

Tesis Doctoral

# Influencia del condicionamiento genético y del estrés en la desregulación de la respuesta inmune en el estado diabético. Participación del estrés oxidativo

Rubinstein Guichon, Mara Roxana

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Rubinstein Guichon, Mara Roxana. (2011). Influencia del condicionamiento genético y del estrés en la desregulación de la respuesta inmune en el estado diabético. Participación del estrés oxidativo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Rubinstein Guichon, Mara Roxana. "Influencia del condicionamiento genético y del estrés en la desregulación de la respuesta inmune en el estado diabético. Participación del estrés oxidativo". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

***Influencia del condicionamiento  
genético y del estrés en la  
desregulación de la respuesta  
inmune en el estado diabético.  
Participación del estrés oxidativo***

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la  
Universidad de Buenos Aires en el área: Ciencias  
Biológicas.

**Mara Roxana Rubinstein Guichon**

**Directoras:** Miriam Ruth Wald  
Ana Maria Genaro

**Consejero de estudios:** Eduardo Artz

**Lugar de trabajo:** Centro de Estudios Farmacológicos y  
Botánicos (CEFYO-CONICET-UBA), Buenos Aires,  
Argentina

Buenos Aires, 2011

## **Influencia del condicionamiento genético y del estrés en la desregulación de la respuesta inmune en el estado diabético.**

### **Participación del estrés oxidativo.**

Aunque está clínicamente aceptado que la diabetes predispone a sufrir infecciones severas y los estudios sugieren una asociación entre esta patología y las infecciones, no se conocen los mecanismos que median entre la diabetes y la inmunosupresión. A su vez, el estrés tiene un significativo reconocimiento en el desarrollo y la evolución de la diabetes. Es así que el objetivo del presente trabajo fue estudiar la respuesta inmune en la diabetes mellitus tipo 1, ampliando el conocimiento acerca de los factores genéticos y no genéticos que participan en la evolución del estado diabético y en la alteración de la respuesta inmune. Para esto, se utilizó un modelo experimental murino de diabetes mellitus tipo 1 en dos cepas de ratones: BALB/cByJ y C57Bl/6J y se analizó la respuesta inmune encontrándose que, en los ratones diabéticos de la cepa BALB/cByJ, la respuesta inmune determinada *in vivo* e *in vitro* se encontraba afectada, mientras que en los ratones de la cepa C57Bl/6J no lo estaba. A continuación se investigó el efecto del estrés sobre la respuesta inmune en la diabetes. Para esto se utilizó el modelo de estrés crónico moderado (CMS) aplicado luego de la instauración de la diabetes. Los resultados mostraron que en los ratones diabéticos de la cepa BALB/cByJ el CMS provocó alteraciones más tempranas sobre la proliferación linfocitaria probablemente mediadas por el aumento en la glucemia. En estos ratones se observó una correlación positiva entre la glucemia y catecolaminas. En cuanto al efecto sobre la cepa C57Bl/6J, sólo se encontró un aumento en las glucemias sin estar presente la alteración inmune. Dado que la hiperglucemia es el principal factor involucrado en el desarrollo de las complicaciones de la diabetes, se evaluó su participación en los efectos observados. Para esto, se analizó el efecto de la alta glucosa sobre la actividad linfocitaria normal. Las altas concentraciones de glucosa sobre linfocitos provenientes de la cepa BALB/cByJ afectaron directamente la proliferación y condujeron a la muerte de las células, alteración que no se observó en los linfocitos provenientes de la cepa C57Bl/6J. Entre los mecanismos que estarían implicados en los efectos deletéreos de la alta glucosa se destacó el aumento en el estrés oxidativo. Estos resultados señalan la influencia del condicionamiento genético y del estrés en el deterioro de la respuesta inmune en el estado diabético. Si bien la extrapolación de estos resultados a pacientes con diabetes debe ser tomada con precaución, puntualizan la importancia de un temprano y adecuado control de la glucemia como así también de los factores ambientales que puedan alterarla.

**Palabras clave:** Diabetes, estrés, ratones BALB/cByJ y C57Bl/6J, respuesta inmune, alta glucosa, estrés oxidativo.

## **Genetic background and stress influence in the diabetic dysregulation of the immune response. Involvement of oxidative stress.**

Diabetes is widely believed to predispose to serious infections. Experimental clinical literature supports an association between diabetes and infection. However, the mechanisms linking diabetes and immunosuppression are not well defined. In particular, stress has a significant recognition in the development and progression of diabetes. Therefore, the aim of the present project was to study the immune response in type 1 diabetes and genetic and nongenetic factors involved in the evolution of the diabetic state and in immune response alteration. For this purpose, an experimental animal model of diabetes was used in two mice strains: BALB/cByJ and C57Bl/6J and the immune response was analyzed. The immune response in BALB/cByJ diabetic mice was affected while in C57Bl/6J it was not. Then, the effect of stress on immune response in the diabetic state was investigated. The animals were exposed to a chronic mild stress model after diabetes induction. Stress exposure in BALB/cByJ mice caused earlier alterations on immune response mediated by the glycaemia increase. Also, a positive correlation between glycaemia and catecholamines was found. In C57Bl/6J mice, stress exposure only caused glycaemia increase without the immune alteration. Hyperglycemia is the main factor involved in the development of diabetes complication, thus its participation in the observed effects was evaluated. The effect of high glucose incubation on lymphocyte reactivity was studied. In BALB/cByJ lymphocytes, high glucose decreased the proliferation and increased the apoptosis whereas in C57Bl/6J lymphocytes these alterations were not observed. Among the mechanisms involved in the deleterious effects of high glucose, the increase in oxidative stress was the most important. These results show the influence of genetic background and stress in the immune alteration in the diabetic state. Although extrapolation of these results to patients with diabetes should be taken with caution, it is important to emphasize the early and adequate glycaemia control as well as environmental factors too.

