



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**Carrera de Cirujano Dentista**

**Evaluación de la influencia de la activación de linfocitos en la inflamación sistémica en ratones con diabetes tipo 2.**

## **TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE:**

**CIRUJANO DENTISTA**

**PRESENTA A:**

**ANDREA FERNANDA MEDINA VARELA**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. ANA LILIA GARCIA HERNANDEZ**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR:**

**Dr. ISAAC OBED PEREZ MARTINEZ**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM**

**Mtro. SAÚL ERNESTO CIFUENTES MENDIOLA**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM**

**Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 05 de octubre de 2021**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## AGRADECIMIENTOS

A Dios.

A mi mamá, por creer en mí, y llevarme hasta el fin del mundo si es necesario para cumplir mis sueños. Mi mayor ejemplo de tenacidad, fortaleza y valentía, mi mayor apoyo.

A mi papá, porque esto es fruto de su esfuerzo, y me brindo las herramientas necesarias para cumplir mis sueños.

A mis hermanos, por enseñarme desde el día uno que llegaron al mundo a no rendirme, por echarme porras diario, solo espero que puedan aprender de mí la mitad de lo que yo he podido aprender de ustedes. A mi amuleto de la buena suerte, mi compañero fiel durante las noches de desvelo, que solo bastaba con verte a mi lado para no sentirme sola, gracias, Frank.

A mi abuelita Tita, Laura, abuelito Ajá y Arturo, no tengo más que palabras de agradecimiento, por amarme tanto incluso antes de conocerme, porque siempre me recuerdan lo orgullosos que están de mí y alimentar mis ganas de comerme el mundo desde pequeña.

A Edgar y Andrés porque día a día me demuestran que todo es posible.

A Pao, Karly por estar, por apoyarme, por enseñarme que todo es mejor cuando somos un equipo, y que equipazo somos. A Ale, por enseñarme el valor de la amistad, porque estamos logrando los sueños que teníamos a los 16 años.

A Harold, porque me ha demostrado que la gente que te quiere de verdad hace todo lo posible porque estés bien y por cumplir los sueños y objetivos del otro, porque cuando me siento en la cima, siempre me impulsa a subir un escalón más.

A Ernest, por ser la persona más paciente del mundo, por compartirme su conocimiento y no cansarse de explicarme desde que son las interleucinas, hasta como agarrar un ratón.

A la Dra. Ana Lilia, por fomentar el gusto por la ciencia, enseñarme a superarme como persona y siempre querer ir por más; por creer en mí y darme ese empujoncito. Gracias doctora.

A mis sinodales Dr. Obed Pérez, Dr. Alejandro Muñoz y Dr. Eduardo Llamosas por su valiosa aportación al desarrollo de este trabajo.

Un agradecimiento especial al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el financiamiento otorgado para realizar este trabajo dentro del proyecto con clave: IA203014.

# INDICE

<b>Glosario</b> .....	1
<b>Resumen</b> .....	2
<b>1. Introducción</b> .....	3
1.1 Diabetes Mellitus .....	3
1.2 Participación de los linfocitos T en la DMT2 .....	4
1.3 Proceso de la activación de linfocitos T .....	5
1.4 CTLA-4-Ig, inhibidor de la activación de linfocitos T .....	7
<b>2. Antecedentes</b> .....	8
<b>3. Justificación</b> .....	10
<b>4. Pregunta de investigación</b> .....	10
<b>5. Hipótesis</b> .....	11
<b>6. Objetivos</b> .....	11
<b>7. Estrategia experimental</b> .....	12
<b>8. Material y métodos</b> .....	13
8.1 Modelo experimental .....	13
8.2 Composición dietética .....	14
8.3 Medición de la glucemia .....	15
8.4 Medición de peso, circunferencia abdominal e índice de masa corporal.....	15
8.5 Citometría de flujo .....	15
8.6 Cuantificación de citocinas pro-inflamatorias .....	16
8.7 Análisis estadístico .....	16
<b>9. Resultados</b> .....	17
<b>10. Discusión</b> .....	28
<b>11. Conclusiones</b> .....	30
<b>12. Referencias</b> .....	31

## GLOSARIO

**CPA:** Célula presentadora de antígeno

**CTLA-4:** Antígeno 4 del Linfocito T citotóxico

**DM:** Diabetes Mellitus

**DMT2:** Diabetes mellitus tipo 2

**IFN- $\beta$ :** Interferón  $\beta$

**IFN- $\gamma$ :** Interferón  $\gamma$

**IgG:** Inmunoglobulina G

**IL-1  $\beta$ :** Interleucina 1

**IL-2:** Interleucina 2

**IL-6:** Interleucina 6

**LB:** Linfocito B

**LPS:** Lipopolisacárido

**LT:** Linfocito T

**MHC:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad

**NK:** Células asesinas naturales

**PAMP:** patrón molecular asociado a patógenos

**PMBC:** Células mononucleares de sangre periférica

**SZC:** Estreptozocina

**TCR:** Receptor de células T

**TGF  $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante  $\beta$

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

## RESUMEN

**Introducción:** Actualmente se desconocen los mecanismos que conducen al desarrollo de fragilidad ósea en la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2). La inflamación sistémica de bajo grado es un factor clave de la fisiopatología de la diabetes tipo 2. La inflamación crónica de bajo grado en la DMT2 es caracterizada por: infiltración tisular de neutrófilos y macrófagos inflamatorios; aumento de la producción de mediadores proinflamatorios; aumento de Th1, Th17 y disminución de la respuesta T reguladora. Se desconoce la participación de la activación de linfocitos en la inflamación sistémica de la DMT2. **Objetivo:** Determinar la participación de los linfocitos T y B activados de sangre periférica en la inflamación sistémica en ratones con DMT2. **Material y métodos:** Se usó un modelo de DMT2 en ratones macho de la cepa C57BL/6 a los que se les inhibió la activación de los linfocitos con CTLA4-Ig. Se determinó el perfil glucémico, la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y linfocitos B por medio del marcador de activación CD69 y la producción de TNF- $\alpha$  en sangre y médula ósea. Se estudiaron las poblaciones de eosinófilos y células presentadoras de antígeno por citometría de flujo. **Resultados:** Los ratones diabéticos presentaron hiperglicemia, resistencia a la insulina, incremento de las citocinas proinflamatorias séricas TNF- $\alpha$ , IL-6 y disminución de la citocina reguladora IL-10. El CTLA4-Ig inhibió la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> en sangre periférica y en médula ósea, además los linfocitos CD4 productores de TNF- $\alpha$  y un incremento de linfocitos CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> reguladores en este sitio, disminuyó la concentración sérica de TNF- $\alpha$ , IL-6 e incremento la concentración de IL-10, interesantemente, disminuyó la hiperglicemia y la resistencia a la insulina en los ratones diabéticos. **Conclusiones:** Los linfocitos CD4<sup>+</sup> activados de médula ósea y sangre periférica participan en las alteraciones metabólicas e inflamatorias de la DMT2.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. *Diabetes mellitus*

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica que se caracteriza por hiperglucemia, resistencia a la insulina y por una deficiencia absoluta o relativa en la secreción de esta hormona. (1)

Se estima que las cifras de prevalencia e incidencia aumenten en los próximos años por circunstancias relacionadas con el progresivo envejecimiento de la población, el incremento de las tasas de obesidad, seguimiento de dietas no saludables, vida sedentaria y la progresiva urbanización e industrialización. Todos estos factores hacen que, en el mundo en el año 2019, se diagnosticaran 463 millones de personas con DMT2 y tan solo en México la prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 fue de 12.8 millones de habitantes, ocupando el sexto lugar mundial (2), convirtiéndose en una de las principales preocupaciones del sector salud, ya que además representa la segunda causa de muerte en nuestro país (3). La DM aumenta el riesgo de desarrollar otros problemas de salud como cardiopatías, retinopatías, neuropatías, osteopatías, falla renal y amputación de las extremidades. (4)

De acuerdo con la Asociación Americana de Diabetes (5) esta enfermedad se clasifica en:

- **Diabetes mellitus Tipo 1 (DMT1):** Representa solo del 5 al 10% de las personas diabéticas. Es ocasionada por la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas y se caracteriza por la deficiencia absoluta de insulina, cetoacidosis e hiperglucemia severa (5).
- **Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2):** Representa del 90-95% de las personas con diabetes, se caracteriza por resistencia y deficiencia relativa de insulina y por hiperglucemia. La mayoría de los pacientes con este tipo de diabetes padecen obesidad y sus hábitos son sedentarios, por lo que desarrollan resistencia a la insulina, incremento en los niveles de glucosa en sangre y

con el paso del tiempo provoca una falla en la función de las células  $\beta$  del páncreas y el déficit en la producción de insulina. (5,6)

La resistencia a la insulina en la grasa visceral conduce a un aumento en la producción de ácidos grasos, lo que exacerba la resistencia a la insulina en el hígado y los músculos. Las células  $\beta$  del páncreas compensan la resistencia a la insulina segregando más insulina, pero en última instancia las células  $\beta$  ya no puede compensar, por lo que hay un deterioro de la tolerancia a la glucosa y finalmente el desarrollo de diabetes.

- **Diabetes mellitus gestacional:** Inicia después del tercer trimestre de embarazo, se presentan las mismas anomalías fisiológicas que caracterizan a la DMT2. Las mujeres con este tipo de diabetes tienen un alto riesgo de permanecer con la enfermedad después de la gestación. (5,7)

### ***1.2 Participación de los linfocitos T en la DMT2***

Se ha establecido que tanto la DMT2 como la obesidad pasan por un estado inflamatorio crónico de bajo grado, como consecuencia del incremento en la masa del tejido adiposo y la producción de citocinas proinflamatorias. En este proceso participan distintas células del sistema inmune. Las más estudiadas han sido los macrófagos y monocitos, pero recientemente se ha reportado la participación de otras células, como neutrófilos, mastocitos, eosinófilos, células dendríticas, NK, e incluso células del sistema inmune adaptativo, como los linfocitos Th1, Th2, Treg, Th17 y células B. (8). Se ha informado de alteraciones del funcionamiento de los leucocitos, como adherencia, quimiotaxis y actividad bactericida, y citotoxicidad de las células NK (9-11). Si bien la respuesta de los anticuerpos suele estar intacta, las funciones de las células T se ven parcialmente afectadas (12-13). Sin embargo, todavía existe una gran controversia en torno a estos hallazgos.

Desde que se reportó un incremento de células CD3+ en tejido adiposo de ratones y humanos obesos, relacionados con resistencia a la insulina e inflamación (14),

ha habido un aumento en la evidencia de la participación de las células CD4+ y CD8+ con el inicio y progresión de la obesidad y DMT2.

