



Universidad Autónoma de San Luis Potosí  
Facultad de Ciencias Químicas  
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado  
Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas



### **Título del trabajo**

Análisis de la frecuencia y actividad de células reguladoras Breg, Treg17 y Th1-IL-10 en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2 e individuos control.

### **Tesis que presenta**

Ortiz López Andrea

### **Para obtener el grado de**

Maestra en Ciencias Farmacobiológicas

### **Directores de tesis**

Dra. Diana Patricia Portales Pérez

Dra. Mariana Haydee García Hernández

San Luis Potosí, SLP, México

Agosto, 2023.

## **Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS**

#### **PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en este trabajo de tesis está protegido por la Ley Federal de Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos.

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 se obtuvo, mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto o con fines de lucro, reproducción, edición o modificación será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Créditos Institucionales**

El programa de Maestría en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Sistema Nacional de Posgrados de Calidad (SNP) del CONAHCyT, registro 003382. Número de registro de la beca otorgada por CONAHCyT: 804401.

Esta tesis se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Biomédica de Zacatecas del Instituto Mexicano del Seguro Social.

El presente trabajo fue sometido a análisis de similitud en la plataforma “turnitin” (<https://www.turnitin.com/es>). El informe de originalidad reportó un 11% de similitud.

## Análisis de la frecuencia y actividad de células de reguladoras Breg, Treg17 y Th1-IL-10 en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2 e individuos control

---

INFORME DE ORIGINALIDAD

---

**11** %  
ÍNDICE DE SIMILITUD



Análisis de la frecuencia y actividad de células reguladoras Breg, Treg17 y Th1-IL-10 en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2 e individuos control por Andrea Ortiz López se distribuye bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional.

San Luis potosí, SLP.

A 19 julio del 2023

**Comité Académico del Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas**  
**Facultad de Ciencias Químicas / UASLP**  
**Presente.**

Por medio de la presente comunicamos que la tesis llevada a cabo por la alumna de Maestría QFB. Andrea Ortiz López, titulada “Análisis de la frecuencia y actividad de células de células reguladoras Breg, Treg17 y Th1-IL-10 en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2 e individuos control”, ha sido concluida y aprobada por el comité tutorial para dar inicio a los trámites correspondientes para su titulación, la cual tendrá lugar el próximo día Lunes 7 de agosto a las 13:00 hrs, en el Auditorio Chico (G203), de la Facultad de Ciencias Químicas.

ATENTAMENTE

Dra. Diana Patricia Portales Pérez

Director de Tesis

Dra. Mariana Haydee García Hernández

Co-Director

Dra. Edith Elena Uresti Rivera

Asesor



Universidad Autónoma de San Luis Potosí  
Facultad de Ciencias Químicas  
Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas



### **Título del trabajo**

Análisis de la frecuencia y actividad de células reguladoras Breg, Treg17 y Th1-IL-10 en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2 e individuos control

### **Tesis que presenta**

Ortiz López Andrea

### **Para obtener el grado de**

Maestría en Ciencias Farmacobiológicas

### **Jurado**

Dra. Edith Elena Uresti Rivera  
*Presidente del jurado*

Dra. Mariana Haydee García Hernández  
*Secretaria del jurado*

Dra. Diana Patricia Portales Pérez  
*Vocal del jurado*

San Luis Potosí, SLP, México  
7 de Agosto, 2023

## **Análisis de la frecuencia y actividad de células reguladoras (Breg, Treg17 y Th1-IL-10) en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2 e individuos control.**

### **Resumen**

**Introducción.** En el proceso de patogénesis de la DM2 se observa una respuesta inmune con fenotipo proinflamatorio con el aumento de células T efectoras Th17 y Th1 que provocan un incremento de citocinas proinflamatorias como IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17 e IFN- $\gamma$ . Estas citocinas al promover la resistencia a la insulina y la disfunción y destrucción de las células beta pancreáticas, contribuyen al desarrollo y la progresión de la enfermedad. Algunas subpoblaciones de células reguladoras como las Treg17 (CD4+FOXP3+IL-17+), las células Breg CD19+Foxp3+, CD19+CD39+, CD19+Foxp3+CD39+ y las células Th1 productoras de IL-10 (CD4+IFN- $\gamma$ +IL-10+) modulan e inhiben la actividad de las células efectoras Th1 y Th17 a través de diferentes mecanismos supresores.

**Objetivo.** Determinar la frecuencia de células CD4+Foxp3+IL-17+, CD4+Foxp3+CD4+IL-17+, CD4+IFN- $\gamma$ +, CD4+IL-10+, CD4+IL-10+INF- $\gamma$ + y células Breg CD19+FOXP3+, CD19+CD39+, CD19+CD39+Foxp3+ en pacientes con DM2 e individuos control, así como su relación con parámetros antropométricos, de resistencia a la insulina, funcionalidad de las células beta pancreáticas, control glucémico e inflamación.

**Métodos.** Se reclutaron 30 participantes, incluidos 15 individuos sanos (grupo de control) y 15 pacientes con DM2. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron a partir de una muestra de sangre mediante centrifugación utilizando el gradiente Ficoll-Histopaque. Posteriormente, para evaluar los fenotipos de células CD4 + una parte de las PBMC purificadas fueron cultivadas y estimuladas con perlas acopladas con anti-CD3/anti-CD28 y se tiñieron con anticuerpos monoclonales específicos para los antígenos CD4, Foxp3, IL-17, IL-10, IFN- $\gamma$  conjugados con fluorocromos. Para la identificación de los fenotipos de Breg otra parte de las PBMC purificadas fueron teñidas con anticuerpos para CD19, CD39 y

Foxp3 conjugados con flourocromos. Las muestras se adquirieron en una FACSCanto II. El porcentaje de células positivas se determinó con el software FACS-Diva (BD Biosciences). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis y el análisis univariable de correlación de Spearman. Se consideró un valor de ( $P < 0,05$ ) como significativos. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software de GraphPad Prism 8.0, San Diego, Calif. EE.UU.

**Resultados.** Se observó un incremento en la frecuencia de células CD4+ IL17+, CD4+Foxp3+IL-17+ y CD4+IFN- $\gamma$ + en pacientes con DM2 en comparación con individuos control. Los porcentajes de células CD4+IL-10+ y CD4+IFN- $\gamma$ +IL-10+ fueron similares entre ambos grupos. Por otro lado, se observó una disminución en los porcentajes de células CD19+Foxp3+ y CD19+CD39+Foxp3+ en pacientes con DM2 en comparación a los sujetos control. Se encontró una asociación entre los niveles de células CD4+Foxp3+IL-17-, CD4+ Foxp3-IL-17+, CD4+IL-17+Foxp3+ y el IMC (Índice de masa corporal) y el ICC (Índice cintura-cadera) en pacientes con DM2. Las células CD4+IL-10+ se asociaron también con el IMC en pacientes con DM2. En el grupo control, los porcentajes de células CD4+IFN- $\gamma$  + y CD4+IFN- $\gamma$ +IL-10+ se asociaron con niveles de triglicéridos en sangre y el ICC respectivamente. Los niveles de células CD19+Foxp3+CD39- se asociaron con niveles de colesterol total y colesterol LDL.

