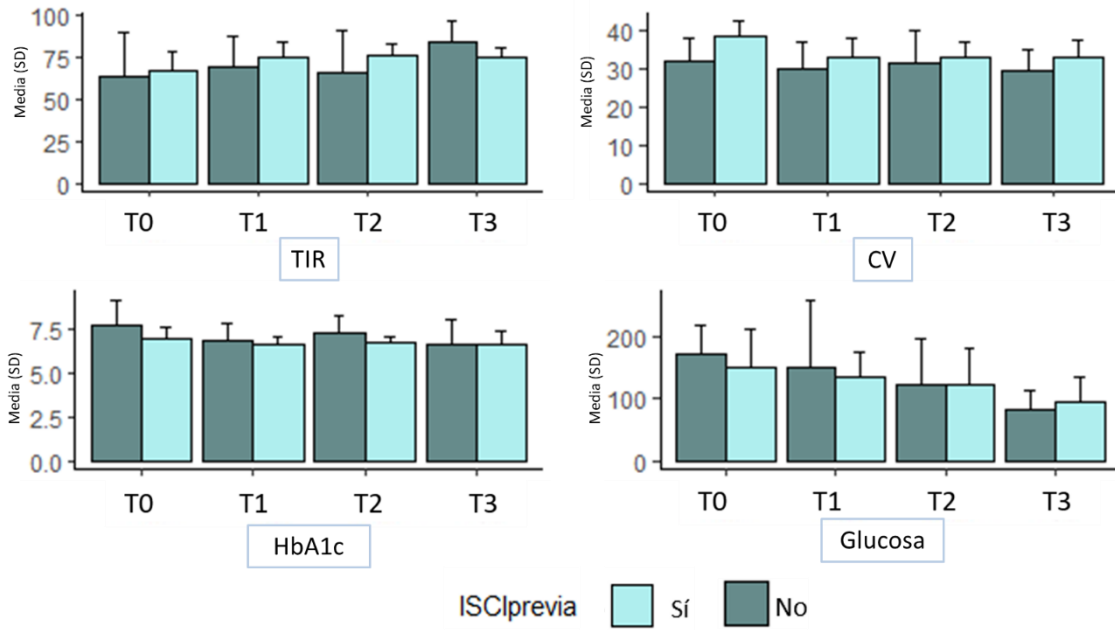


Figura 11: Comparativa TIR, CV, HbA1C y glucosa en base a ISCI previa



## 5. Discusión

La diabetes es una enfermedad metabólica cuyas cifras se están disparando significativamente, siendo un grave problema de salud con más de 422 millones de personas afectadas (*International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 10th Edn., 2021; WHO, 2019*). En general, la diabetes esta infradiagnosticada, con una prevalencia de 1 de cada 3 personas sin diagnóstico (Rodríguez Escobedo et al., 2023). En cuanto a la DM1, presenta una estrecha relación con el sistema inmunitario, y está relacionada con el desarrollo de otras enfermedades, como las enfermedades cardiovasculares, la retinopatía diabética o la nefropatía diabética (DiMeglio et al., 2018).

Pese a que se conozca que el origen de la DM1 viene de la interacción de las células  $\beta$  pancreáticas con el sistema inmune del paciente, permanece la incógnita del desencadenante de la respuesta inmunitaria. Se podría atribuir entre otros a los cambios en el estilo de vida, cambios epigenéticos, en la microbiota, así como a infecciones (Buschard, 2022).

El estudio de los cambios epigenéticos, así como el papel de los miARNs en el desarrollo de diferentes enfermedades, incluida la diabetes, es un campo en auge (Butz et al., 2016), sin embargo, la mayoría de los estudios realizados hasta el momento se han desarrollado en pacientes con DM2 (Vasu et al., 2019). En cuanto a la DM1, existen diferentes trabajos que han abordado este tema, sin embargo, la mayor parte de estos trabajos se ha realizado en pacientes pediátricos de nuevo diagnóstico (Erener et al., 2017). En concreto, más de 200 miARNs, en diferentes tejidos, han sido relacionados con la DM1, siendo los resultados muy variantes en función de la cohorte de pacientes empleada. Para evitar posibles interferencias de factores externos, en este estudio se analizó una cohorte de pacientes con DM1 establecida, de al menos 2 años desde el diagnóstico, y que no tuviesen ninguna comorbilidad asociada. De entre todos los miARNs identificados por NGS, 5 miARNs fueron validados en una cohorte mayor de pacientes por RT-PCR: hsa-miR-1-3p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-9-5p y hsa-miR-1299. De entre ellos, únicamente el hsa-miR-1-3p fue validado en esta nueva cohorte, encontrándose regulado al alza en pacientes con DM1 en comparación con los controles normoglucémicos.