**Key Words:** Diabetes, stress, BALB/cByJ and C57Bl/6J mice, immune response, high glucose, oxidative stress.

Los resultados presentados en esta tesis han sido parcialmente publicados en:

**Rubinstein R**, Genaro AM, Motta A, Cremaschi G, Wald MR. **Impaired immune responses in streptozotocin-induced type I diabetes in mice. Involvement of high glucose.** *Clin Exp Immunol* 2008; 154(2):235-46.

**Rubinstein MR**, Cremaschi GA, Oliveri LM, Gerez EN, Wald MR, Genaro AM. **Possible involvement of stress hormones and hyperglycaemia in chronic mild stress-induced impairment of immune functions in diabetic mice.** *Stress* 2010; 13(5):384-91.

**Rubinstein MR**, Albarracín R, Genaro AM y Wald MR. **Differential Effect of Hiperglycemia on Immune Response in an Experimental Model of Diabetes in BALB/cByJ and C57BL/6J Mice. Participation of Oxidative Stress.** Enviado para su publicación a la revista *Diab Metab Res Rev*.

**AGRADECIMIENTOS:** *(segunda oportunidad, con más inspiración. Ojo! no es que no tuviese a quien agradecer, sino que no contaba con la inspiración necesaria para decírselo!)*

Son muchas las personas a las que tengo que agradecer por este trabajo, pero empecemos por los principales involucrados que son mis directoras. A la Dra. Miriam R. Wald y a la Dra. Ana M. Genaro por darme la oportunidad de realizar mi doctorado, por guiarme y enseñarme, por los consejos otorgados y por el apoyo incondicional que recibí. Por cumplir con su rol de directoras, pero además, ser grandes consejeras estando siempre dispuestas a escuchar. Por hacer que el laboratorio tenga una gran calidez humana, generando un ambiente ideal para el trabajo. En este punto también tiene un rol fundamental Graciela, quien siempre esta disponible para dar cualquier consejo, sea o no científico y siempre empujando hacia adelante. Y como un laboratorio no lo hacen solo sus directores, también tengo que agradecer a todos mis compañeros con quien compartí gran parte de mi vida durante estos cinco años de doctorado; quienes están siempre dispuestos a ayudar desinteresadamente. El ejemplo más claro es Alicia, que pospone sus cosas con tal de ayudar al prójimo. A Laurita, Ceci, Romi, Yami y Maria Rosa con quienes compartimos la “pecera”, las charlas y los mates. A Maria Laura, que con sus 5 minutos soluciona todos los problemas. A Maria, por su buen humor diario y su habilidad para contagiárselo a todos. A Edu, encargado de musicalizar el labo. A Lenki, Flor y Ale, siempre dispuestos a escuchar y a transmitir buena onda. A Bere, Damian y Lenki (otra vez) por las consultas estadísticas que nos hacemos y tratamos de respondernos entre todos. En resumen, a todo el grupo del laboratorio por los consejos, las ideas, por estar siempre dispuestos a ayudar y a transmitir buena onda. Por ser más que compañeros de laboratorio.

Pero en estos cinco años no todo fue trabajo, conocí (en realidad, antes que se queje, ya lo conocía) a una de las personas más importantes en mi vida: Lucho, mi amor. Y por supuesto, no puedo dejar de agradecerle a él también, quien me acompañó en todo sentido (en la vida y en los fines de semana que tuve que ir al labo), me aguantó, me alentó en todo y me ayudó en todo lo que estuvo a su alcance y no tan a su alcance. Porque es mi compañero para toda la vida y me brinda su amor incondicional. Porque junto a él y porque no, junto a Chango, formamos nuestra familia. Y con Lucho, también vino su familia a quienes también debo agradecerles. Desde un primer momento me recibieron de la mejor manera y me incorporaron como

una más. Especialmente debo agradecer a Stella, mi suegra, a quien hice volver al trabajo a pesar de estar jubilada. Muchas gracias por las correcciones!

También debo agradecer a todos mis amigos que siempre estuvieron para colaborar y escuchar, porque me brindaron su amistad, sus consejos. Por los momentos de alegría y por estar en los no tan alegres. A quienes veo más seguido y a quienes no tanto, pero los que igualmente estuvieron conmigo e involucrados en mi vida. En este momento, me permito agradecer muy especialmente a Gaby, a la Pancha y a Ceci, personas extraordinarias, con una sensibilidad y sensatez excepcional, que siempre estuvieron dispuestas a escuchar y principalmente, a hacerme hablar. Y vos Maga, luego de tantos años de aguante, siempre vas a tener un apartado especial!