**Conclusión.** Existe una alteración en las células T CD4+ activadas de pacientes con DM2 que consistió en un incremento del número de células CD4+IL-17+, CD4+IFN- $\gamma$ + y CD4+Foxp3+IL-17+, y una disminución de células reguladoras; CD4+Foxp3+, CD19+Foxp3+ y CD19+CD39+Foxp3+. Esta alteración es consecuencia de factores como la obesidad, adiposidad abdominal y los niveles de lípidos. Dada la importancia de las células Th17 y Th1 en la promoción de la inflamación y las complicaciones en la DM2, los resultados de este estudio pueden sentar bases para la búsqueda de estrategias dirigidas a la regulación de células del sistema inmune, lo que permitirá la supresión de la inflamación en pacientes con DM2.

**Palabras clave:** DM2, Treg 17, Th1IL-10,Breg.



## **Abstract**

**Introduction.** The pathogenesis of type 2 diabetes (T2DM) has been associated with the immune response, suggesting that patients with T2DM may benefit from suppression of inflammation. T2DM is characterized by showing a bias of the immune response towards a proinflammatory phenotype due to the increase in Th17 and Th1 effector T cells that cause an increase in the systemic level of proinflammatory cytokines such as IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17 and IFN- $\gamma$ . This promotes insulin resistance and pancreatic beta cell dysfunction and destruction, contributing to the development and progression of the disease. Some regulatory cell subtypes such as Treg17 (CD4+FOXP3+IL-17+), Foxp3+CD39+ B cells and IL-10 producing Th1 cells (IL-10-Th1+) modulate and inhibit the activity of Th1 and Th17 effector cells through different suppressive mechanisms.

**Objective.** To determine the frequency of CD4+Foxp3+IL-17+, CD4+Foxp3+CD4+IL-17+, CD4+IFN- $\gamma$ +, CD4+IL-10+, CD4+IL-10+INF- $\gamma$ + and Breg CD19+FOXP3+, CD19+CD39+, CD19+CD39+Foxp3+ cells in patients with DM2 and control individuals, as well as their relationship with anthropometric parameters, insulin resistance, pancreatic beta-cell functionality, glycemic control and inflammation

**Methods.** Fifteen patients with DM2 and 15 healthy individuals (control group) were included. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from a blood sample by centrifugation using the Ficoll-Histopaque gradient. Subsequently, the purified PBMC were cultured and stimulated with CD3/CD28 activation beads and immunostained with monoclonal antibodies. The percentage of positive cells was determined by flow cytometry using a FACS canto II. Statistical analysis was performed by Kruskal-Wallis test ( $P < 0.05$ ) and correlation between anthropometric, biochemical measures and cell percentages were calculated by univariate spearman correlation analysis using GraphPad Prism 8.0 software, San Diego, Calif. USA)

**Results.** An increased frequency of CD4+IL17+, CD4+Foxp3+IL-17+ and CD4+IFN- $\gamma$ + cells was observed in patients with DM2 compared to control individuals. The percentages of CD4+ IL-10+ and CD4+IFN- $\gamma$ +IL-10+ cells were similar between both groups. On the other hand, the percentages of CD19+Foxp3+ and CD19+CD39+Foxp3+ cells were found decreased in patients with DM2. Statistical analysis revealed that the levels of CD4+Foxp3+, CD4+ IL-17+, CD4+IL-17+Foxp3+ cells were associated with BMI and CHF in patients with DM2. CD4+IL0+ and CD4+IFN- $\gamma$ + cells were also associated with BMI in patients with DM2. In the control group we found an association of CD4+IFN- $\gamma$  + and CD4+IFN-  $\gamma$  IL-10+ cells with blood triglyceride levels and CHF respectively. CD19+Foxp3+ cells were associated with total cholesterol and LDL-cholesterol levels. Finally, the percentages of CD19+CD39+Foxp3+ cells were associated with CHF in this group.

**Conclusion.** In this study it was demonstrated that there is an alteration in activated CD4+ T cells of patients with DM2 that consisted of an increase in the number of CD4+IL-17+, CD4+IFN- $\gamma$ + and CD4+Foxp3+IL-17+ cells, and a decrease in regulatory cells; CD4+Foxp3+, CD19+Foxp3+ and CD19+CD39+Foxp3+. This alteration seems to be a consequence of factors that accompany DM2 such as obesity, abdominal obesity and alterations in lipid levels. Given the importance of Th17 and Th1 cells in the promotion of inflammation and complications in DM2, the results of this study may lay the groundwork for the search for strategies aimed at the regulation of immune system cells, specifically Th17 and Th1, which will allow the suppression of inflammation in patients with DM2.

**Key words:** DM2, Treg 17, Th1IL-10, Bregs

## Índice

I.	Introducción .....	4
II.	Antecedentes .....	5
III.	Justificación .....	7
IV.	Hipótesis .....	8
V.	Objetivo general.....	9
VI.	Objetivos específicos .....	9
VII.	Metodología.....	10
	Voluntarios Participantes.....	10
	Exámenes de laboratorio .....	10
	Aislamiento de células mononucleares de sangre venosa periférica .....	10
	Evaluación de los porcentajes de células Breg (CD19+CD39 +, CD19+Foxp3 +, CD19+CD39+Foxp3 +) por citometría de flujo. ....	11
	Evaluación de los porcentajes de células CD4+Foxp3+, CD4+IL-17+, CD4+Foxp3+IL-17+ por citometría de flujo. ....	11
	Evaluación de los porcentajes de células CD4+IFN- $\gamma$ +, CD4+IL-10+ y CD4+IFN- $\gamma$ +IL-10+ por citometría de flujo .....	12
	Análisis estadístico.....	12
VIII.	Resultados.....	13
	Porcentaje de células CD4+Foxp3+, CD4+IL-17+ y CD4+Foxp3+IL-17+ en pacientes con DM2 e individuos control.....	14
	Porcentajes de células CD4+ IFN- $\gamma$ +, CD4+IL-10+ y Th1+IL-10+ en pacientes con DM2 e individuos control.....	14
	Porcentaje de células Breg CD19+CD39+, CD19+Foxp3+ y CD19+CD39+Foxp3+ en pacientes con DM2 e individuos control .....	15
	Análisis de correlación.....	16
IX.	Discusión .....	17
X.	Conclusión .....	28
XI.	Bibliografía.....	29