Cuando las células CD8+ son transferidas a ratones CD8<sup>-/-</sup> (deficientes de linfocitos CD8+) se incrementa la infiltración de macrófagos M1 al tejido adiposo, los niveles de expresión de IL-6 y TNF- $\alpha$  y se agrava la intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina (20). Esto sugiere que la obesidad promueve la activación de células T CD8+ en el tejido adiposo, que, a su vez, conduce al reclutamiento, diferenciación y activación de los macrófagos a través de mediadores proinflamatorios, lo que lleva finalmente a la resistencia a la insulina y la DMT2.

Las células Treg también han sido identificadas en tejido adiposo y han sido relacionadas con resistencia a la insulina y obesidad. La caracterización de las células Treg del tejido adiposo revela una población distinta de otros órganos linfoides, caracterizándose por la capacidad de producción de niveles altos de la citocina antiinflamatoria IL-10 (16).

Estudios en humanos han mostrado que la producción de IL-17 por células T se correlaciona con la severidad de la intolerancia a la glucosa, aunado a una baja cantidad de células Treg (17). Además, células T de donadores con DMT2 obesos muestran un incremento significativo de IL-17 al ser estimuladas in vitro, comparadas con células de donadores obesos sin DMT2.

### ***1.3 Proceso de activación de linfocitos T***

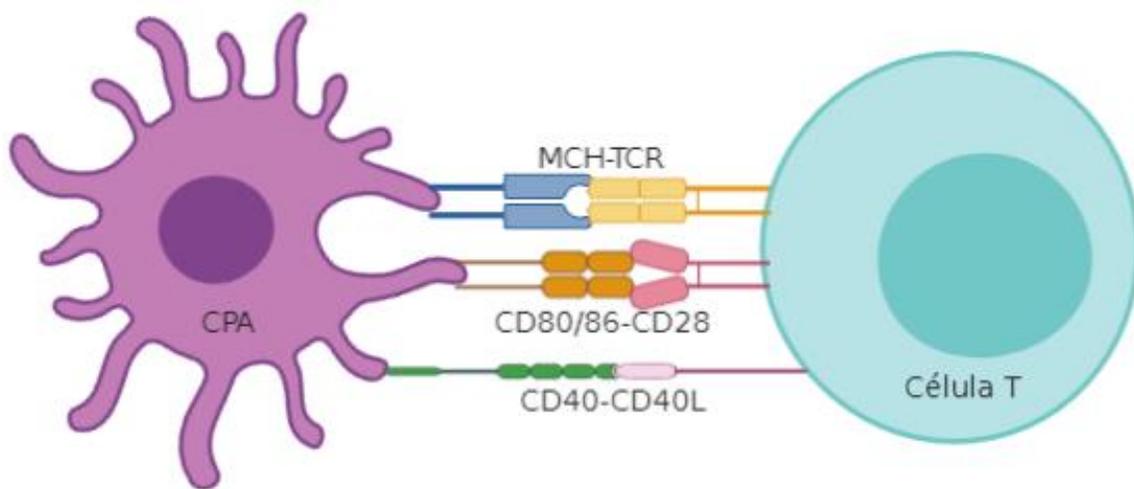
La activación de los Linfocitos T inicia con la presentación de un antígeno por parte de una célula presentadora (CPA) como célula dendrítica o un macrófago a un linfocito T virgen en un órgano linfático secundario, que puede ser el bazo, placas de Peyer o el nódulo linfático más cercano al sitio de lesión o del estímulo inicial. Las CPA procesan fragmentos del antígeno y lo presentan por medio del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), este es reconocido por el receptor de células T (TCR) específico. El MHC de clase II se unirá al TCR de una célula T auxiliar CD4+, mientras que el MHC de clase I se unirá al TCR de una célula T

citotóxica CD8+. Para que la presentación de antígeno produzca la activación y no anergia del linfocito T, es esencial que la presentación permanezca estable y que el linfocito T reciba co-estimulación. El CD40 y CD80/86 son moléculas coestimuladoras presentes en las CPA que se unen a su receptor CD40L y CD28 respectivamente en los linfocitos T. (Fig. 1) (18)

La presentación del antígeno y su co-estimulación inducen vías de señalización en el linfocito T que, por un lado, estimula su proliferación clonal y por otro, lo activan para la producción de citocinas. Una vez que el linfocito es coestimulado y activado en el sitio linfático secundario, este puede salir a través de la circulación linfática al sitio de la lesión. (19)

Un linfocito activado expresa en su superficie marcadores de activación, que son proteínas receptoras, coestimuladoras, moléculas de adhesión, receptores de quimiocinas o de MHC. Los marcadores de activación tempranos en los linfocitos T son CD69 y CD25:

- CD69 es conocido como el *antígeno de activación temprana* y es una glicoproteína que actúa como un receptor de membrana altamente expresado en linfocitos T activos, linfocitos B, asesinas naturales (NK), neutrófilos, eosinófilos entre otras células presentes en regiones de inflamación. (20) Se conoce como uno de los marcadores que se expresan más rápidamente tras la activación de los linfocitos T, B y NK (21) y su rápida expresión sugiere que puede aumentar la activación y/o diferenciación de los linfocitos T.
- CD25 es la cadena alfa del receptor de interleucina-2. Es expresada en la superficie de linfocitos T maduros activados, linfocitos B, monocitos y macrófagos. Cuando se activa el linfocito CD4+, ellos mismos secretan IL-2 y expresan el CD25 en la superficie, de forma que la IL2 tiene una función autocrina para inducir la proliferación clonal. (22)



**Figura 1.** Moléculas de co-estimulación en la activación de linfocitos T.  
**Elaboración propia**

#### ***1.4 CTLA-4-Ig, inhibidor de la activación de linfocitos T***

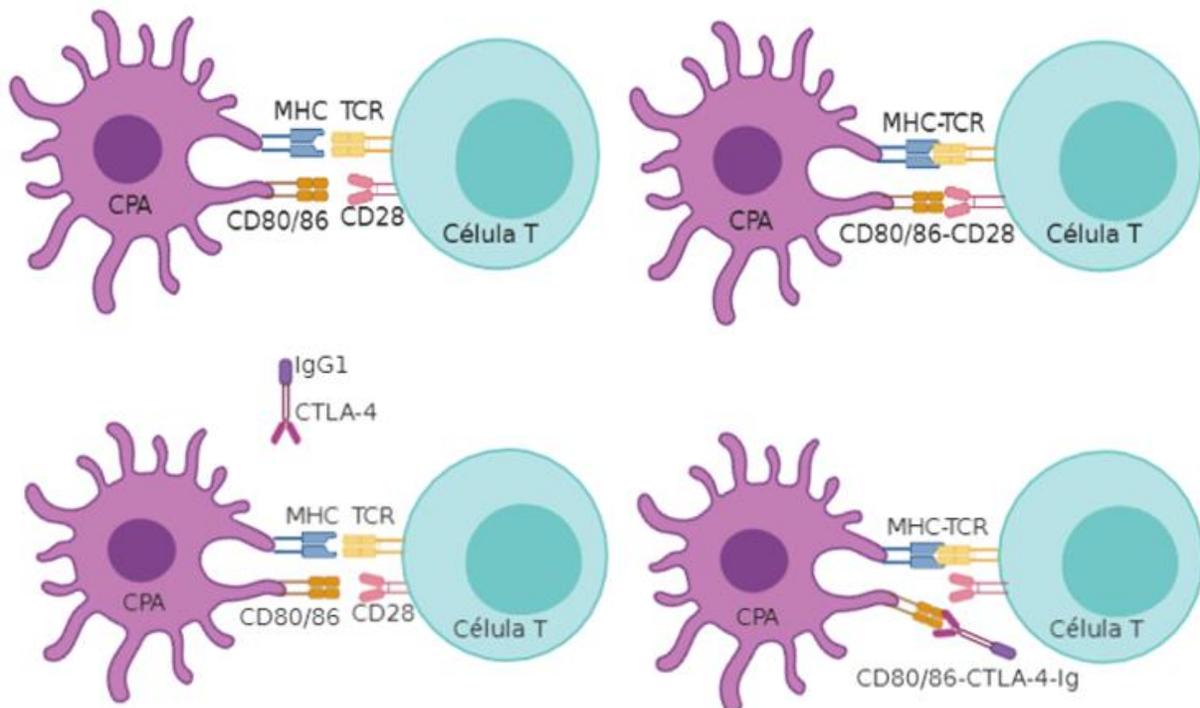
El CTLA-4-Ig (Abatacept) es un regulador de la co-estimulación e inhibe la activación de las células T al interferir con la interacción de CD80 / 86 en las células presentadoras de antígeno con CD28 en las células T (23). El CTLA-4-Ig se une a la superficie de las células presentadoras de antígeno, como las células dendríticas y los macrófagos a través de CD80 / 86. Los monocitos pueden diferenciarse en los osteoclastos, las células primarias que reabsorben los huesos. (Fig. 2). (24)

La activación de los dos subgrupos de células T, CD4+ y CD8+ depende de la co-estimulación del receptor CD28. Las células T CD4+. Éstas, reconocen los péptidos ofrecidos por las moléculas de la clase II del MHC presentes en las CPA.

Ambos subtipos de células T son activados mediante la co-estimulación con CD28, aunque la activación de las células T CD8+ es menos dependiente de esta vía de co-estimulación. De hecho, mientras todas las células CD4+ expresan el receptor CD28 en su membrana, esto sólo ocurre en alrededor del 50% de las

CD8+. Además, las células CD4+ han demostrado exhibir una mayor respuesta a la unión a CD28 (25).

La activación de las células T CD4+ es el punto de partida de una cascada de fenómenos proinflamatorios con producción de gran cantidad de citocinas y proliferación celular que, en caso de perpetuarse de forma mantenida da lugar a



una inflamación crónica muy activa.

**Figura 2. Mecanismo de acción del Abatacept:** CPA: célula presentadora de antígeno; MHC: complejo principal de histocompatibilidad; TCR: receptor de células T. **Elaboración propia**

## 2. ANTECEDENTES

En los pacientes con DMT2 se han reportado alteraciones en las poblaciones, observando un desbalance en las células de tipo Th1, Th17 y Treg (26)

Principalmente se ha observado un incremento en las células Th17 y Th1, así como una disminución en la población Treg, lo cual promueve la inflamación y la resistencia a la insulina (17).

Al igual que los pacientes con DMT2, la DMT1 también muestra alteraciones en la población de Th17 y disfunción en las células Treg. Sin embargo, estas condiciones sólo se observaron en los nódulos pancreáticos, no así en sangre periférica (27).