El hsa-miR-1-3p es un miARN perteneciente a la familia de los myomiR, encontrándose presente tanto en el corazón, como en el músculo esquelético y se ha asociado frecuentemente con el desarrollo de enfermedades relacionadas con estos tejidos (Vienberg et al., 2017). De igual manera, mediante el uso de herramientas bioinformáticas, hemos hipotetizado la relación entre el miARN-1-3p con diferentes genes diana no solo relacionados con enfermedades cardiovasculares, cuya relación ya había sido descrita previamente (Al-Muhtaresh et al., 2019), sino también con la patología diabética. Al-Kafaji et al., 2021 postularon que, los individuos con prediabetes presentan unos niveles de expresión de hsa-miR-1 significativamente superiores a los individuos control. Nuestros resultados, además de trasladar el aumento de la expresión de este miARN en pacientes con DM1 establecida, pudiendo relacionarse por tanto la expresión del miARN con las distintas fases del desarrollo de la diabetes, y por tanto, influyendo en la fisiopatología de la enfermedad y sus complicaciones. Actualmente, es la primera vez que se reporta la regulación a la alza del hsa-miR-1-3p en pacientes con DM1 bien establecida y sin comorbilidades (Morales-Sánchez et al., 2023). Además, en este mismo trabajo, pudimos ver cómo, los niveles de expresión de hsa-miR-1-3p, estaban directamente relacionados con el control glucémico de los pacientes, de tal modo que a mayor cifra HbA1c, aumenta la expresión de este miARN. Sabemos que, controlar el perfil glucémico es imprescindible para un buen manejo de la diabetes, y la prevención de la aparición de patologías asociadas, y es por ello por lo que, en los últimos años, la industria farmacéutica ha centrado sus esfuerzos en mejorar estos parámetros. Así, aparecen los sistemas de asa cerrada híbridos, que ayudan a un mejor control de la glucemia, evitando la aparición de hipoglucemias e hiperglucemias.

En nuestra cohorte de pacientes pudimos observar que, el tiempo en rango de los pacientes con DM1 y un sistema de asa cerrada híbrido, aumenta de forma significativa tras la implantación de este sistema, manteniéndose esta mejora durante todo el periodo analizado. Aunque las diferencias no son significativas, si subdividimos a los pacientes en base a si han llevado una ISCI previa o no, se alcanzan mejores niveles del TIR en aquellos que no la habían llevado. El TIR se ha asociado con complicaciones en la diabetes, como la retinopatía.





Concretamente, en el estudio de Beck et al., 2019 demuestran que, cada disminución del 10% en el TIR, se relaciona con un aumento del 64% en la tasa de riesgo para la progresión de la retinopatía. Con la implantación de los sistemas de asa cerrada, no solo se evitan esas disminuciones en el TIR sino que se producen aumentos de más de un 10%.

Otro factor importante a tener en cuenta es el coeficiente de variación, un índice que refleja muy bien la variabilidad glucémica media diaria, independientemente de la concentración de glucosa en el organismo, siendo un 36% el punto de corte que distingue entre control glucémico estable del lábil (Ceriello et al., 2019). Todos los pacientes incluidos en nuestro estudio han reducido su porcentajes y conseguido mantenerse por debajo de este límite, pudiendo por tanto afirmar que con este sistema logran un control glucémico estable. Además, los niveles de glucosa en sangre muestran un mayor descenso en pacientes aquellos pacientes que no presentaban una ISCI previa, aun partiendo de niveles más elevados, pasando de niveles iniciales de glucosa en sangre de 156 mg/dl al año, a una media de 93 mg/dl (American Diabetes Association, 2013).