## I. Introducción

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una enfermedad metabólica que se considera un problema de salud mundial, ya que su tratamiento y complicaciones generan un gran costo económico para los servicios de salud. Se caracteriza por presentar hiperglucemia crónica debido a la incapacidad del páncreas para producir insulina o de los tejidos para utilizarla (resistencia a la insulina). Cerca del 42.6% de las personas diagnosticadas con DM2 tienen sobrepeso y un 32.9% obesidad, lo que incrementa el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares en estos pacientes (60,61). En la actualidad, se sugiere que existe una relación entre la DM2 y la alteración de la inmunidad innata y adaptativa generando una inflamación sistémica crónica de bajo grado (23, 35). Estas alteraciones inmunológicas son en gran medida el resultado de la respuesta a los niveles elevados de ligandos endógenos como los ácidos grasos libres o los productos finales de la glicación avanzada, que pueden estimular a las células inmunes para que sinteticen citocinas proinflamatorias como la IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (16, 23). Estas citocinas contribuyen a la progresión y complicaciones de la enfermedad ya que promueven el desarrollo de resistencia a la insulina mediante distintos mecanismos: 1) activando cinasas de serina, PI3K, PKC, MAPK e IKK que actúan a nivel del sustrato del receptor de la insulina (IRS) inhibiendo la activación de la cascada de señalización de esta hormona (27), 2) Suprimiendo la transcripción del ARN mensajero que codifica para el IRS a través de mecanismo dependiente de la activación de la cinasa ERK (26). 3) A través de la inducción de la degradación del IRS por el proteosoma (41, 44). La pérdida de masa y alteración de la función de las células beta pancreáticas también se encuentra ligada a la acción de citocinas pro-inflamatorias como IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-17 (18). Se ha reportado que la IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  inhiben la secreción de insulina (11, 12). Por otra parte, a la citocina IL-17 se le atribuye un papel fundamental en la destrucción de células beta pancreáticas, ya que al interactuar esta citocina con su receptor expresado en estas células se desencadena la expresión de genes apoptóticos con la eventual muerte celular (3, 24).

Adicionalmente, se observó un sesgo en la respuesta inmune hacia un fenotipo pro inflamatorio por un incremento de Th1 y Th17, ya que en pacientes con DM2 se han observado porcentajes elevados de células T IL-17+ y células IFN- $\gamma$ +. (38, 55). Asimismo, se reportó que las células mononucleares de sangre venosa periférica (PBMC) de pacientes con DM2 producen cantidades elevadas de IL-17 de manera constitutiva (25) y ratones deficientes en IL-17 mostraron una tolerancia a la glucosa y un incremento a la sensibilidad a la insulina (59). Estos datos indican la importancia del papel de las células Th17 en la patogenia de la diabetes.

## **II. Antecedentes**

Dado que las respuestas efectoras de tipo Th1 y Th17 son causantes de procesos inflamatorios que contribuyen al desarrollo y progresión de la DM2, es importante conocer su regulación. Existen varios tipos de células reguladoras que participan en la tolerancia inmunológica y la inflamación, las más estudiadas son las células derivadas de las células T CD4+, las cuales se diferencian por su origen, expresión, moléculas que expresan en su superficie o el factor de transcripción Foxp3. Sin embargo, las células T CD4+ muestran un alto grado de plasticidad, lo que quiere decir que su diferenciación inicial no es el punto final de su desarrollo, ya que son capaces de adaptarse durante una respuesta inmune según el microambiente en el que se encuentren (30). En este sentido, se demostró que la IL-6 puede inducir la diferenciación de células Th17 a partir de células T reguladoras (Foxp3+ Treg) en presencia de TGF- $\beta$ . Estas células representan un fenotipo de células T reguladoras-Foxp3+ productoras de IL-17 conocidas como Treg17 (52, 36). Además, estas células se caracterizan por secretar IL-17, co-expresar los factores de transcripción Foxp3 y ROR-t e inhibir la proliferación de células T CD4+, mediante el contacto célula-célula. En un modelo de lupus eritematoso generalizado se demostró que en ratones deficientes de células Treg17, existe un aumento de los niveles de autoanticuerpos, el daño renal y el número de células Th17 (31); indicando que las células Treg17 controlan la actividad de las células Th17

Debido a los mecanismos de retroalimentación entre los distintos fenotipos de células CD4+ se ha descubierto también que el IFN- $\gamma$  derivado de células Th1 puede inhibir la expresión local de la quimiocina CCL20, actuando a través de su receptor CCR6 en las células Th17, limitando así la respuesta inmune Th17 en un modelo de glomerulonefritis murina (39). Aunado a esto, se describió una subpoblación de células que producen niveles elevados de IFN- $\gamma$  e IL-10 inducida por IL-12 (21, 48), la cual se ha sugerido que representa un subtipo de células que podría regular a la baja las respuestas y proliferación de Th1 (13, 28). A pesar de que las células T reguladoras CD4+CD25+Foxp3+ (células Treg) juegan un papel central en respuesta inflamatoria, se ha postulado que en algunas patologías su función se ve afectada (17, 34, 51, 58) y que además las células Th17 pueden ser resistentes a la supresión por parte de las células Treg humanas (20). Recientemente, se demostró que células T reguladoras que expresan CD39 pueden suprimir de manera eficiente a células Th1 y Th17 (20), asimismo, se ha demostrado que las células T CD39 + Foxp3 + modulan la función de células T efectoras a través de la degradación de ATP (7). El ATP se considera una señal de daño que induce la activación del inflammasoma y la liberación de IL-1 $\beta$ , la cual es esencial para la diferenciación de células Th17 (4). Estos antecedentes destacan la importancia del estudio de nuevos fenotipos de células reguladoras y en este sentido se ha postulado que las células T no son las únicas células capaces de inhibir respuestas efectoras; también existen fenotipos de células B; como las células B 10 que tienen una participación en la inhibición de la actividad de las células Th17 y Th1 y en la promoción del desarrollo de células T reguladoras (9). Además, anteriormente, se consideraba que el factor de transcripción Foxp3 solo se encontraba en células T. Sin embargo, estudios recientes han demostrado su presencia también en células B (22), lo cual ha abierto nuevas perspectivas en la comprensión de su función en este tipo celular. No obstante, hasta el momento no se ha investigado la presencia simultánea de los marcadores CD39 y Foxp3 en células B. Por consiguiente, la investigación de este fenotipo podría resultar relevante para comprender un nuevo grupo de células capaces de regular las respuestas de tipo Th1 y Th17.

### **III. Justificación**

Los hallazgos expuestos con anterioridad sugieren que las células Th1 y Th17 desempeñan un papel en la generación de la inflamación crónica en la diabetes tipo 2 (DM2), la resistencia a la insulina y la disfunción de las células beta pancreáticas. Aunque algunos subtipos de células reguladoras modulan la actividad de las células Th1 y Th17, no se ha descrito su frecuencia, actividad y su asociación con parámetros bioquímicos y antropométricos en pacientes con DM2. Por lo tanto, este estudio propone evaluar la frecuencia de estas células en pacientes con DM2 e individuos control, con el propósito de determinar si el microambiente diabetogénico las altera y si estas contribuyen a la patología de la enfermedad.

#### **IV. Hipótesis**

Las células reguladoras Treg17, células Breg (CD19+CD39+ y CD19+Foxp3+) y células Th1 productoras de IL-10 se encuentran disminuidas en pacientes con DM2 comparados con pacientes con pre-diabetes e individuos control.