Además debo agradecer a mis padres, que si bien no estuvieron presentes durante mi doctorado, a través de su apoyo, fueron quienes me alentaron a seguir en este camino. Siempre estarán en mi memoria. A mis hermanos, con quienes tuvimos que luchar para salir adelante.

Sólo me queda agradecer a todos los que colaboraron de una u otras manera con este trabajo:

A Daniel González por su gran ayuda con el modelo de estrés crónico moderado.

A la Dra. Ana Franchi por permitirme ser parte del CEFYBO.

A todo el personal del instituto que de alguna forma u otra colaboraron para que pudiera concluir con este trabajo.

A la Dra. Esther Gerez y a la Lic. Leda Oliveri por la colaboración para la determinación de la insulina.

A la Dra. Maria del Carmen Martin por sus aportes en la determinación de la capacidad antioxidante total.

A Johnson-Johnson por colaborar con las tiras reactivas para la medición de las glucemias.

Al Conicet por otorgarme las Becas de postgrado Tipo I y II que me permitieron realizar este trabajo.

Simplemente, me queda por agradecer a todos por ser parte de mi vida.

**MUCHAS GRACIAS!!!!**



**ABREVIATURAS:**

**ABTS<sup>+</sup>**: 2,2-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonato)  
**ACTH**: hormona adrenocorticotrofina  
**AGEs**: productos avanzados de glicosilación  
**AVP**: vasopresina  
**CAT**: catalasa  
**CFSE**: 5(6)-carboxifluorescein diacetato succinimidilester  
**CMS**: estrés crónico moderado  
**Con A**: concanavalina A  
**CPA**: células presentadoras de antígeno  
**CRS**: estrés crónico por inmovilización  
**DCF**: 2'-7'-diclorofluoresceína  
**DCFH-DA**: diacetato de 2'-7'-diclorofluoresceína  
**DTNB**: ácido 5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoico  
**EDTA**: ácido etilendiaminotetraacético  
**ELISA**: técnica de enzimoimmunoensayo  
**GC**: glucocorticoides  
**GRc**: glóbulos rojos de carnero  
**GSH**: glutatión reducido  
**GSSG**: glutatión oxidado  
**HPA**: eje hipotálamo-pituario-adrenal  
**IFN  $\gamma$** : interferón  $\gamma$   
**Ig**: inmunoglobulinas  
**IL**: interleuquina  
**i.p.**: intraperitonealmente  
**LB**: linfocito B  
**LC**: locus coeruleus ()  
**LPS**: lipopolisacárido  
**LT**: linfocito T  
**MDA**: malondialdehido  
**MHC**: complejo mayor de histocompatibilidad  
**NA**: noradrenalina  
**NAC**: N-acetilcisteína  
**PKC**: proteína quinasa C  
**pNPP**: para-nitrofenilfosfato

- PVN:** núcleo paraventricular del hipotálamo
- R-GC:** receptores para glucocorticoides
- R-MC:** receptores para mineralocorticoides
- ROS:** especies reactivas del oxígeno
- SNA:** sistema nervioso autónomo
- SNS:** sistema nervioso simpático
- SOD:** superóxido dismutasa
- STZ:** estreptozotocina
- TAC:** capacidad antioxidante total
- TBARS:** especies que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico
- Tc:** linfocitos T citotóxicos
- TCR:** receptor para el antígeno del linfocito T (*T cell receptor*)
- T-dependientes:** antígenos timodependientes
- Th:** linfocitos T helper o colaboradores
- T-independientes:** antígenos timoindependientes
- TNB:** ácido 5-thio-2-nitrobenzoico

---

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Trabajos publicados</b> .....	4
<b>Agradecimientos</b> .....	5
<b>Abreviaturas</b> .....	7
<b>Introducción</b> .....	14
1. Diabetes mellitus.....	14
1.1 Páncreas.....	14
1.2 Insulina.....	15
1.3 Tipos de diabetes.....	15
1.4 Hiperglucemia .....	17
1.4.2 Estrés oxidativo.....	20
1.4.2 Mecanismos antioxidantes .....	21
1.4.1.1 Superóxido dismutasa .....	21
1.4.1.2 Catalasa .....	22
1.4.1.3 Glutación.....	22
1.5 Infecciones y diabetes.....	23
2. Estrés .....	26
2.1 Mediadores del estrés .....	27
2.2 Efecto de los mediadores del estrés sobre el sistema inmune .....	29
2.3 Interacción entre estrés y diabetes.....	30
3. Sistema inmune .....	32
3.1 Clasificación de la respuesta inmune .....	32
3.1.1 Respuesta inmune adaptativa.....	33
3.1.1.1 Anticuerpos .....	33
3.1.1.2 Citoquinas .....	34
3.1.1.3 Células involucradas en la respuesta adaptativa .....	34
3.1.1.4 Tejido linfoide secundario .....	36
3.1.1.5 Activación de linfocitos .....	37
4. Modelos animales .....	40
4.1 Modelos animales de estrés.....	40
<b>Hipótesis de trabajo y objetivos</b> .....	42