Se ha postulado que, cambios en los niveles de glucosa, traducidos en una mayor VG, promueven un aumento en la respuesta inflamatoria en pacientes con diabetes (Al Zoubi et al., 2020). Por ello, nos planteamos un estudio piloto en el que medir como la implantación de estos sistemas de bombas de insulina afectan al perfil inflamatorio de los pacientes, y aunque los resultados en plasma de proteína y en las PBLs correspondientes a estos marcadores no fueron lo esperado es importante constatar que el tamaño muestral es muy limitante y es necesario seguir analizando estos marcadores en toda la cohorte de pacientes.



## 6. Conclusión

1. El hsa-miR-1-3p se encuentra regulado al alza en pacientes con diabetes tipo 1, pudiendo ser un buen biomarcador para la predicción y la progresión de la misma.
2. Los sistemas de asa cerrada han demostrado una mejoría muy rápida y mantenida en los parámetros glucométricos y en el manejo de la diabetes tipo 1.
3. El estudio del perfil inflamatorio en el plasma de los pacientes con sistema de asa cerrada no cumplió las expectativas, a pesar de dichas mejoras en el control de la glucemia.
4. Se ha puesto a punto un método para medir los niveles de expresión de genes inflamatorios en las PBLs de pacientes con diabetes tipo 1, no pudiendo alcanzar resultados concluyentes debido al reducido tamaño muestral.



## 7. Bibliografía

- Al Zoubi, Y., Mussa, B. M., Srivastava, A., Mohammed, A. K., Abdelgadir, E., Bashier, A., Awadi, F. A., & Abusnana, S. (2020). Differential Expression of Inflammatory Markers in Hypoglycemia Unawareness Associated with Type 1 Diabetes: A Case Report. *Brain Sciences*, 11(1), 17. <https://doi.org/10.3390/brainsci11010017>
- Ali, S. A., Peffers, M. J., Ormseth, M. J., Jurisica, I., & Kapoor, M. (2021). The non-coding RNA interactome in joint health and disease. *Nature Reviews Rheumatology*, 17(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/s41584-021-00687-y>
- Al-Kafaji, G., Al-Muhtaresh, H. A., & Salem, A. H. (2021). Expression and clinical significance of miR-1 and miR-133 in pre-diabetes. *Biomedical Reports*, 14(3), 33. <https://doi.org/10.3892/br.2021.1409>
- Al-Muhtaresh, H. A., Salem, A. H., & Al-Kafaji, G. (2019). Upregulation of Circulating Cardiomyocyte-Enriched miR-1 and miR-133 Associate with the Risk of Coronary Artery Disease in Type 2 Diabetes Patients and Serve as Potential Biomarkers. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 12(4), 347-357. <https://doi.org/10.1007/s12265-018-9857-2>
- American Diabetes Association. (2013). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 36 Suppl 1(Suppl 1), S67-74. <https://doi.org/10.2337/dc13-S067>
- American Diabetes Association. (2015). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*, 38(Supplement\_1), S8-S16. <https://doi.org/10.2337/dc15-S005>



- Ares Blanco, J., Lambert, C., Fernandez-Sanjurjo, M., Morales-Sanchez, P., Pujante, P., Pinto-Hernández, P., Iglesias-Gutiérrez, E., Menendez Torre, E., & Delgado, E. (2023). MiR-24-3p and Body Mass Index as Type 2 Diabetes Risk Factors in Spanish Women 15 Years after Gestational Diabetes Mellitus Diagnosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 1152. <https://doi.org/10.3390/ijms24021152>
- Beck, R. W., Bergenstal, R. M., Riddlesworth, T. D., Kollman, C., Li, Z., Brown, A. S., & Close, K. L. (2019). Validation of Time in Range as an Outcome Measure for Diabetes Clinical Trials. *Diabetes Care*, 42(3), 400-405. <https://doi.org/10.2337/dc18-1444>
- Bliss, M., Banting, F. G., Best, C. H., & Collip, J. B. (1982). BANTING'S, BEST'S, and COLLIP'S ACCOUNTS OF THE DISCOVERY OF INSULIN. *Bulletin of the History of Medicine*, 56(4), 554-568.
- Buschard, K. (2022). The etiology and pathogenesis of type 1 diabetes—A personal, non-systematic review of possible causes, and interventions. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 876470. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.876470>
- Butz, H., Kinga, N., Racz, K., & Patocs, A. (2016). Circulating miRNAs as biomarkers for endocrine disorders. *Journal of Endocrinological Investigation*, 39(1), 1-10. <https://doi.org/10.1007/s40618-015-0316-5>
- Ceriello, A., Monnier, L., & Owens, D. (2019). Glycaemic variability in diabetes: Clinical and therapeutic implications. *The Lancet. Diabetes & Endocrinology*, 7(3), 221-230. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(18\)30136-0](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(18)30136-0)