Recientemente, estudios han revelado la participación de las células B en la regulación de la inflamación en la DMT2, ya que estas células activan de manera directa a las T, promoviendo un proceso inflamatorio (28). Las células B aisladas de sangre periférica de pacientes con DMT2 producen niveles elevados de IL-8, en comparación con sujetos sanos (29). En modelos animales con DMT1 se determinó que la muerte de las células B del páncreas induce la activación y el reclutamiento de neutrófilos y células dendríticas. Se lleva a cabo una serie de señales intracelulares que culminan con la liberación de IFN-  $\alpha$ , promoviendo así el desarrollo de la enfermedad (30).

La implicación de células T en la obesidad y DMT2 es muy importante debido a su papel crucial en diversos procesos inflamatorios (31-32). Desde que se reportó un incremento en la frecuencia de células CD3+ en tejido adiposo de ratones y humanos obesos, relacionados con resistencia a la insulina e inflamación (14), ha habido un aumento en la evidencia de la participación de las células CD4+ y CD8+ con el inicio y progresión de la obesidad y DMT2.

Uno de los principales mecanismos de defensa del sistema inmunológico innato contra la infección microbiana es la producción de citocinas proinflamatorias para eliminar los patógenos invasores. Se examinó si esta función está intacta o no en pacientes con DMT2. Cuando se estimularon las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con diferentes dosis de lipopolisacárido (LPS), un patrón molecular asociado a patógenos (PAMP), la respuesta a la dosis de LPS de la secreción de TNF- $\alpha$  no fue estadísticamente diferente entre los grupos de

control de DMT2 y sanos. En este mismo estudio se analizaron monocitos, las células NK, linfocitos T y linfocitos B, que se dividieron en células vírgenes y de memoria mediante la expresión de CD27. Los pacientes con DMT2 tenían frecuencias similares de células T, incluidos los subconjuntos de células T CD4+ y CD8+, células NK, monocitos en comparación con los individuos control. El porcentaje de células B totales y subconjuntos B vírgenes fue mayor en DMT2 que en la población control, mientras que lo contrario ocurrió en el subconjunto de células B de memoria. Entre las cuatro subpoblaciones de células T CD4+ y CD8+, la proporción de células efectoras fue mayor en DMT2 que en el grupo de control (33). En pacientes con DMT2, se encontró que no había diferencias en la composición de los subconjuntos de células T CD4+ en comparación con el grupo control. Sin embargo, hay varios informes anteriores que sugieren que las frecuencias de Th1 y Th17 están elevadas en la sangre de las personas con DMT2 en comparación con los sujetos de control. (26,34-35)

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La inflamación provocada por la hiperglicemia en la DMT2 a nivel sistémico, manifestada por el incremento de citocinas proinflamatorias séricas, podría ser debido al incremento de linfocitos T efectores o activados productores de citocinas en diferentes tejidos como en sangre o médula ósea. El conocimiento sobre el desarrollo y origen la inflamación en la DMT2 podría servir para identificar blancos terapéuticos para el tratamiento de la DMT2 y sus complicaciones como las cardiopatías, retinopatía, neuropatías o de la enfermedad periodontal.

## 4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La inhibición de la activación de linfocitos T disminuye la concentración sérica de citocinas proinflamatorias en un modelo murino de DMT2?

## 5. HIPÓTESIS

Si ratones con DMT2 son tratados con el inhibidor de la activación de linfocitos T, CTLA4-Ig se disminuirán las citocinas proinflamatorias séricas

## 6. OBJETIVOS

### *General*

Evaluar la influencia de la activación de linfocitos T de sangre periférica en la concentración sérica de citocinas proinflamatorias en ratones con diabetes tipo 2.

### *Particulares*

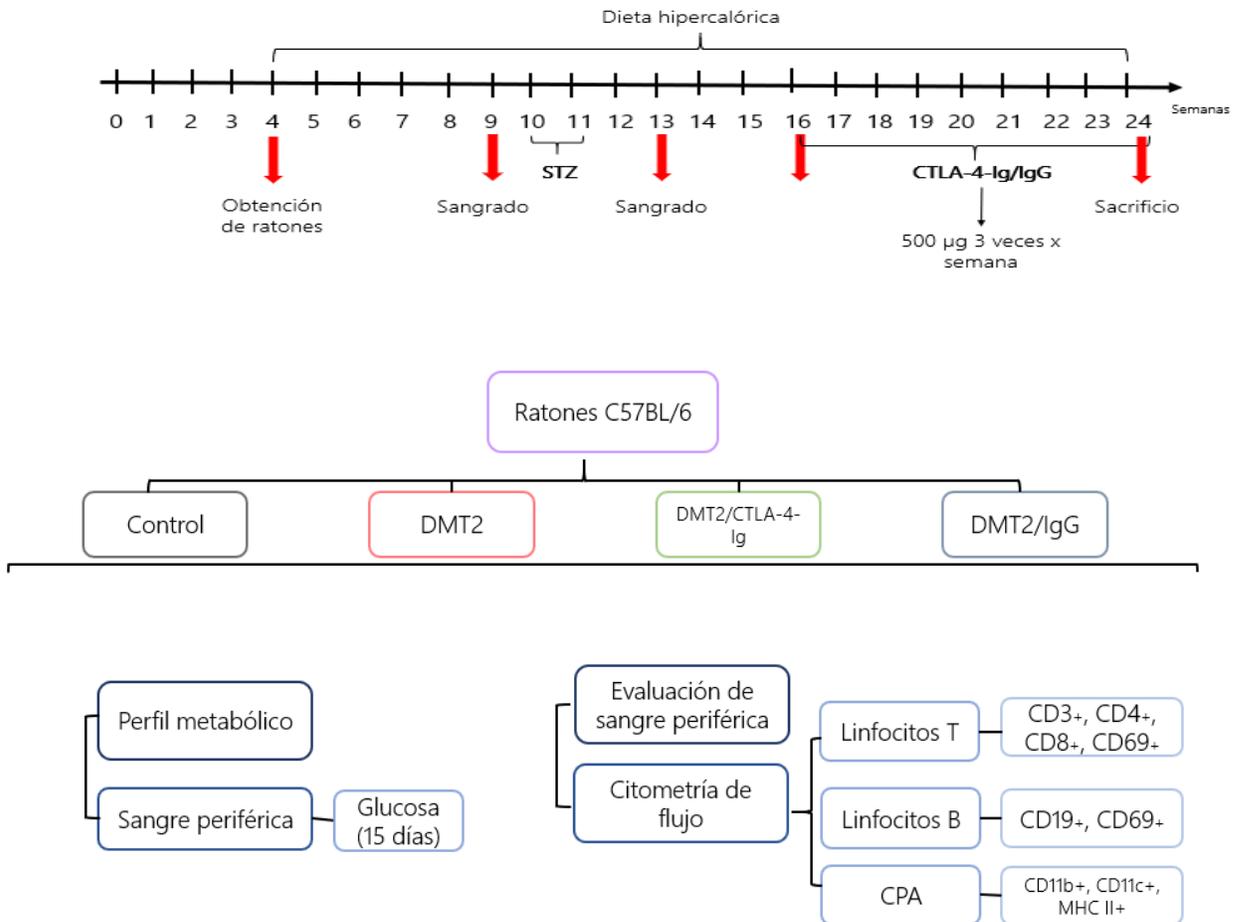
En un modelo murino de DMT2, tratado con el inhibidor de la activación de linfocitos T (CTLA4-Ig) o IgG como control de Isotipo:

1. Determinar la influencia de la inhibición de la activación de linfocitos T en la DMT2 por medio de medir la glucemia y la sensibilidad a insulina.
2. Determinar la activación de linfocitos T y B de sangre periférica y médula ósea por medio de citometría de flujo.
3. Determinar el estado inflamatorio sistémico a través de la cuantificación de citocinas de perfil Th1, Th2 y Th17



## 7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos planteados, se diseñó una estrategia experimental en donde se resumen los métodos utilizados para la obtención de resultados.



## 8. MATERIAL Y METODOS

### **Modelo experimental**

Se utilizaron 24 ratones de la cepa C57BL/6 de cuatro semanas de edad, obtenidos del Laboratorio de Investigación Odontológica de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Los cuáles se dividieron al azar en cuatro grupos experimentales: uno sano (n=6), y tres a los que se les indujo DMT2 (n=6 por grupo). Se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas con acceso libre de agua y alimento.

La DMT2, se indujo a través de la administración de una dieta de cafetería para provocar obesidad y resistencia a la insulina desde las 4 semanas, hasta el momento del sacrificio (24 semanas de edad) y por la administración intraperitoneal con bajas dosis de estreptozocina (SZC) durante 7 días, a partir de las 10 semanas de edad (36), esto con el objetivo de provocar una deficiencia parcial de insulina que se asemeja a lo presentado en la DMT2. En concreto, el primer día se administra una dosis de 50mg/Kg y los días 2-7 se administra una dosis de 25mg/Kg. Los ratones se consideran diabéticos al alcanzar una concentración de glucosa sanguínea por encima de 250mg/dL.

Como control negativo en la activación de linfocitos T, dos de los grupos a los que se les inducirá diabetes, son tratados con CTLA4-Ig (Abatacept, Ohrenia, Bristol Myers) o con IgG de humano (Sigma) como control isotipo (500 µg por ratón, tres veces a la semana), durante cuatro semanas a partir de las 19 semanas de edad. la

Al momento del sacrificio, se obtuvieron cuidadosamente la sangre periférica por punción intracardiaca y la médula ósea, que se utilizará para evaluar los linfocitos activos y la concentración de citocinas por medio de citometría de flujo.

### ***Composición dietética***

Los ratones a los cuales se les indujo la DMT2, fueron alimentados con pellets modificados de acuerdo con lo reportado por do Nascimento et al., 2013, que

tienen un contenido de 20% de alimento estándar (Teklad 2018s, ENVIGO), 13.95% de chocolate, 13.95% cacahuates, 6.97% galletas y 44.2% de leche condensada azucarada, suplementada con agua de chocolate ad libitum. A los ratones control, se les administró dieta estándar y agua ad libitum. El contenido dietético de ambos tipos de dieta se muestra en la tabla.

	Dieta hipercalórica (100g)	Dieta estándar (100g)
Kcal	332.25	100
Proteínas (g)	17.47	18.6
Lípidos (g)	28.3	6.2
Carbohidratos (g)	55.5	44.2

Dieta hipercalórica: Contenido energético: 3.32 Kcal/g

Pellets de LabDiet 5010	37.5%	15% proteína
Cacahuates	25%	46.5% grasa
Galletas	12.5%	38.5% Carbohidratos
Leche condensada	25%	
Agua con chocolate (50g/L)		

Dieta estándar: Contenido energético: 1 Kcal/g

Proteína	20%
Carbohidratos	70%
Grasa	10%
Agua embotellada	

**Tabla 1.** Información nutrimental de la dieta de cafetería utilizada para inducir obesidad y de la dieta estándar utilizada como control experimental.