---

<b>Materiales y métodos</b> .....	45
1. Animales .....	46
2. Modelos animales .....	46
2.1 Modelos animales de diabetes mellitus tipo 1 .....	46
2.2 Estrés crónico moderado .....	46
2.3 Estrés crónico por inmovilización .....	48
2.4 Combinación de los distintos modelos .....	48
3. Determinación de parámetros bioquímicos y hormonales .....	50
3.1 Medición de la glucemia .....	50
3.2 Determinación de los niveles de hemoglobina glicosilada .....	51
3.3 Medición de los niveles de insulina .....	51
3.4 Medición de los niveles de corticosterona .....	51
3.5 Medición de los niveles de catecolaminas .....	52
4. Determinaciones <i>in vivo</i> .....	53
4.1 Inmunizaciones .....	53
4.2 Titulación .....	53
4.2.1 Obtención de membranas de glóbulos rojos de carnero .....	53
4.2.2 Determinación del título de anticuerpo por ELISA .....	53
5. Determinaciones <i>in vitro</i> .....	55
5.1 Obtención de las suspensiones celulares .....	55
5.2 Determinación de la viabilidad .....	55
5.3 Preincubación celular .....	56
5.4 Determinación de la apoptosis .....	56
5.4.1 Tinción con Hoeschst 33342 .....	56
5.4.2 Análisis por citometría de flujo de los linfocitos teñidos con yoduro de propidio .....	57
5.4.3 Análisis por citometría de flujo utilizando Anexina V-FITC e yoduro de propidio .....	57
5.5 Medición de la proliferación celular .....	58
5.5.1 Por incorporación de <sup>3</sup> H-timidina .....	58
5.5.2 Por dilución del colorante CFSE .....	59
5.6 Estimación del estrés oxidativo .....	60
5.6.1 Determinación de los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) .....	60
5.6.2 Determinación de la peroxidación lipídica .....	60
5.6.3 Determinación de la capacidad antioxidante total .....	61

5.6.4 Determinación de los niveles de glutatión .....	61
5. Análisis estadístico .....	62
<b>Resultados</b> .....	64
PARTE I: RESPUESTA INMUNE EN LA DIABETES .....	65
1.1 Respuesta inmune <i>in vivo</i> .....	65
1.2 Respuesta inmune <i>in vitro</i> .....	67
PARTE II: EFECTO DEL ESTRÉS EN LA INSTAURACIÓN Y EVOLUCIÓN DE LA DIABETES .....	69
2.1 Efecto del estrés previo a la instauración de la diabetes .....	69
2.1.1 Estrés crónico por inmovilización .....	69
2.1.2 Estrés crónico moderado .....	70
2.2 Efecto del estrés posterior a la instauración de la diabetes .....	72
2.2.1 Estrés crónico por inmovilización .....	72
2.2.2 Estrés crónico moderado .....	73
2.2.2.1 Sobrevida .....	75
PARTE III: EFECTO DEL ESTRÉS Y LA DIABETES EN LA RESPUESTA INMUNE: MEDIADORES NEUROENDOCRINOS INVOLUCRADOS .....	76
3.1 Estudio de la proliferación linfocitaria .....	76
3.2 Estudio sobre los niveles de corticosterona y catecolaminas .....	77
3.3 Correlación entre los niveles de glucemias, corticosterona o catecolaminas y la proliferación linfocitaria .....	79
3.4 Correlación entre los niveles de insulina, corticosterona o catecolaminas y la glucemia .....	81
PARTE IV: PARTICIPACIÓN DEL CONDICIONAMIENTO GENÉTICO. ESTUDIO SOBRE LA CEPA C57Bl/6J .....	82
4.1 Respuesta inmune en la diabetes .....	82
4.1.1 Respuesta inmune <i>in vivo</i> .....	82
4.1.2 Respuesta inmune <i>in vitro</i> .....	84
4.2 Efecto del estrés en la evolución de la diabetes .....	85
4.3 Efecto del estrés y la diabetes en la respuesta inmune en animales C57Bl/6J: mediadores neuroendocrinos involucrados .....	86
4.3.1 Estudio de la proliferación linfocitaria .....	86
4.3.2 Estudio sobre los niveles de corticosterona y catecolaminas .....	87
PARTE V: PARTICIPACIÓN DE LA HIPERGLUCEMIA Y DEL ESTRÉS OXIDATIVO .....	89

---

5.1 Efecto de altas concentraciones de glucosa sobre la actividad linfocitaria normal.....	89
5.1.1 Viabilidad y apoptosis .....	89
5.1.2 Proliferación linfocitaria .....	93
5.2 Acción de la alta glucosa sobre el estrés oxidativo.....	96
5.2.1 Determinación de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS).....	96
5.2.2 Peroxidación lipídica .....	98
5.3 Acción del antioxidante N-acetilcisteína.....	100
5.3.1 Viabilidad y apoptosis .....	101
5.3.2 Proliferación linfocitaria .....	102
5.4 Acción de la alta glucosa sobre los mecanismos antioxidantes.....	105
5.4.1 Determinación de la capacidad antioxidante total .....	105
5.4.1 Determinación de los niveles de glutatión total y reducido .....	106
<b>Discusión</b> .....	110
<b>Conclusiones</b> .....	126
<b>Bibliografía</b> .....	131

# **INTRODUCCIÓN**

---

## 1. Diabetes mellitus

La primera referencia clínica de lo que hoy conocemos como Diabetes Mellitus se encuentra en el Papiro de Ebers escrito en Egipto, que data del año 1500 A.C. El término Diabetes comienza a utilizarse a partir del Siglo I por el médico griego Arateus de Cappadocia, quien apeló a la palabra *diabaínein*. Asoció la enfermedad con la idea de “un derretimiento de los músculos y la carne que se escapan del cuerpo en forma de orina”, haciendo referencia a la poliuria que se observa en este síndrome. Hoy en día se calcula que hay más de 346 millones de personas con diabetes (Información disponible en el sitio de internet de la Organización Mundial de la Salud).