- Chiang, J. L., Kirkman, M. S., Laffel, L. M. B., Peters, A. L., & on behalf of the Type 1 Diabetes Sourcebook Authors. (2014). Type 1 Diabetes Through the Life Span: A Position Statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care*, 37(7), 2034-2054. <https://doi.org/10.2337/dc14-1140>
- DiMeglio, L. A., Evans-Molina, C., & Oram, R. A. (2018). Type 1 diabetes. *Lancet (London, England)*, 391(10138), 2449-2462. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31320-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31320-5)
- Erener, S., Marwaha, A., Tan, R., Panagiotopoulos, C., & Kieffer, T. J. (2017). Profiling of circulating microRNAs in children with recent onset of type 1 diabetes. *JCI Insight*, 2(4), e89656. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.89656>
- Gillespie, K. M. (2006). Type 1 diabetes: Pathogenesis and prevention. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal = Journal de l'Association Medicale Canadienne*, 175(2), 165-170. <https://doi.org/10.1503/cmaj.060244>
- Guía de Uso de Sistemas de Asa Cerrada | Sociedad Española de Diabetes.* (2021). <https://www.sediabetes.org/publicaciones/publicaciones-sed/guia-de-uso-de-sistemas-de-asa-cerrada/>
- Herold, K. C., Bundy, B. N., Long, S. A., Bluestone, J. A., DiMeglio, L. A., Dufort, M. J., Gitelman, S. E., Gottlieb, P. A., Krischer, J. P., Linsley, P. S., Marks, J. B., Moore, W., Moran, A., Rodriguez, H., Russell, W. E., Schatz, D., Skyler, J. S., Tsalikian, E., Wherrett, D. K., ... Greenbaum, C. J. (2019). An Anti-CD3 Antibody, Teplizumab, in Relatives at Risk for



- Type 1 Diabetes. *New England Journal of Medicine*, 381(7), 603-613.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1902226>
- Hill, M., & Tran, N. (2021). miRNA interplay: Mechanisms and consequences in cancer. *Disease Models & Mechanisms*, 14(4), dmm047662.  
<https://doi.org/10.1242/dmm.047662>
- Homo sapiens miRNAs (1917 sequences) [GRCh38]*. (2023).  
[https://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna\\_summary.pl?org=hsa](https://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?org=hsa)
- Hulse, R. P. (2017). Role of VEGF-A in chronic pain. *Oncotarget*, 8(7), 10775-10776. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14615>
- International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 10th edn.* (2021).  
<https://www.diabetesatlas.org>
- Klimontov, V. V., Saik, O. V., & Korbut, A. I. (2021). Glucose Variability: How Does It Work? *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 7783.  
<https://doi.org/10.3390/ijms22157783>
- Kozomara, A., Birgaoanu, M., & Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: From microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D155-D162. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>
- Kravarusic, J., & Aleppo, G. (2020). Diabetes Technology Use in Adults with Type 1 and Type 2 Diabetes. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 49(1), 37-55. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2019.10.006>
- Lewis, G. F., & Brubaker, P. L. (2021). The discovery of insulin revisited: Lessons for the modern era. *Journal of Clinical Investigation*, 131(1), e142239. <https://doi.org/10.1172/JCI142239>