## **V. Objetivo general**

Determinar si en pacientes con DM2 se encuentra alterada la frecuencia de los distintos fenotipos de células CD4+ y fenotipos de células reguladoras Th1-IL-10, Treg17, CD19+Foxp3+, CD19+CD39+, CD19+CD39+Foxp3+, y si estas contribuyen a la patología de la enfermedad.

## **VI. Objetivos específicos**

1. Determinar las frecuencias de células CD4+Foxp3+, CD4+IL-17+ CD4+Foxp3+IL-17+ (Treg17), CD4+IL-10+, CD4+IFN- $\gamma$ +, CD4+IFN- $\gamma$ +IL-10+ (Th1-IL-10) y células Breg CD19+CD39+, CD19+Foxp3+, en pacientes con pre-diabetes, DM2 e individuos control por citometría de flujo
2. Evaluar la asociación entre la frecuencias de las células y los parámetros bioquímicos de resistencia a la insulina (HOMA-IR), funcionalidad de las células beta del páncreas (HOMA-B), perfil de lípidos (TG, colesterol, LDL, HDL), control glucémico (HbA1c), inflamación (PCR) así como medidas antropométricas de IMC (índice de masa corporal) e ICC (índice cintura cadera) por medio de análisis estadístico de matrices de correlación.

## **VII. Metodología**

### **Voluntarios Participantes**

Esta investigación fue aprobada por el comité bioético de la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS con número de registro (R-2018-785-072) y se realizó de acuerdo a la declaración de Helsinki (42). Los individuos reclutados en este estudio fueron catalogados como pacientes diabéticos con un valor de glucosa plasmática en ayuno (FPG)  $>126$  mg/dl, e individuos normoglucémicos (grupo control) con un valor de glucosa plasmática en ayuno (FPG)  $< 100$  mg/dl, según los criterios de la Asociación Americana de Diabetes (ADA) (2). Los parámetros antropométricos y bioquímicos de los participantes se muestran en la Tabla 1. Los criterios de exclusión para este estudio fueron mujeres embarazadas, la presencia de procesos infecciosos e inflamatorios, tumores malignos y enfermedades autoinmunes. Todos los participantes de este estudio otorgaron su consentimiento por escrito.

### **Exámenes de laboratorio**

El control glucémico se evaluó mediante los porcentajes de HbA1c. El HOMA-B se utilizó para determinar la funcionalidad de las células beta pancreáticas; y el HOMA-IR, resistencia a la insulina. Ambos se calcularon a partir de los niveles séricos de insulina y glucosa en ayuno (37). La insulina sérica y la glucosa plasmática en ayuno (FPG), los triglicéridos, el colesterol total, niveles séricos de HDL y LDL y niveles de proteína C reactiva en suero (PCR) se determinaron por un laboratorio de análisis clínicos privado.

### **Aislamiento de células mononucleares de sangre venosa periférica**

Se realizó una dilución de la sangre venosa periférica (1:2) con buffer de fosfatos (PBS). Esta mezcla se adicionó a un tubo Falcon conteniendo 3 mL de Ficoll-Hypaque, se centrifugó a 2500 rpm por 20 minutos. Posteriormente, se realizó la extracción de la capa de células mononucleares y se realizó un lavado con PBS dos

veces; centrifugando a 1500 rpm por 5 minutos. Se contó el número de las células mononucleares en una cámara de Neubauer utilizando azul de tripano al 10%. Se obtuvo un porcentaje de viabilidad del 98%.

#### **Evaluación de los porcentajes de células Breg (CD19+CD39 +, CD19+Foxp3 +, CD19+CD39+Foxp3 +) por citometría de flujo.**

Para el fenotipo CD19+Foxp3+, CD19+CD39+ y CD19+CD39+FOXP3+ se utilizó un anticuerpo anti-CD19 conjugado con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Miltenyi), un anticuerpo anti-CD39 conjugado con (PERCY-Cyan 7) (Miltenyi) y un anti-Foxp3 conjugado con (APC) (Miltenyi). Todos los anticuerpos anteriormente mencionados se añadieron a una concentración de 0.05 µg a  $2 \times 10^5$  células por mililitro y se incubaron a 4°C en oscuridad durante 20 minutos. Para la inmunotinción intracelular del factor de transcripción Foxp3 se utilizó el buffer de la Foxp3 Transcription Factor Staining Buffer Kit (Invitrogen™) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, las muestras se adquirieron y analizaron en un FACSCanto II (BD Biosciences).

#### **Evaluación de los porcentajes de células CD4+Foxp3+, CD4+IL-17+, CD4+Foxp3+IL-17+ por citometría de flujo.**

Para determinar los porcentajes de las células Treg 17(CD4+Foxp3+IL-17+), CD4+Foxp3+, CD4+IL-17+, las PBMC de pacientes e individuos control fueron cultivadas estimuladas con perlas embebidas con anticuerpos anti-CD3/CD28 (una perla por célula, Thermo Fisher Scientific) e incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% humedad por 5 horas. Tres horas antes de terminar el periodo de incubación se agregó brefeldin A (3µg/mL). Después del periodo de incubación las células se inmunotñeron con los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-CD4 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Miltenyi), anti-IL-17 conjugado con ficoeritrina (PE) (Miltenyi) y anti- Foxp3 conjugado con (APC). Todos utilizados a una concentración de 0.05 µg a  $2 \times 10^5$  células por mililitro. Para la tinción intracelular de IL-17 y Foxp3 se utilizó el buffer Foxp3 Transcription Factor Staining Buffer Kit

(Invitrogen™) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, las muestras adquiridas y analizadas en un FACSCanto II (BD Biosciences).

### **Evaluación de los porcentajes de células CD4+IFN- $\gamma$ +, CD4+IL-10+ y CD4+IFN- $\gamma$ +IL-10+ por citometría de flujo**

Con la finalidad de determinar los porcentajes de las células IL-10-Th1 (CD4+IL-10+IFN- $\gamma$ ), CD4+IFN- $\gamma$ + y CD4+IL-10+,  $1 \times 10^6$  de PBMC de pacientes y controles se cultivaron con medio RPMI completo que contenía 10% SFB y se estimularon con perlas embebidas con anticuerpos anti- CD3/CD28 (una perla por célula, Thermo Fisher Scientific) por un periodo de 6 horas. Las condiciones de incubación fueron 37 ° C de temperatura, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% humedad. Cuatro horas antes de terminar el periodo de incubación se agregó brefeldin A (3ug/mL). Finalizando el periodo de incubación las células fueron inmunoteñidas con los anticuerpos monoclonales; anti-CD4 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Miltenyi), anti-IFN- $\gamma$  conjugado con ficoeritrina (PE) (Miltenyi) y anti-IL-10 conjugado con (APC). Todos utilizados a una concentración de 0.05  $\mu$ g a  $2 \times 10^5$  células por mililitro. Para la tinción intracelular de IL-10 y IFN- $\gamma$  se utilizó el ensayo comercial Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set, siguiendo las indicaciones del fabricante. Finalmente, las muestras fueron adquiridas y analizadas en un FACSCanto II (BD Biosciences) obteniendo el porcentaje de células positivas.