La diabetes es un síndrome complejo que se caracteriza por una falta de control en el metabolismo de la glucosa. Los síntomas más comunes son: hiperglucemia, glucosuria, polidipsia y poliuria.

Entre las complicaciones más comunes que afectan a los pacientes con diabetes se encuentran las macro y micro vasculopatías, retinopatías, neuropatías y nefropatías. Además es muy común la aparición de infecciones, principalmente infecciones renales, enfermedad periodontal, infecciones de la piel, entre otras. Evidencias clínicas y experimentales sugieren que estas alteraciones podrían deberse a la hiperglucemia (Bailey C, 2000; Brownlee, 2001; DeFronzo, 1997; Evans y col., 2002; Porte y Schwartz, 1996; Schmidt y Stern, 2000; The DCCT group, 1993; Turner y col., 1998; UKPDS 33, 1998).

### 1.1 Páncreas

El páncreas es un órgano glandular de secreción tanto exócrina como endócrina. La parte exócrina contiene glándulas llamadas acinos pancreáticos que secretan enzimas que colaboran con la digestión. La parte endócrina se agrupa en los islotes de Langerhans, estos están compuestos por distintos tipos celulares (Randall y col., 1998):

- *Células alfa (Alfa cell)*: sintetizan y liberan glucagón, hormona que eleva el nivel de glucosa en la sangre.
- *Células beta (Beta Cell)*: producen y liberan insulina. Esta hormona regula el nivel de glucosa en sangre, facilitando su uso por parte de las células y retirando su exceso, estimulando su almacenamiento en el hígado en forma de glucógeno.



- *Célula delta (Delta Cell)*: producen somatostatina, hormona que se postula que inhibe la secreción de insulina y glucagón (Hauge-Evans y col., 2009, Strowski y col., 2006).
- *Célula PP (PP Cell)*: producen y liberan Polipéptido Pancreático.

## 1.2 Insulina

La insulina fue descubierta por Frederick Banting, Charles Best y John Macleod. Sus primeros resultados se describieron en una publicación en la revista *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* fechada en febrero de 1922. Es la hormona hipoglucemiante y se encuentra muy conservada en todos los vertebrados (Steiner y col., 1985). El estímulo principal para su liberación es el aumento de glucosa en sangre, aunque también responde a un aumento en la concentración de aminoácidos (estímulo primitivo).

La insulina tiene efecto sobre el metabolismo de los hidratos de carbono, aumentando la captación de glucosa por parte de las células del músculo y tejido adiposo principalmente, mediante la síntesis, movilización o translocación a la superficie celular de los transportadores de glucosa, GLUT-4. También estimula la glucogenogénesis e inhibe la gluconeogénesis en el hígado, ya que regula a las enzimas que participan en estas vías metabólicas (Randall y col., 1998).

Con respecto al metabolismo lipídico, la insulina estimula la lipogénesis en el hígado y en el tejido adiposo, aumentando los depósitos de grasa en este último. También inhibe la degradación de triglicéridos y la liberación de ácidos grasos (Randall y col., 1998).

En el metabolismo proteico, esta hormona estimula la captación de aminoácidos en el hígado y en los músculos así como también la incorporación de éstos en las proteínas. Paralelamente inhibe el catabolismo proteico (Randall y col., 1998).

## 1.3 Tipos de diabetes

Existen distintos tipos de diabetes dependiendo de las características clínicas del paciente y del momento en que se desarrolla la patología. La Organización mundial de la Salud, reconoce tres tipos de diabetes (tipo 1, tipo 2 y gestacional), mientras que la Asociación Americana de Diabetes (ADA) las clasifica en cuatro tipos distintos (tipo 1, tipo 2, gestacional y otros tipos de diabetes).

La **Diabetes Mellitus tipo 1** representa aproximadamente el 10% de los casos. Normalmente aparece antes de los 20 años y sus síntomas surgen abruptamente. El

incremento en la glucemia se asocia con una disminución en la concentración de la insulina circulante y ésta a su vez con una deficiencia en las células beta del páncreas, que puede llegar hasta una disminución del 80-90%. Debido a la imposibilidad de utilizar la glucosa se metabolizan los lípidos, que da como resultado una producción incrementada de cuerpos cetónicos, estado que se denomina cetoacidosis. El tratamiento para este tipo de diabetes es la administración exógena de insulina, que si bien no regula tan delicadamente los niveles de glucosa en sangre como el mecanismo fisiológico normal, es imprescindible para lograr la supervivencia de los pacientes (American Diabetes Association, 2010; Poskus y Ermácora, 1998).