## **Medición de la glucemia**

Se realizaron curvas de resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa, una semana después de la administración de SZC, a las 13 semanas de experimentación y una semana antes del sacrificio; para la toma de glucosa, se dejaron a los ratones en ayuno durante 4-6 horas.

El procedimiento consiste en realizar una incisión de la vena safarena lateral de la cola y se determinó la concentración de glucosa sanguínea con un glucómetro Accu-Check en los minutos 0, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 después de que se administró la glucosa (1g/Kg de peso del ratón) o la insulina (0.5 U/Kg de peso de ratón) según sea el caso. De la sangre restante se obtendrá el suero sanguíneo por medio de centrifugación y se midieron los niveles de insulina.

### ***Medición de peso, circunferencia abdominal e índice de masa corporal***

Se pesaron diariamente los ratones. Y cada semana se midió la circunferencia abdominal y la talla bajo los efectos de la anestesia inhalada (isoflurano) obteniendo el índice de masa corporal (IMC) mediante la fórmula peso/talla.

### ***Citometría de flujo***

Se caracterizaron las poblaciones de linfocitos, y células presentadoras de antígeno por citometría de flujo. Al momento del sacrificio, se aislaron los leucocitos de sangre periférica por gradiente de densidad con Histopaque y las células de médula ósea del fémur de los ratones. Las células obtenidas se tiñeron con anticuerpos acoplados a fluorocromos para identificar las poblaciones celulares de linfocitos y APC's: CD3<sup>+</sup>/PE, CD4<sup>+</sup>/FITC, CD8<sup>+</sup>/PerCP; CD19<sup>+</sup>/APC Cy7 y CD69<sup>+</sup>/Alexa 700; CD11b<sup>+</sup>/APCCy7, CD11c<sup>+</sup>/FITC y MHCII<sup>+</sup>/PECy5. Se capturaron 30 000 eventos con el citómetro de flujo FACSAria III (BD) y el software BD FACSDiva. Los datos se analizarán con el software FlowJo 10.6.2

### ***Cuantificación de citocinas pro-inflamatorias***

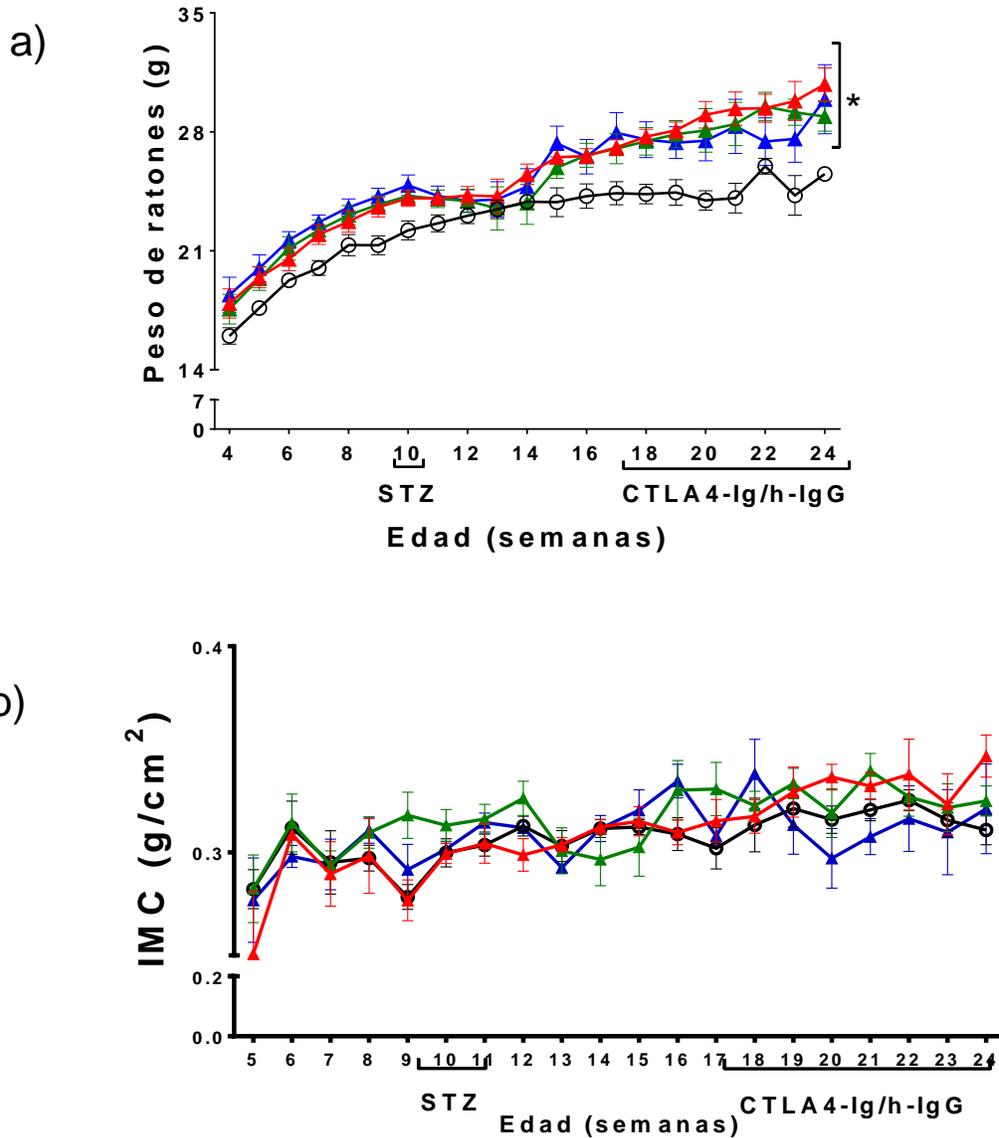
Cuantificamos las concentraciones séricas de IL-2, IL4, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17A e IL-10 con un arreglo de perlas con el kit comercial “BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit” (BD Biosciences, San José CA, EE. UU.), en un citómetro de flujo (FACSAria III, BD).

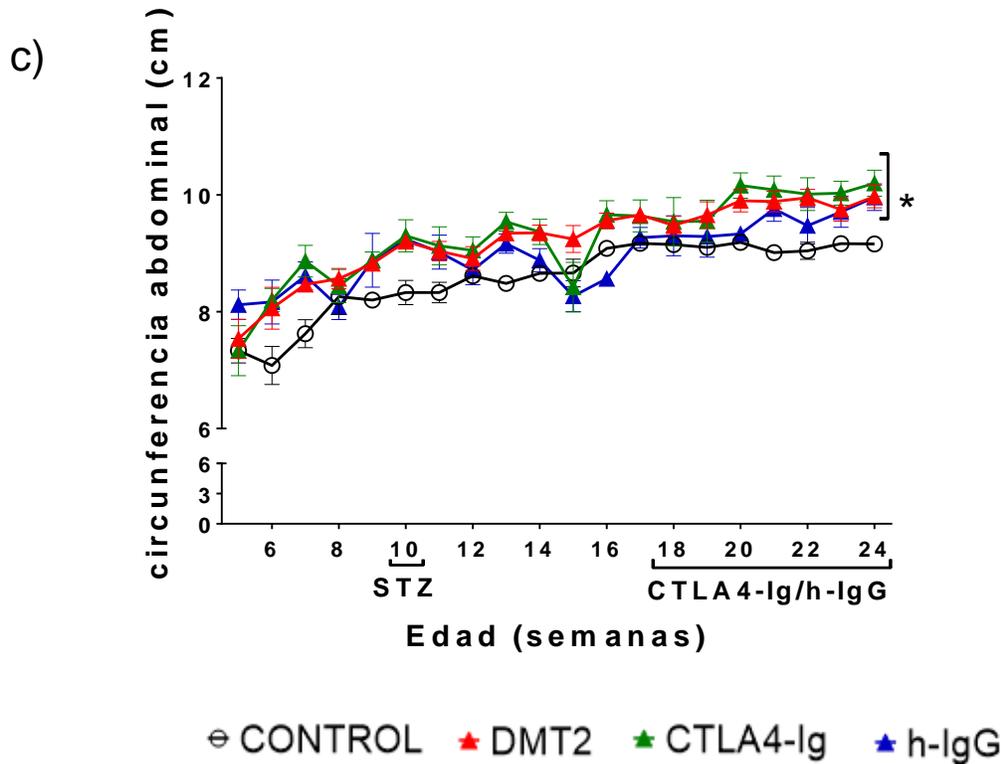
### ***Análisis estadístico.***

Todos los grupos experimentales, tuvieron una n de 6. Se analizaron la distribución de los datos y se determinó las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguido por el post-hoc de Tukey, utilizando el software GraphPad Prism 6. Las diferencias se considerarán estadísticamente significativas si  $*p \leq 0.05$ .

## 9. RESULTADOS

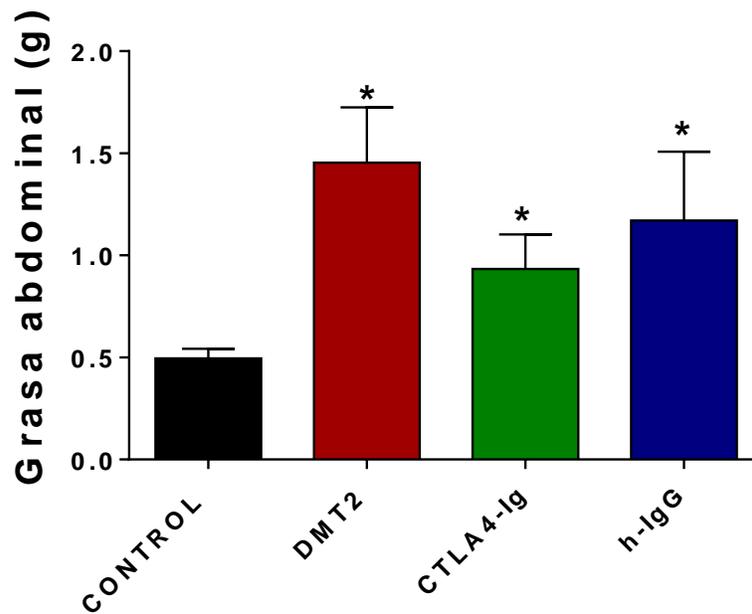
Los resultados mostraron que los ratones con DMT2, DMT2-CTLA-4 y DMT2-IgG tuvieron un incremento significativo en el peso, el índice de masa corporal (IMC) y la circunferencia abdominal en comparación con los ratones controles (Figura 3).