### **Análisis estadístico**

El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando una prueba de Shapiro-Wilk para evaluar la normalidad de los datos. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para comparar las diferencias entre dos grupos independientes. La asociación entre los porcentajes de células y los parámetros bioquímicos y antropométricos se evaluó mediante el análisis de correlación de Spearman. El análisis estadístico se realizó utilizando el software de GraphPad Prism 8.0. Sigma Stat (San Diego, Calif. USA). Se consideró significativa una  $p < 0,05$ .

## **VIII. Resultados**

Las características de los participantes en el estudio y resultados de los parámetros bioquímicos y medidas antropométricas, se muestran en la siguiente tabla. El grupo de pacientes con DM2 estaba formado por 10 mujeres y 5 hombres de edades entre los 50 y los 65 años (mediana de 53 años). El grupo control incluía 8 mujeres y 7 hombres de edades entre los 52 y los 65 años (mediana de 49 años). Los pacientes con DM2 mostraron niveles más altos de glucosa en ayuno, hemoglobina glicosilada (HBA1c), colesterol HDL y proteína C reactiva (PCR) que los sujetos control.

### **Porcentaje de células CD4+Foxp3+, CD4+IL-17+ y CD4+Foxp3+IL-17+ en pacientes con DM2 e individuos control.**

Las células T CD4 + Foxp3 + pueden adoptar uno de varios destinos funcionales y realizar distintos mecanismos dependiendo de las citocinas y el microambiente presente durante su activación inicial (57). Por lo que en este estudio nos propusimos investigar si en pacientes con DM2 las frecuencias de estas células se encuentran alteradas y si coexpresan el factor de transcripción Foxp3 y la citocina IL-17. De esta manera se examinó la frecuencia de células T CD4+ que expresan Foxp3 (CD4+Foxp3+) la frecuencia de células T CD4+ que expresan IL-17+ (CD4+ IL-17+) y la frecuencia de células que expresaban tanto Foxp3 como IL-17 (CD4+Foxp3+IL-17+) en las células circulantes de pacientes con DM2 e individuos control, tras una estimulación de 5 h utilizando el kit human T-activator beads (anti-CD3/28-coated (Thermo Fisher Scientific). Se observó un porcentaje elevado tanto de células CD4+ IL-17+ y CD4+Foxp3+IL-17+ en pacientes con DM2 respecto a individuos control (Fig.1b, Fig.1d), y una disminución en los porcentajes de células CD4+Foxp3+ en pacientes con DM2 en comparación con los individuos control (Fig.1c). En general, estos datos indican que en los pacientes con DM2 existe un incremento en las células efectoras (CD4+IL17+), una disminución de células (CD4+Foxp3+) y un mayor porcentaje de células T CD4 que expresan en conjunto Foxp3 e IL-17 (CD4+Foxp3+IL-17+).

### **Porcentajes de células CD4+ IFN-γ+, CD4+IL-10+ y Th1+IL-10+ en pacientes con DM2 e individuos control**

En algunas patologías las células Th1 efectoras activadas desarrollan un mecanismo de autocontrol mediante el cual producen IL-10 (células Th1IL-10+) como un medio para prevenir el daño inmunitario colateral (48). De esta manera nos propusimos investigar si en la sangre de pacientes con DM2 se encontraba este fenotipo celular circulante, por lo que examinamos los porcentajes de células productoras de interleucina 10 pero no de IFN-γ (CD4+IL-10+IFN-γ-), las células T CD4+ productoras

de interferón pero no de IL-10 (CD4+IFN- $\gamma$ + IL-10-) y qué porcentaje de células producían ambas citocinas (CD4+IFN- $\gamma$ + IL-10+) tras una estimulación de 6 h utilizando el kit human T-activator beads anti-CD3/28-coated (Thermo Fisher Scientific). Se observó un incremento de células T CD4+IFN- $\gamma$ + en pacientes con DM2 respecto a los controles. Las células T CD4+IL-10+ y las células T CD4 + IFN- $\gamma$ +IL-10+ (Th1-IL-10) mostraron niveles similares entre ambos grupos.

### **Porcentaje de células Breg CD19+CD39+, CD19+Foxp3+ y CD19+CD39+Foxp3+ en pacientes con DM2 e individuos control**

Las células T CD4+CD39+Foxp3+ son un grupo de células reguladoras capaces de inhibir de manera efectiva respuestas de tipo Th17 y Th1 (20), sin embargo, no existen determinaciones de un fenotipo similar en células B. Por lo tanto, quisimos evaluar si existía la presencia de los marcadores Foxp3+ y CD39 en células CD19+ y si sus frecuencias están alteradas en pacientes con DM2. Se examinaron los porcentajes de las poblaciones de Bregs CD19+Foxp3+, CD19+CD39+ y células CD19+CD39+Foxp3+ en pacientes con DM2 e individuos control. Las poblaciones de CD19+Foxp3+ y CD19+CD39+Foxp3+ disminuyeron en el grupo de pacientes con DM2 (figura 3.c y 3.b respectivamente) en comparación con el grupo control. Las frecuencias en los porcentajes de CD19+CD39+ fueron similares en los pacientes con DM2 y los controles sanos. Estos resultados indican que existe una disminución en los fenotipos de células B CD19 Foxp3 + y CD19+CD39+Foxp3 + en los pacientes con DM2.

## **Análisis de correlación**

Para explorar la relación entre los porcentajes de células evaluadas y los parámetros bioquímicos y antropométricos, se realizó la correlación univariante-Spearman. Los niveles de células CD4+Foxp3+ se asociaron negativamente con el IMC y el ICC en pacientes con DM2 (tabla 2). Los porcentajes de CD4+IL-17+ se asociaron de manera negativa con las medidas antropométricas de ICC tanto en pacientes con DM2 como en el grupo control (tabla 2). Finalmente, los niveles de CD4+IL-17+Foxp3+ (Treg17) se asociaron positivamente con el IMC en pacientes con DM2 (tabla 2). En pacientes con DM2 se encontró una asociación positiva entre los porcentajes de células CD4+IL0+ con el IMC (tabla 3). En el grupo control, los niveles de células CD4+IFN- $\gamma$ + se asociaron positivamente con los niveles de triglicéridos en sangre y porcentajes de células TH1-IL-10+ con el ICC (tabla 3). Respecto a los porcentajes de células Breg, la población de células CD19+Foxp3+ se asoció negativamente con los niveles de colesterol total y colesterol LDL en el grupo control (tabla 4).



## **IX. Discusión**

La DM2 es un trastorno metabólico que se caracteriza por la presencia de inflamación crónica de bajo grado. Las respuestas efectoras de células de la inmunidad adaptativa Th1 y Th17 son unas de las principales promotoras de este estado inflamatorio y contribuyen a la progresión de la enfermedad, por lo que se sugiere que los pacientes con DM2 podrían beneficiarse de la supresión de la inflamación a través de la regulación de células del sistema inmune.