La destrucción de las células beta del páncreas ocurre por un mecanismo autoinmune. Se han encontrado anticuerpos dirigidos hacia las células de los islotes (ICA), anticuerpos anti- insulina (IAA) y anticuerpos contra el antígeno GAD (Glutamic Acid Decarboxylase) de las células beta del páncreas (GADA). Se conoce que existen predisposiciones genéticas, como por ejemplo determinados alelos del sistema de histocompatibilidad (HLA), que participan en el inicio de la respuesta autoinmune. Además, ciertos factores ambientales, como las infecciones virales, pueden ser detonantes para que el sistema inmune pierda la tolerancia hacia determinados antígenos propios y desarrolle la enfermedad autoinmune. Asimismo, determinados factores de la dieta, como ser una corta lactancia materna o una exposición temprana a ciertos cereales pueden participar en el desarrollo de la autoinmunidad (Achenbach y col., 2005; Poskus y Ermácora, 1998).

La **Diabetes Mellitus tipo 2** representa más del 90% de todos los casos. Frecuentemente aparece en personas mayores de 40 años con sobrepeso y antecedentes familiares de la patología. Asimismo, el riesgo de desarrollar esta forma de diabetes aumenta con la falta de actividad física (Golay e Ybarra, 2005). Entre las causas que se sugieren que participan en la etiología de esta enfermedad podemos mencionar fallas en la acción de la insulina (insulinorresistencia, defectos en la maquinaria molecular que intermedia la respuesta de la insulina), deficiencia en la secreción de insulina o una combinación de ambos procesos (American Diabetes Association, 2010; Poskus y Ermácora, 1998; Rodríguez y col., 1999). Los pacientes presentan un aumento en la glucemia al progresar la patología, si bien las manifestaciones clínicas aparecen lentamente. Esto ocurre porque inicialmente el páncreas contrarresta la insulinorresistencia periférica incrementando la secreción de insulina y por eso los signos clínicos suelen ser ausentes o moderados y el individuo permanece sin diagnóstico. Al transcurrir el tiempo, la masa funcional de células beta del páncreas no es suficiente y se manifiesta la hiperglucemia característica (Muio y col., 2008).

El desarrollo de Diabetes tipo 2 se asocia con una fuerte predisposición genética, sin embargo, las bases genéticas de esta forma son complejas y poco definidas (American Diabetes Association, 2010). Asimismo, deben existir otros factores, como por ejemplo causas alimenticias o ambientales, para que se declare la misma (Lin y Sun, 2010; Poskus y Ermácora, 1998).

Hoy en día, se reconocen formas intermedias de diabetes (clasificadas por la ADA como otros tipos de diabetes). Se describió una forma tardía de diabetes que aparece en los adultos denominada **Diabetes Autoinmune Latente en los adultos (LADA)**. Es un desorden autoinmune, pero la destrucción de las células beta del páncreas es más lenta que en la diabetes tipo 1. Los pacientes no presentan signos de insulinoresistencia (Appel y col., 2009; Poskus y Ermácora, 1998).

En los últimos años se ha descrito un significativo incremento de otro tipo de diabetes denominada **MODY (Maturity Onset Diabetes in Youngs)**. La aparición ocurre en edades tempranas (previo a los 25 años). Se caracteriza por un impedimento en la secreción de insulina con mínimos defectos en la acción de esta hormona. Su desarrollo está asociado a anormalidades autosómicas dominantes. Hasta el momento, se han identificado seis loci afectados en diferentes cromosomas (American Diabetes Association, 2010).

La **Doble Diabetes** es un nuevo tipo que también afecta a niños y adolescentes. En este caso, la patología se manifiesta con características de ambos tipos de diabetes: se observa insulino resistencia y marcadores de autoinmunidad pancreática (Pozzilli y Buzzetti, 2007).

Otra circunstancia donde puede aparecer diabetes es durante el embarazo. Este tipo se conoce como **Diabetes Mellitus Gestacional** y afecta en promedio al 7% de las embarazadas (dependiendo de la población, el rango es entre el 1% y el 14%). Luego del embarazo, la diabetes puede desaparecer o continuar la intolerancia a la glucosa (American Diabetes Association, 2010; Poskus y Ermácora, 1998).

#### 1.4 Hiperglucemia

Numerosos estudios poblacionales muestran que la hiperglucemia es uno de los principales agentes causales de las complicaciones existentes en los pacientes con diabetes. El meta-análisis de estudios clínicos realizados en la población con diabetes, "Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)" de los años 1993 (The DCCT Group, 2003) y 2004 (Nathan y col., 2005) (pacientes con diabetes tipo 1) y el UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) (UKPDS 33, 1998) (pacientes con diabetes tipo 2) permitió evidenciar que aquellos pacientes tratados intensivamente con insulina (de