**Figura 3.** Resultados de las mediciones de a) peso, b) índice de masa corporal y c) circunferencia, obtenidos de los diferentes grupos experimentales: DMT2, CTLA-4, Control. Los gráficos representan la media  $\pm$  EEM. \* $p \leq 0.05$  vs control

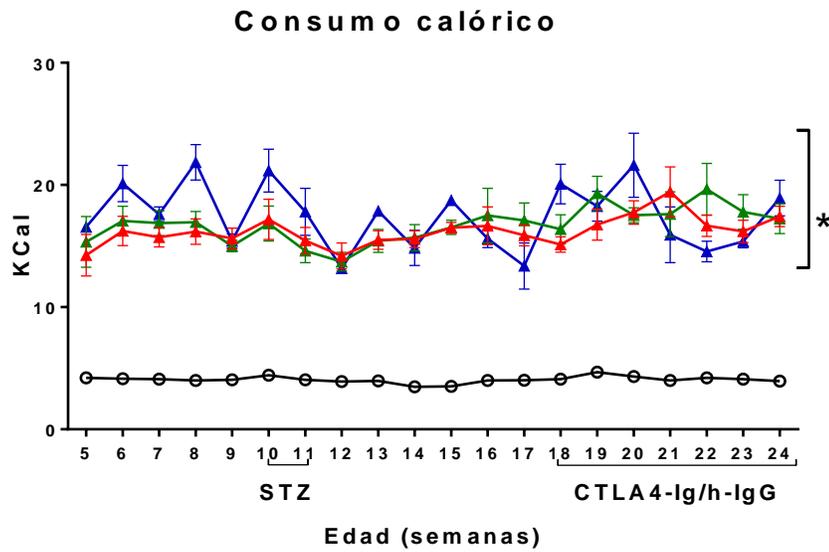
Al momento del sacrificio se obtuvo el tejido adiposo abdominal de todos los ratones, observando que los ratones con DMT2 presentaron un mayor contenido de tejido adiposo en comparación con el control sano, lo que demuestra que estos ratones desarrollaron obesidad (Figura 4).



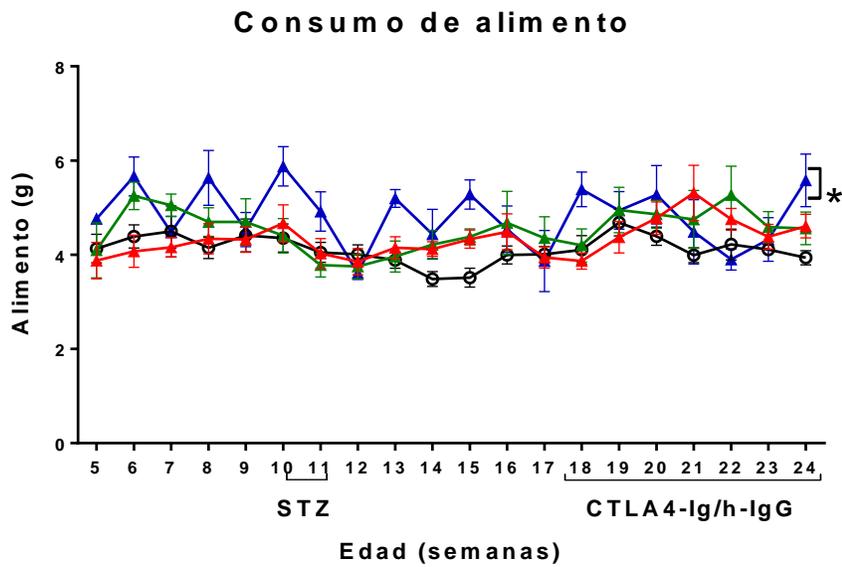
**Figura 4.** Resultados de la grasa abdominal obtenida al momento del sacrificio de los diferentes grupos experimentales: DMT2 (n=9), CTLA-4 (N=5), Control (n=13). Los gráficos representan la media  $\pm$  EEM: DMT2 \* $p \leq 0.05$  vs control

El incremento en el peso, IMC, circunferencia abdominal e incremento en el tejido adiposo es consistente con el incremento de consumo calórico en los grupos experimentales (Figura 5).

a)



b)

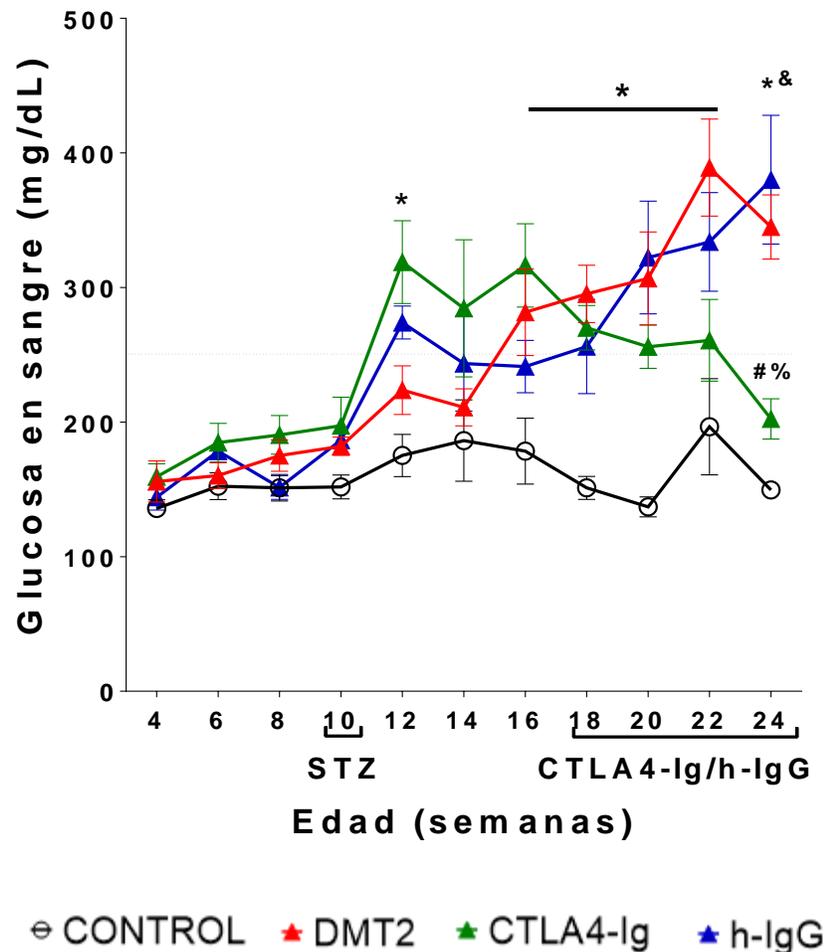


○ CONTROL    ★ DMT2    ★ CTLA4-Ig    ★ h-IgG

**Figura 5.** Resultados de a) consumo calórico y de b) alimento obtenido de los diferentes grupos experimentales: DMT2, CTLA-4, Control. Los gráficos representan la media  $\pm$  EEM \* $p \leq 0.05$  vs control

Los ratones de los grupos DMT2 y DMT2/h-IgG desarrollaron hiperglucemia en comparación con los ratones sanos, lo que indica el establecimiento de DMT2. Por

el contrario, la administración de CTLA4-Ig provocó una disminución en los niveles de glucosa en los ratones diabéticos ( $\leq 200$  mg/dL) (Figura 6)



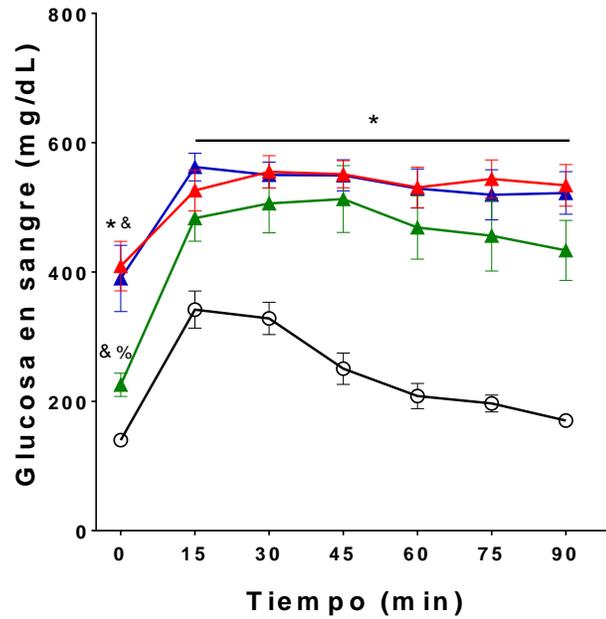
**Figura 6.** Niveles de glucosa en los diferentes grupos de estudio. Los gráficos representan la media  $\pm$  EEM. \* $p \leq 0.05$  vs control; #  $p \leq 0.05$  vs DMT2; &  $p \leq 0.05$  vs CTLA4-Ig; %  $p \leq 0.05$  vs-h-IgG

Para determinar si el incremento de glucosa en los ratones con DMT2 y la disminución en los ratones tratados con CTLA-4 se debía a alteraciones en el metabolismo de la glucosa y la resistencia a la insulina, se realizaron ensayos de tolerancia a la glucosa y tolerancia a la insulina. Los ratones de los grupos DMT2 y DMT2/h-IgG tuvieron intolerancia a la glucosa, y una menor sensibilidad a la insulina en comparación con los ratones sanos, la administración de CTLA4-Ig

mostraron una mayor sensibilidad a la insulina en comparación con los ratones de los grupos DMT2 y DMT2/h-IgG (Figura 7)

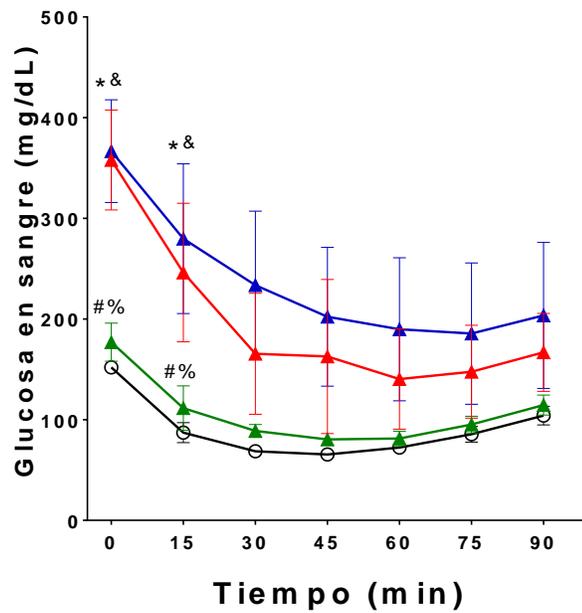
### Ensayo de tolerancia a la glucosa

a)