- Li, W., Huang, E., & Gao, S. (2017). Type 1 Diabetes Mellitus and Cognitive Impairments: A Systematic Review. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 57(1), 29-36. <https://doi.org/10.3233/JAD-161250>
- Ling, C., & Rönn, T. (2019). Epigenetics in Human Obesity and Type 2 Diabetes. *Cell Metabolism*, 29(5), 1028-1044. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.03.009>
- Lou, Z., Li, Q., Wang, C., & Li, Y. (2022). The effects of microRNA-126 reduced inflammation and apoptosis of diabetic nephropathy through PI3K/AKT signalling pathway by VEGF. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 128(5), 1265-1274. <https://doi.org/10.1080/13813455.2020.1767146>
- Morales-Sánchez, P., Lambert, C., Ares-Blanco, J., Suárez-Gutiérrez, L., Villa-Fernández, E., Garcia, A. V., García-Villarino, M., Tejedor, J. R., Fraga, M. F., Torre, E. M., Pujante, P., & Delgado, E. (2023). Circulating miRNA expression in long-standing type 1 diabetes mellitus. *Scientific Reports*, 13(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35836-8>
- Mori, M. A., Ludwig, R. G., Garcia-Martin, R., Brandão, B. B., & Kahn, C. R. (2019). Extracellular miRNAs: From Biomarkers to Mediators of Physiology and Disease. *Cell Metabolism*, 30(4), 656-673. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.07.011>
- Petersmann, A., Müller-Wieland, D., Müller, U. A., Landgraf, R., Nauck, M., Freckmann, G., Heinemann, L., & Schleicher, E. (2019). Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 127(S 01), S1-S7. <https://doi.org/10.1055/a-1018-9078>





- Rawshani, A., Rawshani, A., Franzén, S., Eliasson, B., Svensson, A.-M., Miftaraj, M., McGuire, D. K., Sattar, N., Rosengren, A., & Gudbjörnsdóttir, S. (2017). Mortality and Cardiovascular Disease in Type 1 and Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine*, 376(15), 1407-1418. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1608664>
- Reik, W. (2007). Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*, 447(7143), Article 7143. <https://doi.org/10.1038/nature05918>
- Rodríguez Escobedo, R., Delgado Álvarez, E., & Menéndez Torre, E. (2023). Incidencia de la diabetes mellitus tipo 1 en Asturias entre 2011 y 2020. *Endocrinología, Diabetes y Nutrición*, 70(3), 189-195.
- Rose-John, S. (2018). Interleukin-6 Family Cytokines. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(2), a028415. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028415>
- Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H. R., Soleymani Fard, S., & Ghaffari, S. H. (2019). An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *Journal of Cellular Physiology*, 234(5), 5451-5465. <https://doi.org/10.1002/jcp.27486>
- Słomiński, B., Jankowiak, M., Maciejewska, A., Studziński, M., Mączyńska, A., Skrzypkowska, M., Gabig-Cimińska, M., & Myśliwiec, M. (2022). Genetic variation in C-reactive protein (CRP) gene is associated with retinopathy and hypertension in adolescents with type 1 diabetes. *Cytokine*, 160, 156025. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2022.156025>
- Snowwhite, I. V., Allende, G., Sosenko, J., Pastori, R. L., Messinger Cayetano, S., & Pugliese, A. (2017). Association of serum microRNAs with islet



- autoimmunity, disease progression and metabolic impairment in relatives at risk of type 1 diabetes. *Diabetologia*, 60(8), 1409-1422.  
<https://doi.org/10.1007/s00125-017-4294-3>
- Sproston, N. R., & Ashworth, J. J. (2018). Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Frontiers in Immunology*, 9, 754.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00754>
- Templer, S. (2022). Closed-Loop Insulin Delivery Systems: Past, Present, and Future Directions. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 919942.  
<https://doi.org/10.3389/fendo.2022.919942>
- Vasu, S., Kumano, K., Darden, C. M., Rahman, I., Lawrence, M. C., & Naziruddin, B. (2019). MicroRNA Signatures as Future Biomarkers for Diagnosis of Diabetes States. *Cells*, 8(12), 1533.  
<https://doi.org/10.3390/cells8121533>
- Vienberg, S., Geiger, J., Madsen, S., & Dalgaard, L. T. (2017). MicroRNAs in metabolism. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 219(2), 346-361.  
<https://doi.org/10.1111/apha.12681>
- Wang, Y., Che, M., Xin, J., Zheng, Z., Li, J., & Zhang, S. (2020). The role of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in intervertebral disc degeneration. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 131, 110660.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110660>
- Ware, J., & Hovorka, R. (2022). Closed-loop insulin delivery: Update on the state of the field and emerging technologies. *Expert Review of Medical Devices*, 19(11), 859-875.  
<https://doi.org/10.1080/17434440.2022.2142556>
- WHO, O. (2019). *Diabetes*. <https://www.who.int/health-topics/diabetes>