La diferenciación de células Th17, Th1 y Treg que surgen de precursores de T CD4+ se relacionan mutuamente y pueden ser controladas por el microambiente de citocinas circulantes. Por lo que su estadio de diferenciación inicial puede verse modificado y adoptar nuevas características o funciones (57); lo que conlleva a generar varias subpoblaciones de células T CD4+. Es por eso que en nuestro estudio determinamos la frecuencia de las células T CD4+ que expresan citocinas proinflamatorias (CD4+IL-17+ y CD4+IFN- $\gamma$ +), las células con carácter regulador (CD4+Foxp3+ y CD4+IL-10+) y la frecuencia de las células CD4+Foxp3+IL-17+ (Treg17) y CD4+IFN- $\gamma$ +IL-10 (Th1 IL-10+) en pacientes con DM2 e individuos control. El análisis por citometría de flujo nos permitió determinar que existe una alteración en las frecuencias de células T CD4+. Específicamente, se observó un mayor porcentaje de células CD4+IL-17+, CD4+IFN- $\gamma$ + y CD4+Foxp3+IL-17+ en pacientes con DM2 respecto a individuos control. De manera interesante se encontró una asociación entre la frecuencia de estas células con el IMC y los niveles de triglicéridos.

En la obesidad, (IMC >30) el exceso de tejido adiposo se distribuye por todo el organismo o se concentra especialmente en determinadas regiones. Cuando el exceso de grasa se acumula de forma preferente en la cavidad abdominal, hablamos de obesidad abdominal o central (47). Esta se define por un perímetro de cintura de 80 centímetros en mujeres y más de 90 centímetros en el caso de los hombres o índice cintura cadera (ICC<0.85 en mujeres o >0.94 en hombres). La obesidad abdominal al ser metabólicamente más activa es capaz de promover inflamación, ya

que los adipocitos y macrófagos del tejido adiposo visceral expresan directamente IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (15, 23, 47). Se ha reportado que en pacientes con DM2 los niveles de estas citocinas se encuentran elevados (1, 8, 38, 46). Además, estas citocinas pueden inducir la expresión de IL-17 e IFN- $\gamma$  en las células T CD4 (19, 53) e inhibir a células T CD4 Foxp3+ (29), lo que explicaría en parte los resultados encontrados en nuestro estudio, que indican que existe una respuesta descontrolada en la generación de células CD4+IL-17+ y CD4+INF- $\gamma$ +.en pacientes con DM2 cuando las células son estimuladas. Nuestros hallazgos también demostraron que existe un incremento en el fenotipo celular CD4+Foxp3+IL-17+ en células de pacientes con DM2 y que se asociaron al IMC. De acuerdo con nuestros resultados estudios previos han reportado porcentajes mayores de este fenotipo de células en pacientes con DM2 respecto a controles no diabéticos y estos también se asociaron con el IMC (58). Recientemente se describió que las células Treg humanas pueden expresar Foxp3, secretar IL-17 (6, 14, 32, 52) y que su papel podría ser mediador contra respuestas Th17 (45). Sin embargo, hay que resaltar que estas capacidades se pierden tras la estimulación con IL-1 $\beta$  e IL-6 *in vitro* (6). La transición del fenotipo de células Treg hacia Th17 se ha observado en enfermedades de carácter inflamatorio como la artritis reumatoide (AR), en donde se demostró que las células T CD4 CD25 low Foxp3+ en el sinovio regulan de manera negativa la expresión de Foxp3 y se convierten en células Th17 de forma dependiente de la IL-6 (33). Así mismo, en un estudio realizado en sujetos sanos, las células productoras de IL-17 derivadas de células T reguladoras (Treg) mostraron una expresión elevada del factor de transcripción ROR $\gamma$ t relacionado con Th17 y este proceso de diferenciación hacia Th17 se vio potenciado por IL-1 $\beta$  (32). Es plausible que en nuestro estudio las células CD4+Foxp3+IL-17+ (Treg17) observadas representen una subpoblación de células CD4+ Foxp3+ inestables que se encuentran en transición a células efectoras Th17; esto como resultado del incremento de IL-6 e IL-1 $\beta$  en los pacientes con DM2. Por lo que dentro de las perspectivas a futuro sería conveniente evaluar las interacciones entre el perfil de citocinas de los pacientes con DM2 y el papel de este fenotipo celular, además de incluir ensayos de supresión.

Estos resultados muestran evidencia de que en pacientes con DM la obesidad y dentro de esta, la obesidad abdominal, son los principales factores que alteran la diferenciación de las células T CD4 +; las cuales pueden mostrar una plasticidad inherente para convertirse en células T efectoras. Además, como consecuencia de la plasticidad y las redes de interacción de las células T CD4 + es posible encontrar en circulación células T CD4 + que además de producir interferón gamma también produzcan IL-10 (10, 48). En nuestro estudio los porcentajes de estas células (CD4+IFN- $\gamma$ +IL-10+ y CD4+IL-10+) fueron similares en ambos grupos, demostrando que a diferencia de las otras subpoblaciones de células T CD4+, su diferenciación no se ve afectada por el microambiente característico de pacientes con DM2.

Por otro lado, se ha observado que las células Treg Foxp3 + presentan una menor capacidad de suprimir a las células T efectoras en algunas patologías, y la DM2 no es la excepción. En pacientes con DM2 las células Treg Foxp3+ CD25hiCD127 presentan una actividad de supresión menor contra células T efectoras a comparación de las células CD4+CD25hiCD127- de controles sin DM2 (58). Por lo que es necesario centrar la búsqueda de nuevos fenotipos celulares como las células Treg CD39+ que regulen respuestas Th1 y Th17 en estos pacientes. La ectonucleotidasa CD39 se expresa en todas las células T Foxp3 + en ratones y también se ha observado su presencia en humanos (20). La expresión de CD39 se regula por el factor de transcripción Foxp3 específico de Treg y su actividad catalítica se potencia fuertemente potenciada por la unión del receptor de células T (TCR) en las células CD4+ (7). Sin embargo, la participación de las células B (CD19 +) es menos clara y no existía evidencia de un subconjunto de células B que expresaran Foxp3 y CD39. Es por eso que en este estudio determinamos la frecuencia de células CD19 + que expresaran Foxp3, la frecuencia de células CD19 + que expresaban CD39, y finalmente las células CD19 + que expresaran CD39 y Foxp3 en la sangre de pacientes con DM2 e individuos control de manera basal.