### Ensayo de tolerancia a la insulina

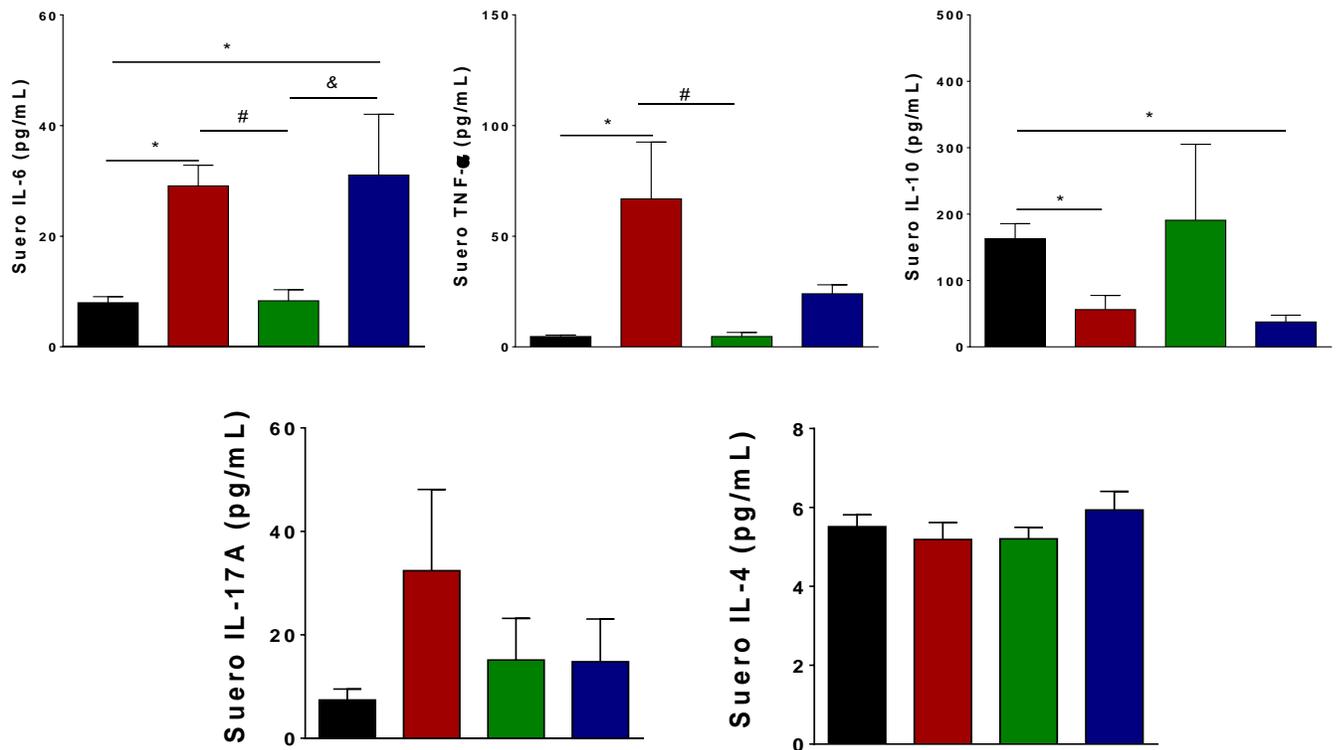
b)



○ CONTROL    ★ DMT2    ★ CTLA4-Ig    ★ h-IgG

**Figura 7.** Resultados del a) ensayo de tolerancia a la glucosa y b) tolerancia a la insulina, obtenidos de los diferentes grupos experimentales: DMT2, CTLA-4, Control. Los gráficos representan la media  $\pm$  EEM. \* $p \leq 0.05$  vs control; #  $p \leq 0.05$  vs DMT2; &  $p \leq 0.05$  vs CTLA4-Ig; %  $p \leq 0.05$  vs-h-IgG

Determinamos los niveles de citocinas pro y anti-inflamatorias en el suero dado que se ha demostrado que los pacientes con DMT2 presentan un estado inflamatorio crónico de bajo grado, el cual se sabe participa en la fisiopatología de la DMT2 y en la activación de las células inmunitarias como los linfocitos. Los ratones con DMT2 tuvieron un incremento significativo en la concentración de TNF- $\alpha$ , IL-6 y una disminución significativa de la IL-10 en comparación con los ratones sanos, lo que sugiere un estado inflamatorio sistémico. Contrariamente, la administración de CTLA4-Ig redujo la concentración de TNF- $\alpha$  y de IL-6 e incrementó la concentración de IL-10 en comparación con los ratones de los



grupos DMT2 Y DMT2/h-IgG (Figura 8)

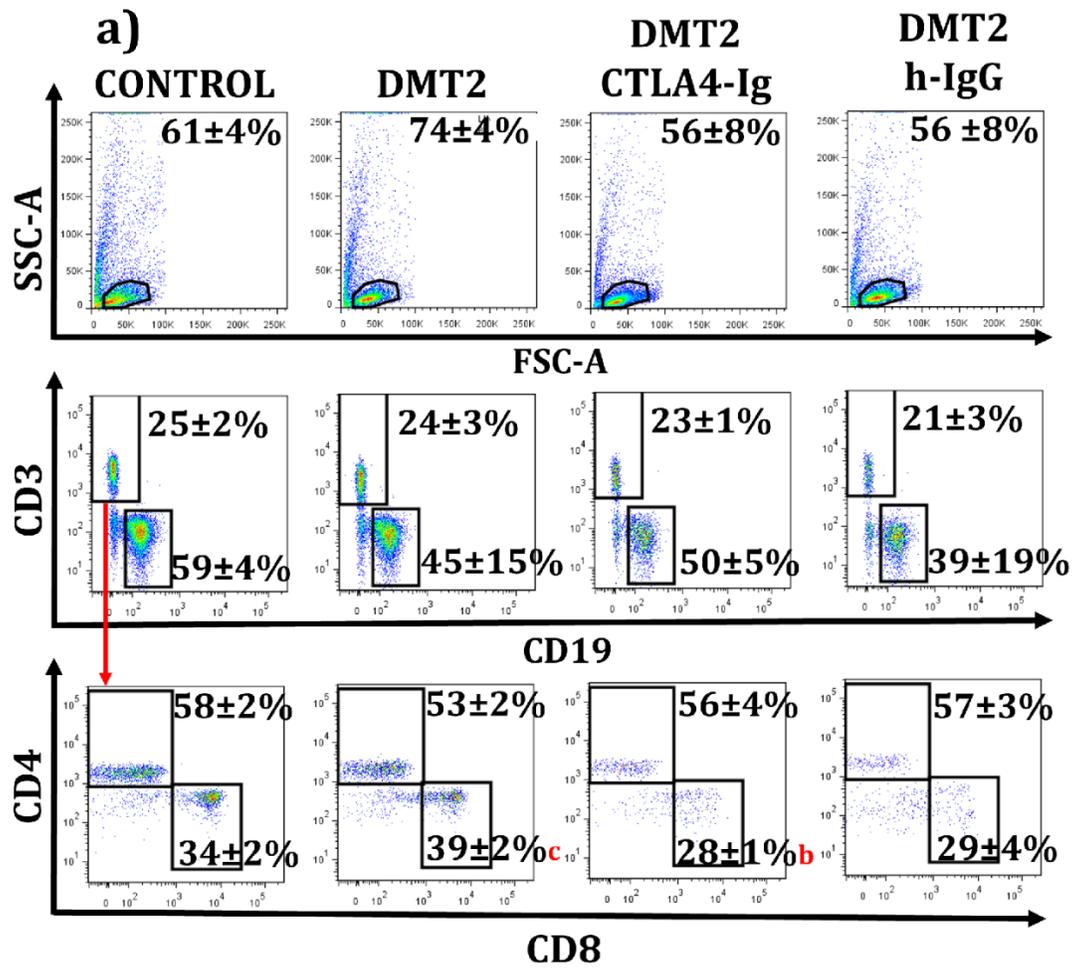
■ CONTROL ■ DMT2 ■ CTLA4-Ig ■ h-IgG

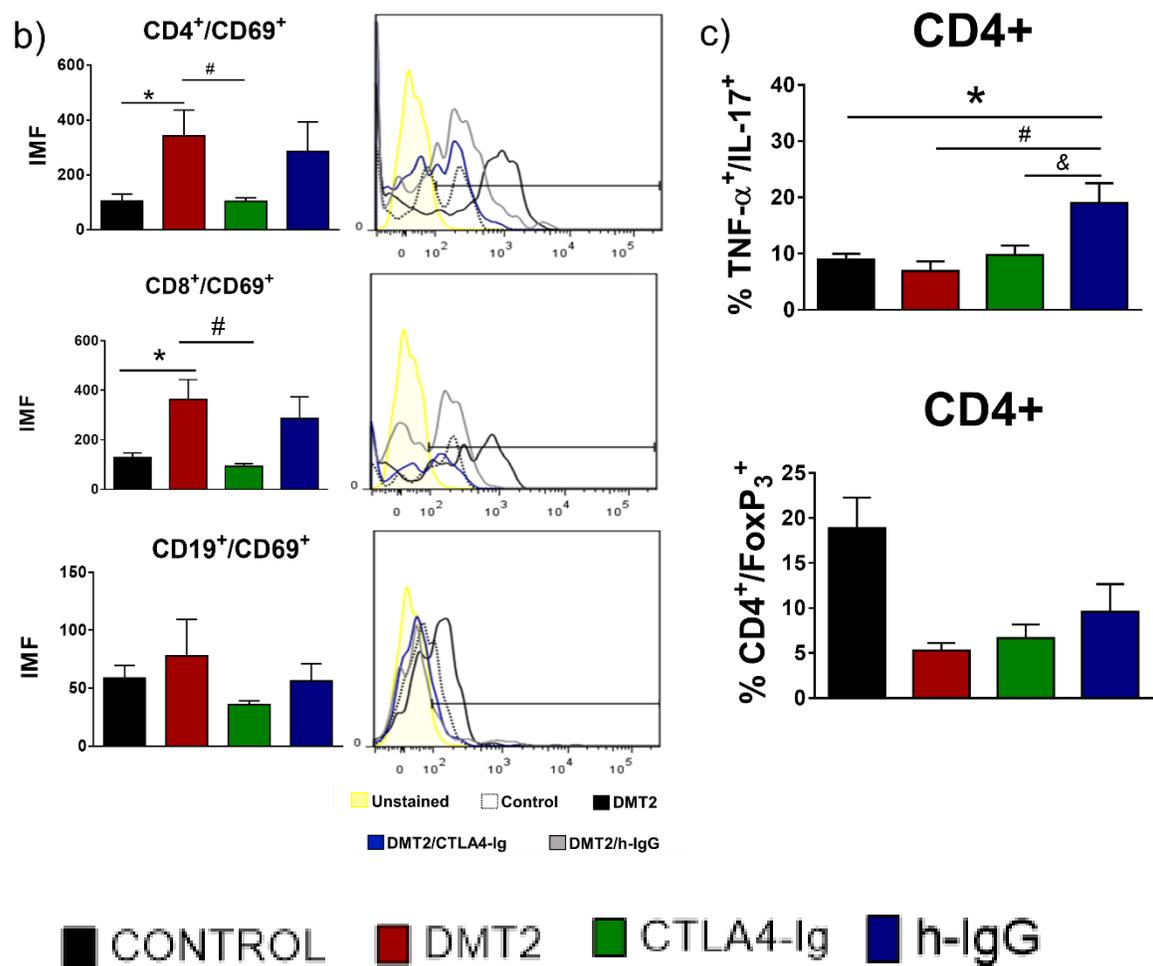
**Figura 8.** Resultados de la cuantificación de citocinas en suero obtenidos de los diferentes grupos experimentales: control. Los gráficos representan la media  $\pm$  EEM. \* $p \leq 0.05$  vs control; #  $p \leq 0.05$  vs DMT2; &  $p \leq 0.05$  vs CTLA4-Ig; %  $p \leq 0.05$  vs-h-IgG

Con el objetivo de determinar las células que podrían estar promoviendo la inflamación sistémica y debido a que se ha propuesto que las células inmunes activadas pueden migrar a la médula ósea por circulación sanguínea, analizamos las poblaciones de linfocitos T y B y células presentadoras de antígeno en sangre periférica.