forma tal de mantener siempre bajos los niveles de glucemia) podían demorar el desarrollo y la progresión de las complicaciones clásicamente asociadas a la diabetes: retinopatía, neuropatía, alteraciones micro y macrovasculares y riesgo cardiovascular. Resultados similares se observaron en el estudio ADVANCE (The ADVANCE Collaborative Group, 2008) realizado en pacientes con diabetes tipo 2, donde aquellos individuos tratados intensivamente con hipoglucemiantes orales, de forma tal de disminuir los niveles de hemoglobina glicosilada, presentaron una disminución en la incidencia de alteraciones micro y macrovasculares y neuropatías. Por el contrario, el estudio ACCORD (The Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group, 2008), realizado en pacientes con diabetes tipo 2, no pudo encontrar una correlación entre la disminución de los niveles de hemoglobina glicosilada y el riesgo cardiovascular. Asimismo, los pacientes tratados intensivamente con hipoglucemiantes orales e insulina mostraron un aumento en la mortalidad. Si bien los autores no pudieron explicar las causas de este aumento, observaron un mayor número de eventos de hipoglucemia en estos pacientes.

Muchos mecanismos han sido propuestos para explicar los efectos adversos de la hiperglucemia. En estos últimos años, numerosos trabajos describieron que el aumento en el estrés oxidativo es un factor clave en el desarrollo de las complicaciones en la diabetes (Baynes, 1998; Rosen y *col.*, 2001). Las especies reactivas del oxígeno (ROS) se generan como productos de procesos metabólicos normales dentro de la célula. A bajas concentraciones podrían tener un rol fisiológico, incluyendo la activación y proliferación de linfocitos. A altas concentraciones conducen a un estrés oxidativo, causando daño en los componentes celulares. Las ROS pueden funcionar como moléculas de señalización activando distintas vías celulares sensibles al estrés que causan daño celular y son propuestas como las responsables de las complicaciones tardías en la diabetes (Evans y *col.*, 2006). La hiperglucemia no sólo genera ROS sino que también atenúa los mecanismos antioxidantes, creando un estado de estrés oxidativo (Rosen y *col.*, 2001). Es así que el estrés oxidativo es propuesto como uno de los principales mecanismos que actúan en la generación de las disfunciones endoteliales (Giugliano y *col.*, 1996), nefropatías (Lee y *col.*, 2003) y neuropatías (Vincent y *col.*, 2004) presentes en los pacientes con diabetes.

Por otro lado, la hiperglucemia puede conducir a un aumento en la glicosilación no enzimática de proteínas, generando los productos avanzados de glicosilación (AGEs). Los mismos podrían estar implicados en el desarrollo de diversas patologías debidas a la glicosilación de proteínas estructurales que se encuentran fuera de la célula, al desencadenamiento de procesos intracelulares a través de la unión de AGEs a receptores celulares y/o a la glicosilación de proteínas intracelulares y participe en la

aparición de las clásicas complicaciones de la diabetes (Accilli, 2000; Baynes, 1991; Schmidt y Stern, 2000; Vlassara y Palace, 2003).

Otro mecanismo por el que podría actuar la hiperglucemia es a través de la activación de la vía del poliol. La enzima aldosa reductasa convierte los aldehídos tóxicos en alcoholes inactivos (Evans y *col.*, 2002; Greene y *col.*, 1992). La glucosa es un sustrato pobre para esta enzima, pero a altas concentraciones convierte la glucosa en sorbitol, iniciando la vía del poliol (Stevens y *col.*, 2000). La enzima aldosa reductasa es dependiente del NADPH como cofactor, de esta manera una activación excesiva de esta vía depleta a la célula del NADPH, afectando a los mecanismos antioxidantes de la célula. Asimismo, la acumulación del sorbitol produce estrés osmótico, generando más estrés oxidativo y provocando daño celular (Stevens y *col.*, 1993).

Por otro lado, en pacientes con diabetes tipo 2, se encontró que la hiperglucemia puede aumentar los niveles de citoquinas proinflamatorias circulantes, lo que podría llevar a un aumento en el estado oxidativo (Esposito y *col.*, 2002; Kado y *col.*, 1999). Este aumento podría participar en el desarrollo de neuropatías (Shikano y *col.*, 2000) y de placas ateroscleróticas, aumentando el riesgo cardiovascular (Mallat y *col.*, 2001).

Adicionalmente, está ampliamente aceptado que altos niveles de glucosa inducen una activación persistente de la enzima proteína quinasa C (PKC). Distintos estudios han identificado que la activación de la PKC mediada por la hiperglucemia esta asociada con alteraciones presentes en la retina, riñón, tejido vascular y tejido cardiovascular (Koya y King, 1998; Porte y Schwartz, 1996).

Se describió que el aumento en el metabolismo de la glucosa en la diabetes (debido a la hiperglucemia) podría causar una disfunción metabólica aumentando la producción de metilglioxal. Asimismo, en pacientes diabéticos se encontró que los niveles sanguíneos de este metabolito estaban aumentados (McLellan y *col.*, 1994). El metilglioxal, también llamado piruvaldehído o 2-oxopropanal, es un  $\alpha$ -oxoaldehído que se forma naturalmente como un subproducto de diferentes rutas metabólicas, principalmente la glicolisis (Kalapos 1999); por su estructura, es altamente citotóxico (Kalapos 1999). Su depuración se produce principalmente a través del sistema de glioxalasa, el cual esta compuesto por dos enzimas (glioxalasa I y II) y requiere de la participación del glutatión (Racker, 1951). También se describe que el metilglioxal puede inducir, a través de diferentes vías, un aumento en la producción de ROS (Kalapos, 2008) y en la formación de AGEs (Thornalley, 2008).