Se encontró una disminución en los porcentajes de células CD19+Foxp3+ en pacientes con DM2 respecto a individuos control. De manera similar, en pacientes

con AR las proporciones de estas células reguladoras están disminuidas (22) y se relacionan con estadios más avanzados de la enfermedad. Y aunque el papel de Foxp3 en células B aún no está del todo esclarecido, parece ser que la presencia de este fenotipo celular tiene especial importancia en la regulación de la inflamación. Además, el análisis de correlación en nuestros resultados mostró una asociación de este fenotipo celular con los niveles de colesterol total y niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL-c) en el grupo control. De acuerdo con nuestros datos, reportes de otras investigaciones han encontrado la asociación de frecuencias de algunos fenotipos de células Breg con niveles de lípidos en sangre en pacientes con DM2 (38). Lo que nos lleva a proponer que alteraciones en el nivel de lípidos en sangre pueden conducir a alteraciones en los porcentajes e incluso en la actividad de los fenotipos de células B reguladoras.

Como se mencionó anteriormente, en las células T la expresión de CD39 está mutuamente vinculada a la expresión de Foxp3. No obstante, aún no está descrita la expresión de CD39 en las células CD19+, ya que a pesar de encontrar un porcentaje disminuido de células CD19+CD39+Foxp3+ en pacientes con DM2, las células CD19+CD39+Foxp3- se encontraron en porcentajes similares en ambos grupos. Respecto a esto, del total de células CD19+, entre el 60 y 80% expresaron el marcador CD39 tanto en pacientes con DM2 como en sujetos control. Por lo que a primera instancia no pareciera que la expresión de CD39 en células B dependa de la expresión de Foxp3. Es necesario, por lo tanto, realizar un análisis más profundo para comprender el vínculo entre CD39 y Foxp3 en células B.

Finalmente, en nuestro estudio demostramos por primera vez la presencia de células B CD19+CD39+Foxp3 + en la sangre periférica de sujetos sanos y pacientes diabéticos; en estos últimos su frecuencia se encontró disminuida. Anteriormente se ha demostrado la existencia de células T reguladoras CD39 + que tienen la capacidad de suprimir la proliferación de células Th1 y células Th17. El principal mecanismo mediante el cual realizan dicha supresión es mediante la hidrólisis de ATP por parte de la ectonucleasa CD39 (20), lo cual conduce a la formación de ADP

o AMP que puede generar adenosina. La adenosina, mediante la unión al receptor A2A, tiene efectos inmunosupresores sobre las células T (43). El ATP provoca respuestas pro-inflamatorias por parte del sistema inmune (40) ya que al ser una señal de daño induce la activación del inflamasoma y la liberación de IL-1 $\beta$ , la cual promueve la diferenciación de células Th17. En ese sentido, se ha reportado que en pacientes con DM2 y en ratones diabéticos los niveles de eATP (ATP extracelular), se encuentran elevados a comparación de sus controles no diabéticos. (50, 54, 56). Además, se ha observado que al bloquear la actividad de CD39, se incrementa la producción de IL-17 por parte de las células T y que el ATP puede promover a las células Th17 *in vivo* (20). Estos datos junto con los hallazgos de este estudio nos llevan a proponer que la elevada frecuencia de células CD4+IFN- $\gamma$ + y CD4+IL-17+ encontradas en pacientes con DM2 podrían deberse a la disminución de células CD19+Foxp3+CD39 +. Sin embargo esta hipótesis deberá comprobarse en estudios futuros.

## **X. Conclusión**

En este trabajo se demostró que existe una alteración en los niveles de las células T CD4+ de pacientes con DM2. De manera particular se encontró un incremento de células CD4+IL-17+, CD4+IFN- $\gamma$ + y CD4+Foxp3+IL-17+. Por otra parte, resulta interesante destacar que se observó una disminución en la cantidad de células CD19+CD39-Foxp3+ CD19+CD39+Foxp3+, que son subconjuntos de células Breg (células reguladoras B humanas) reportados por primera vez en este estudio, y que podrían participar en la supresión de las células Th17 y Th1. Las alteraciones observadas en los fenotipos evaluados parecen ser consecuencia de factores que acompañan a la DM2, como la obesidad, la obesidad abdominal y las alteraciones en los niveles de lípidos. Dada la importancia que tienen las células Th17 y Th1 en la promoción de la inflamación y las complicaciones en la DM2, es esencial comprender el control de estas respuestas efectoras. En este sentido, los resultados de este estudio presentan bases para el desarrollo de estrategias destinadas a suprimir la inflamación en pacientes con DM2 a través de la regulación de las células del sistema inmune. Esto abre nuevas perspectivas en la búsqueda de enfoques terapéuticos para el tratamiento de la DM2 y sus complicaciones asociadas.

## **XI. Bibliografía**

1. Alfadul H, Sabico Sand Al-Daghri NM. The role of interleukin-1beta in type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022;13:901616.
2. American Diabetes A. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* 2017;40:S11-S24.
3. Arif S, Moore F, Marks K, et al. Peripheral and islet interleukin-17 pathway activation characterizes human autoimmune diabetes and promotes cytokine-mediated beta-cell death. *Diabetes* 2011;60:2112-2119.
4. Atarashi K, Nishimura J, Shima T, et al. ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature* 2008;455:808-812.
5. Bahgat MMand Ibrahim DR. Proinflammatory cytokine polarization in type 2 diabetes. *Cent Eur J Immunol* 2020;45:170-175.
6. Beriou G, Costantino CM, Ashley CW, et al. IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood* 2009;113:4240-4249.
7. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 2007;110:1225-1232.
8. Calle MCand Fernandez ML. Inflammation and type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 2012;38:183-191.
9. Catalan D, Mansilla MA, Ferrier A, et al. Immunosuppressive Mechanisms of Regulatory B Cells. *Front Immunol* 2021;12:611795.
10. Cope A, Le Friec G, Cardone J, et al. The Th1 life cycle: molecular control of IFN-gamma to IL-10 switching. *Trends Immunol* 2011;32:278-286.
11. Corbett JA, Sweetland MA, Wang JL, et al. Nitric oxide mediates cytokine-induced inhibition of insulin secretion by human islets of Langerhans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:1731-1735.
12. Corbett JA, Wang JL, Sweetland MA, et al. Interleukin 1 beta induces the formation of nitric oxide by beta-cells purified from rodent islets of Langerhans.