Los ratones del grupo DMT2 tuvieron el mismo porcentaje en las poblaciones de linfocitos T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y de linfocitos B CD19<sup>+</sup> que los ratones sanos (Figura 9). Sin embargo, hubo un incremento en la expresión del marcador de activación CD69 en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> Además, los ratones diabéticos mostraron un incremento en la cantidad de linfocitos CD4<sup>+</sup> productoras de TNF- $\alpha$ , pero no de linfocitos Th17 o Tregs (Figura 9).

La administración de CTLA4-Ig en los ratones diabéticos mantuvo el porcentaje de las poblaciones de linfocitos, disminuyó la expresión del marcador de activación CD69 en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, y parece disminuir la cantidad de linfocitos CD4<sup>+</sup> productoras de TNF- $\alpha$  en comparación con los ratones del grupo DMT2. El control isotipo se comportó similar a los ratones diabéticos sin el inhibidor (Figura 9)





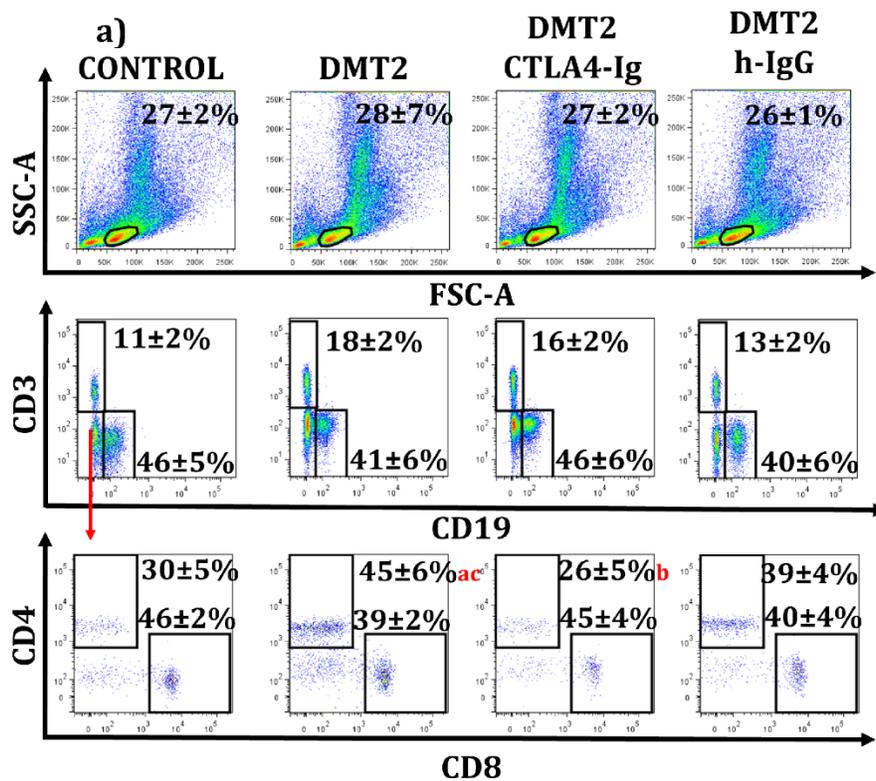
**Figura 9.** Resultados de la activación de linfocitos de sangre periférica. a) análisis del porcentaje de linfocitos T y B de sangre periférica, b) la intensidad media de fluorescencia del marcador de activación CD69 en las subpoblaciones de linfocitos T y en linfocitos B. c) gráficos de puntos representativos del análisis por citometría de flujo de las poblaciones de linfocitos Th17, CD4<sup>+</sup> productores de TNF y linfocitos Tregs. Los gráficos representan la media  $\pm$  EEM. \* $p \leq 0.05$  vs control; #  $p \leq 0.05$  vs DMT2; &  $p \leq 0.05$  vs CTLA4-Ig; %  $p \leq 0.05$  vs-h-IgG

Con el objetivo de identificar la posible participación de los linfocitos en la generación de un microambiente proinflamatorio en el tejido óseo analizamos la presencia de linfocitos activados en la médula ósea.

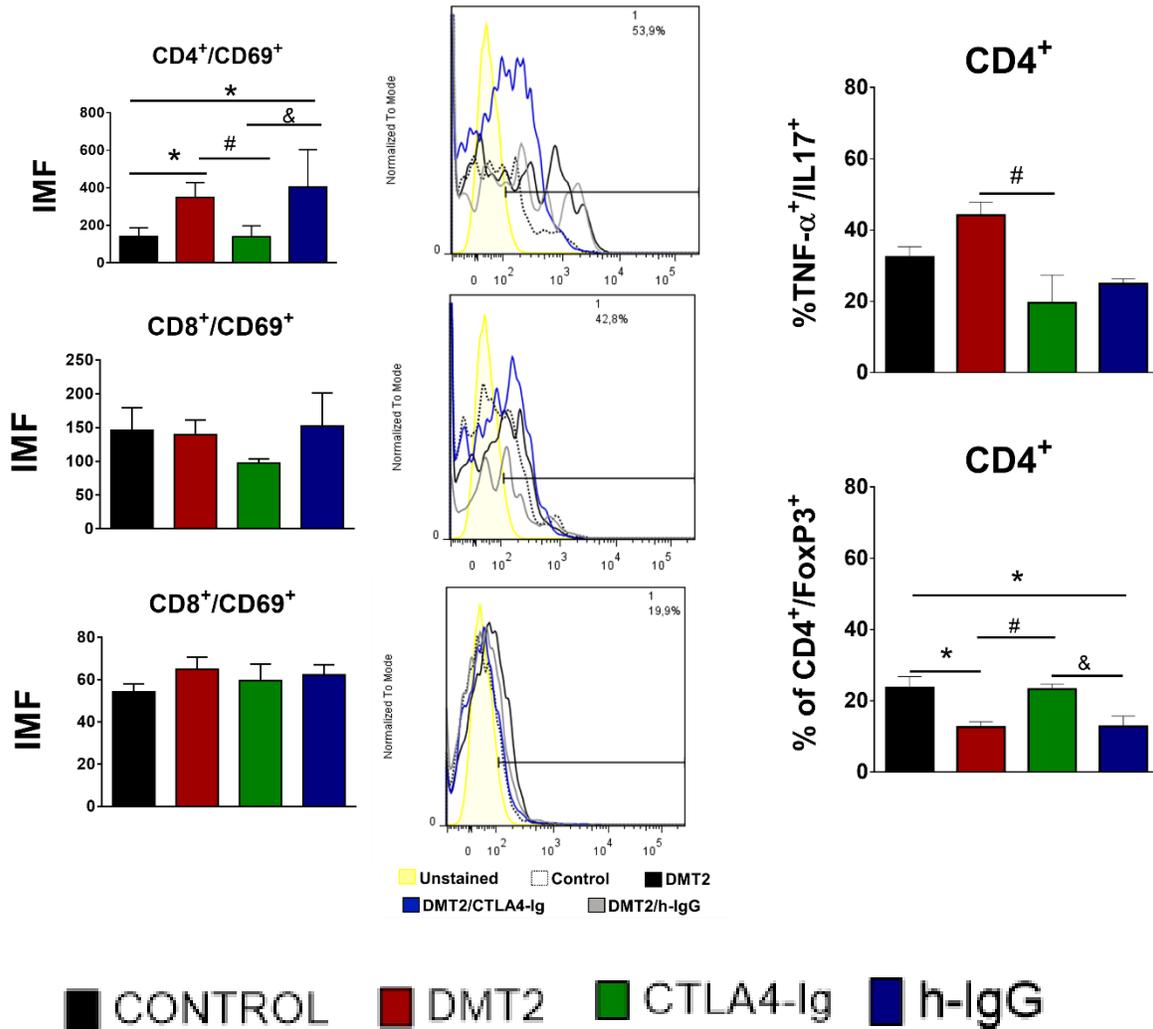
Los resultados obtenidos de los ratones del grupo DMT2 mostraron el mismo porcentaje en las poblaciones de linfocitos T CD3<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> y de linfocitos B CD19<sup>+</sup> pero con un incremento en el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. (Figura 10) Los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, tuvieron una mayor expresión de CD69, y observamos un

incremento de linfocitos Th17 y una disminución de Tregs, todo esto en comparación con los ratones sanos.

Los ratones del grupo DMT2/CTLA4-Ig presentaron una disminución en la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, una disminución en la expresión de CD69 en linfocitos T CD4<sup>+</sup>, una disminución de linfocitos Th17 y un incremento de linfocitos Tregs en comparación con los ratones diabéticos que no recibieron el inhibidor. El control isotipo se comportó similar a los ratones diabéticos sin el inhibidor (Figura



10)



**Figura 10.** Resultados de la activación de linfocitos de sangre periférica. a) análisis del porcentaje de linfocitos T y B de sangre periférica b) análisis de la intensidad media de fluorescencia del marcador de activación CD69 en las subpoblaciones de linfocitos T y en linfocitos B. c) gráficos de puntos representativos del análisis por citometría de flujo de las poblaciones de linfocitos Th17, CD4<sup>+</sup> productores de TNF y linfocitos Tregs. Los gráficos representan la media  $\pm$  EEM. \*p $\leq$  0.05 vs control; # p $\leq$  0.05 vs DMT2; & p $\leq$  0.05 vs CTLA4-Ig; % p $\leq$  0.05 vs-h-IgG

## 10. DISCUSIÓN

En este estudio determinamos Encontramos que al inhibir la activación de linfocitos T con el fármaco CTLA4-Ig, los ratones diabéticos tuvieron una disminución en los niveles de glucosa en sangre, en la concentración de citocinas

proinflamatorias a nivel sistémico y en la expresión del marcador de activación CD69 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de medula ósea.

Resulta interesante que la administración de CTLA4-Ig en los ratones diabéticos incrementó la sensibilidad a la insulina, lo que explica la reducción en la concentración de glucosa en sangre, además de la reducción en la concentración de TNF- $\alpha$  e IL-6 a niveles cercanos a los ratones sanos. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Moraes-Vieiria et al. (2016), que observaron que la administración de CTLA4-Ig en ratones diabéticos "RPB4-Ox", redujo la resistencia a la insulina, la hiperglucemia y mejoró el metabolismo de la glucosa a través de la disminución en la inflamación en el tejido adiposo. Esto sugiere que los linfocitos T activados podrían participar en la fisiopatología de la DMT2, probablemente al favorecer el incremento de TNF- $\alpha$  e IL-6 a nivel sistémico, que se sabe son inductoras de resistencia a la insulina (Hotamisligil et al., 1996 y Senn et al., 2003).

Considerando que la inflamación sistémica en la DMT2 se ha asociado con el incremento de linfocitos proinflamatorios activados en circulación de pacientes con DMT2 (Senn et al. en 2003), analizamos las poblaciones celulares de linfocitos en sangre periférica y bazo, en donde observamos un incremento de linfocitos T activados, que parecen tener un perfil proinflamatorio al ser productoras de TNF- $\alpha$  e IL-17

Es posible que los linfocitos T activados que encontramos incrementados a nivel sistémico, puedan migrar a distintos tejidos como el tejido adiposo, incrementado en nuestros ratones diabéticos, y ahí favorezcan un ambiente inflamatorio debido a que se ha observado en explantes de tejido adiposo visceral, la presencia de linfocitos proinflamatorios Th17 productores de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17, que puede contribuir a la inflamación sistémica (Pandolfi et al., 2016) y al infiltrado de células presentadoras de antígeno (Kinstcher et al., 2008)

Se ha reportado una disminución de linfocitos T reguladores (Tregs) en tejido adiposo (Burhans et al., 2018). Todo esto nos sugiere que los linfocitos T

proinflamatorios pueden ser un eslabón clave en el mecanismo por el cual la inflamación del tejido adiposo y por tanto la sistémica no se resuelve en la DMT2. Por lo que sería importante estudiar si los linfocitos T provocan la inflamación sistémica y la resistencia a la insulina a través de favorecer el microambiente proinflamatorio en el tejido adiposo en la DMT2.

Además de migrar al tejido adiposo, se ha demostrado que los linfocitos activados pueden migrar a la médula ósea (Olson et al., 2015) y favorecer el desarrollo de un microambiente proinflamatorio al secretar citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-17 que inducen la sobreproducción del RANK-L, lo que a su vez afecta la salud del hueso (Di Rosa et al., 2005; Hazra et al., 2013; Cortez et al., 2013). Es posible que esto esté ocurriendo en nuestro modelo ya que observamos que los ratones diabéticos tuvieron un incremento de linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en médula ósea, que además tienen un perfil proinflamatorio al secretar IL-17 y TNF- $\alpha$

Además, los ratones diabéticos tratados con CTLA4-Ig tuvieron una disminución de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados, de linfocitos CD4<sup>+</sup> productores de estas citocinas y una reducción de TNF- $\alpha$  en el hueso, sumado al incremento de linfocitos Tregs. Lo que sugiere que el incremento de linfocitos activados en la médula ósea puede estar favoreciendo la generación de un microambiente proinflamatorio en el hueso. Sin embargo, desconocemos los mecanismos por los cuales estos linfocitos activados proinflamatorios se incrementan en la médula ósea de los ratones diabéticos. Pensamos que es posible que estén migrando de circulación en respuesta a un incremento de SDF1, el cual se ha visto incrementado en la médula ósea de ratones con hiperglucemia (Ferraro et al., 2011; Hazra et al., 2013).

## **11. CONCLUSIONES**

Los linfocitos CD4<sup>+</sup> activados de sangre periférica y de médula ósea participan en la inflamación sistémica en la DMT2 y podrían tener un papel importante en el desarrollo de resistencia a la insulina y el establecimiento de la hiperglucemia.

Cabe destacar que los inhibidores de la activación de linfocitos como el CTLA4-Ig, podrían representar una estrategia de tratamiento para contrarrestar la progresión de la DMT2 y el desarrollo de complicaciones como cardiopatías, retinopatía, neuropatías o de la enfermedad periodontal.

## 12. REFERENCIAS

1. Jiao H, Xiao E, Graves DT. Diabetes and its effect on bone and fracture healing. *Curr Osteoporos Rep.* 2015;13(5):327-35.
2. IDF. *IDF Diabetes Atlas. 9th es.* Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2021.
3. INEGI. Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido. Mexico: Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2020
4. Hernandez-Avila M, Gutierrez JP, Reynoso-Noveron N. [Diabetes Mellitus in Mexico. Status of the epidemic]. *Salud Publica Mex.*2013;55 Suppl 2:S129-36.
5. ADA. 2. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care.* 2017;40(Supplement 1):S11-S24
6. Thomas CC, Philipson LH. Update on diabetes classification. *Med Clin North Am.* 2015;99(1):1-16.
7. Buchanan TA, Xiang AH. Gestational diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 2005;115(3):485-91.
8. Guzmán-Flores JM, López-Briones S. Células de la inmunidad innata y adaptativa en la diabetes mellitus tipo 2 y obesidad. *Gaceta Médica de México.* 2012;148:381-9.
9. Delamaire M, Maugendre D, Moreno M, Le Goff MC, Allannic H, Genetet B. Impaired leukocyte functions in diabetic patients. *Diabet Med* 1997; 14:29–34
10. Muchova J, Liptakova A, Orszaghova Z et al. Antioxidant systems in polymorphonuclear leucocytes of type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 1999; 16:74–8.
11. Berrou J, Sophie F, Venot M et al Natural killer cell function, an important target for infection and tumor protection, is impaired in type 2 diabetes. *PLOS ONE* 2013; 8:e62418.

12. Sheridan PA, Paich HA, Handy J et al The antibody response to influenza vaccination is not impaired in type 2 diabetics. *Vaccine* 2015; 33:3306–13.
13. Touch S, Clement K, Andre S. T cell populations and functions are altered in human obesity and type 2 diabetes. *Curr Diab Rep* 2017; 17:81.
14. Kintscher U, Hartge M, Hess K, et al. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(7):1304-10.
15. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, et al. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med.* 2009;15(8):914-20.
16. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med.* 2009;15(8):930-9.
17. Jagannathan-Bogdan M, McDonnell ME, Shin H, et al. Elevated proinflammatory cytokine production by a skewed T cell compartment requires monocytes and promotes inflammation in type 2 diabetes. *J Immunol.* 2011;186(2):1162-72.
18. Reddy M, Eirikis E, Davis C, Davis HM, Prabhakar U. Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. *Journal of immunological methods.* 2004;293(1-2):127-42.
19. Lei L, Cui L, Mao Y, Zhang X, Jiang Q, Dong S, et al. Augmented CD25 and CD69 expression on circulating CD8+ T cells in type 2 diabetes mellitus with albuminuria. *Diabetes & metabolism.* 2017;43(4):382-4.
20. Sancho D, Gomez M, Sanchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol.* 2005;26(3):136-40
21. Shipkova M, Wieland E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clin Chim Acta.* 2012;413(17-18):1338-49.
22. Liu P, Jiang H, Che M, Fu R, Wang H, Li L, et al. Abnormal CD25 expression on hematopoietic cells in myelodysplastic syndromes. *Leukemia research.* 2018;67:12-6.
23. Cavanagh M, Gwyer Findlay E. T Cell Activation. *British Society of Immunology.*
24. Fernandez-Ponce C., Hernandez.Martinez JD. Ctla-4. A Molecule that inhibits activation of T lymphocytes. *Revista Científica Salud Uninorte.* 2006;22(2).

25. Herrero-Beaumont G., Martínez Calatrava JM. Mecanismo de acción de abatacept: concordancia con su perfil clínico. *Reumatología Clínica*. 2012;8(2):78-83.
26. Zeng, C, Xiaoyun Shi, Baojun Zhang, He Liu (2012). The imbalance of Th17/Th1/Tregs in patients with type 2 diabetes: relationship with metabolic factors and complications. *J. Mol. Med.*, 90(2), 175-186.
27. Ferraro, A., Socci, C., Stabilini, A., Valle, A., Monti, P., Battaglia, M.(2011). Expansion of Th17 cells and functional defects in T regulatory cells are key features of the pancreatic lymph nodes in patients with type 1 diabetes. *Diabetes*, 60(11), 2903-2913.
28. DeFuria, J., Belkinab, A., Jagannathan-Bogdan, M., Snyder-Cappionea, J., Carra, J., Nersesovad, Y., ... Nikolajczyka, B. (2013). B cells promote inflammation in obesity and type 2 diabetes through regulation of T-cell function and an inflammatory cytokine profile. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(13), 5133-5138.
29. Jagannathan M, McDonnell M, Liang Y, et al. Toll-like receptors regulate B cell cytokine production in patients with diabetes. *Diabetologia*. 2010;53(7):1461-71.
30. Diana, J., Simoni, Y., Furio, L., Beaudoin, L., Agerberth, B., Barrat, F. y Lehenet, A. (2013). Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes. *Nat. Med.*, 19(1), 65-73.
31. Jiménez-Álvarez L, Zúñiga J, Gaxiola M, et al. Inflammatory response and dynamics of lung T cell subsets in Th1, Th2 biased and Th2 deficient mice during the development of hypersensitivity pneumonitis. *Exp Mol Pathol*. 2010;88(3):407-15.
32. Notley CA, Ehrenstein MR. The yin and yang of regulatory T cells and inflammation in RA. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6(10):572-7.
33. Nam H.W., Cho Y.J., Functional status of immune cells in patients with long-lasting type 2 diabetes mellitus. *The Journal of Translational Immunology*. (2018); 194(1): 125–136.
34. Jagannathan-Bogdan M, McDonnell ME, Shin H et al Elevated proinflammatory cytokine production by a skewed T cell compartment requires monocytes and promotes inflammation in type 2 diabetes. *J Immunol* 2011; 186:1162–72.
35. Zhang C, Xiao C, Wang P et al The alteration of Th1/Th2/Th17/Treg paradigm in patients with type 2 diabetes mellitus: Relationship with diabetic nephropathy. *Hum Immunol* 2014; 75:289–96.

36. Yu T, Sungelo MJ, Goldberg IJ, Wang H, Eckel RH. Streptozotocin-Treated High Fat Fed Mice: A New Type 2 Diabetes Model Used to Study Canagliflozin-Induced Alterations in Lipids and Lipoproteins. *Hormone and metabolic research=Hormonund Stoffwechselforschung=Hormones et metabolisme*. 2017;49(5):400-6