- Evidence for the beta-cell as a source and site of action of nitric oxide. *J Clin Invest* 1992;90:2384-2391.
13. D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, et al. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med* 1993;178:1041-1048.
  14. Deknuydt F, Bioley G, Valmori D, et al. IL-1beta and IL-2 convert human Treg into T(H)17 cells. *Clin Immunol* 2009;131:298-307.
  15. Dhawan Dand Sharma S. Abdominal Obesity, Adipokines and Non-communicable Diseases. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2020;203:105737.
  16. Donath MY, Dalmas E, Sauter NS, et al. Inflammation in obesity and diabetes: islet dysfunction and therapeutic opportunity. *Cell Metab* 2013;17:860-872.
  17. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med* 2004;200:277-285.
  18. Eizirik DLand Mandrup-Poulsen T. A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia* 2001;44:2115-2133.
  19. Endo Y, Asou HK, Matsugae N, et al. Obesity Drives Th17 Cell Differentiation by Inducing the Lipid Metabolic Kinase, ACC1. *Cell Rep* 2015;12:1042-1055.
  20. Fletcher JM, Lonergan R, Costelloe L, et al. CD39+Foxp3+ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *J Immunol* 2009;183:7602-7610.
  21. Gerosa F, Paganin C, Peritt D, et al. Interleukin-12 primes human CD4 and CD8 T cell clones for high production of both interferon-gamma and interleukin-10. *J Exp Med* 1996;183:2559-2569.
  22. Guo Y, Zhang X, Qin M, et al. Changes in peripheral CD19(+)Foxp3(+) and CD19(+)TGFbeta(+) regulatory B cell populations in rheumatoid arthritis patients with interstitial lung disease. *J Thorac Dis* 2015;7:471-477.
  23. Guzman-Flores JMand Lopez-Briones S. [Cells of innate and adaptive immunity in type 2 diabetes and obesity]. *Gac Med Mex* 2012;148:381-389.



24. Honkanen J, Nieminen JK, Gao R, et al. IL-17 immunity in human type 1 diabetes. *J Immunol* 2010;185:1959-1967.
25. 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;186:1162-1172.
26. Jager J, Gremeaux T, Cormont M, et al. Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology* 2007;148:241-251.
27. Kanety H, Feinstein R, Papa MZ, et al. Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1. *J Biol Chem* 1995;270:23780-23784.
28. Katsikis PD, Cohen SB, Londei M, et al. Are CD4+ Th1 cells pro-inflammatory or anti-inflammatory? The ratio of IL-10 to IFN-gamma or IL-2 determines their function. *Int Immunol* 1995;7:1287-1294.
29. Kimura A and Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol* 2010;40:1830-1835.
30. Kleinewietfeld M and Hafler DA. The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Semin Immunol* 2013;25:305-312.
31. Kluger MA, Melderis S, Nosko A, et al. Treg17 cells are programmed by Stat3 to suppress Th17 responses in systemic lupus. *Kidney Int* 2016;89:158-166.
32. Koenen HJ, Smeets RL, Vink PM, et al. Human CD25highFoxp3pos regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood* 2008;112:2340-2352.
33. Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, et al. Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nat Med* 2014;20:62-68.
34. Lawson JM, Tremble J, Dayan C, et al. Increased resistance to CD4+CD25hi regulatory T cell-mediated suppression in patients with type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol* 2008;154:353-359.

35. Leon-Pedroza JI, Gonzalez-Tapia LA, del Olmo-Gil E, et al. [Low-grade systemic inflammation and the development of metabolic diseases: from the molecular evidence to the clinical practice]. *Cir Cir* 2015;83:543-551.
36. Martinez-Blanco M, Lozano-Ojalvo D, Perez-Rodriguez L, et al. Retinoic Acid Induces Functionally Suppressive Foxp3(+)RORgammat(+) T Cells In Vitro. *Front Immunol* 2021;12:675733.
37. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-419.
38. Mendez-Frausto G, Romero-Aguilera G, Sanchez-Gutierrez R, et al. B regulatory cells associated with changes in biochemical and inflammatory parameters in normal-glycemic individuals, pre-diabetes and T2DM patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2021;173:108692.
39. Paust HJ, Turner JE, Riedel JH, et al. Chemokines play a critical role in the cross-regulation of Th1 and Th17 immune responses in murine crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 2012;82:72-83.
40. Rossi L, Salvestrini V, Ferrari D, et al. The sixth sense: hematopoietic stem cells detect danger through purinergic signaling. *Blood* 2012;120:2365-2375.
41. Rui L, Yuan M, Frantz D, et al. SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem* 2002;277:42394-42398.
42. Saladrigas MV, Talens M, Pestana L, et al. [Declaration of Helsinki, traduttore traditore?]. *Med Clin (Barc)* 2001;117:597-598.
43. Santos CBR, Santos KLB, Cruz JN, et al. Molecular modeling approaches of selective adenosine receptor type 2A agonists as potential anti-inflammatory drugs. *J Biomol Struct Dyn* 2021;39:3115-3127.
44. Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, et al. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J Biol Chem* 2003;278:13740-13746.

45. Singh B, Summers K and Kerfoot SM. Novel regulatory Th17 cells and regulatory B cells in modulating autoimmune diseases. *Cell Immunol* 2019;339:29-32.
46. Swaroop JJ, Rajarajeswari D and Naidu JN. Association of TNF-alpha with insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *Indian J Med Res* 2012;135:127-130.
47. Tchernof A and Despres JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev* 2013;93:359-404.
48. Trinchieri G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J Exp Med* 2007;204:239-243.
49. Tsiavou A, Degiannis D, Hatziagelaki E, et al. Intracellular IFN-gamma production and IL-12 serum levels in latent autoimmune diabetes of adults (LADA) and in type 2 diabetes. *J Interferon Cytokine Res* 2004;24:381-387.
50. Varadaiah YGC, Sivanesan S, Nayak SB, et al. Purine metabolites can indicate diabetes progression. *Arch Physiol Biochem* 2022;128:87-91.
51. Venigalla RK, Tretter T, Krienke S, et al. Reduced CD4+,CD25- T cell sensitivity to the suppressive function of CD4+,CD25high,CD127 -/low regulatory T cells in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2008;58:2120-2130.
52. Voo KS, Wang YH, Santori FR, et al. Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:4793-4798.
53. Winer S, Paltser G, Chan Y, et al. Obesity predisposes to Th17 bias. *Eur J Immunol* 2009;39:2629-2635.
54. Yang X, Zhao Y, Sun Q, et al. Adenine nucleotide-mediated regulation of hepatic PTP1B activity in mouse models of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2019;62:2106-2117.
55. Zeng C, Shi X, Zhang B, et al. The imbalance of Th17/Th1/Tregs in patients with type 2 diabetes: relationship with metabolic factors and complications. *J Mol Med (Berl)* 2012;90:175-186.

56. Zhang Y, Wang Z, Zhao Y, et al. The plasma 5'-AMP acts as a potential upstream regulator of hyperglycemia in type 2 diabetic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;302:E325-333.
57. Zhu J, Yamane Hand Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annu Rev Immunol* 2010;28:445-489.
58. Zhu L, Song H, Zhang L, et al. Characterization of IL-17-producing Treg cells in type 2 diabetes patients. *Immunol Res* 2019;67:443-449.
59. Zuniga LA, Shen WJ, Joyce-Shaikh B, et al. IL-17 regulates adipogenesis, glucose homeostasis, and obesity. *J Immunol* 2010;185:6947-6959.
60. Gimeno Orna JA, Ortez Toro JJ, Peteiro Miranda CM. Evaluation and management of residual cardiovascular risk in patients with diabetes. *Endocrinol Diabetes Nutr.* 2020 ;67(4):279-288.
61. Medina-Verástegui. Cardiovascular risk in patients with diabetes mellitus 2. *Med Int Méx* 2014;30:270-275.