#### 1.4.1 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo fue definido por Halliwell como un serio desbalance entre la producción de ROS y su eliminación por los mecanismos antioxidantes. Este desequilibrio puede causar efectos tóxicos a través de un incremento en la concentración de ROS. Este aumento produce daños en los componentes celulares, proteínas, lípidos y ADN, que conducen a pérdidas en la energía metabólica, señalización y transporte celular (Halliwell, 1995). La acumulación de estos daños puede producir la muerte celular a través de mecanismos de apoptosis o necrosis (Vincent y *col.*, 2004).

Los radicales libres son producidos normalmente en el organismo para llevar a cabo funciones específicas. Entre ellos podríamos citar al superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que son ROS esenciales en la fisiología normal, pero que también intervienen en procesos de envejecimiento y en la degeneración celular en distintas enfermedades. Estos agentes, en conjunto, pueden producir otras especies altamente reactivas como son el oxígeno singulete, radicales hidroxilos y peroxinitritos (entre otros) que pueden dañar proteínas, lípidos y ADN.

El  $O_2^{\cdot-}$  es generado en la cadena de transporte de electrones de la membrana mitocondrial y también como producto de muchas enzimas que actúan como oxidasas. Los efectos del  $O_2^{\cdot-}$  incluyen regulación de la función vascular, división celular (Burdon, 1995; Uemura y *col.*, 2001), inflamación (Khodr y Khalil, 2001), apoptosis (Lee y *col.*, 2001) y actividad antimicrobiana en los neutrófilos (Whitacre y Cathcart, 1992). El exceso de  $O_2^{\cdot-}$  es removido por la actividad de la familia de las enzimas superóxido dismutasa que convierten el  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$  y oxígeno.

El  $H_2O_2$  es producido por acción de la enzima superóxido dismutasa o por otras reacciones enzimáticas. El  $H_2O_2$  puede difundir a través de la membrana plasmática y el citosol (Antunes y Cadenas, 2000). Esta especie es un mediador de la defensa inmune frente a la infección bacteriana. Debido a que el  $H_2O_2$  es un poderoso agente oxidante, las células expresan abundante catalasa, glutatión y tioredoxina que convierten al  $H_2O_2$  en agua. Cuando el  $H_2O_2$  reacciona con  $Fe^{2+}$  libre, el ion se oxida y se producen radicales hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ). Estos pueden afectar la vasodilatación, generando injuria endotelial e hipoxia tisular (Pieper y *col.*, 1993).

Por otro lado, el  $O_2^{\cdot-}$  puede reaccionar con el óxido nítrico (NO) generando peroxinitritos ( $ONOO^{\cdot-}$ ). Estos últimos se pueden protonar, generando ácido peroxinitroso ( $ONNOH$ ) el cual es muy tóxico (Forman, 2009).

Los lípidos presentes en la membrana plasmática, mitocondrias y membranas del retículo plasmático son blancos del ataque y peroxidación por parte de las ROS.

Los productos finales de la peroxidación lipídica, conocidos como peróxidos de lípidos, pueden ser tóxicos para las células y deben ser removidos por la enzima glutatión peroxidasa. De manera similar, las proteínas y los ácidos nucleicos pueden sufrir la peroxidación. Aunque estos productos finales no son directamente tóxicos para la célula, la acumulación de proteínas inactivas puede interferir con la habilidad de la célula para reciclarlos y es conocido que el daño del ADN puede activar mecanismos de apoptosis. Sumado a esto, la acumulación de proteínas modificadas puede disminuir la funcionalidad celular, generando una pérdida en la actividad normal.

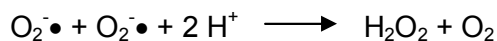
#### 1.4.2 Mecanismos antioxidantes

Los mecanismos que utiliza la célula para protegerse del estrés oxidativo son los antioxidantes, entre los que podemos distinguir dos tipos distintos. El primero presenta la capacidad de donar al menos un átomo de hidrógeno a un radical libre, dando como resultado la terminación de la reacción en cadena de radicales libres. El otro tipo de antioxidante es aquel capaz de prevenir la iniciación de la reacción en cadena de radicales libres más que terminarla (Stocks y *col.*, 1974). Las células deben mantener los niveles de antioxidantes, generalmente definidos como potencial antioxidante, a través de la ingesta en la dieta o por la síntesis *de novo*. La producción excesiva de radicales libres puede depletar a la célula de los antioxidantes, resultando en una condición de estrés oxidativo.

Dentro de las principales defensas antioxidantes presentes en las células del organismo encontramos a las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) y al tiol glutatión, el reductor más abundante en todas las células.

##### 1.4.2.1 Superóxido dismutasa

La enzima SOD elimina el  $O_2^{\cdot-}$  formado a través de la dismutación del mismo formando  $H_2O_2$  y  $O_2$ . La reacción puede verse en la siguiente ecuación (McCord y Fridovich, 1969):



Se conocen tres isoformas distintas en mamíferos: la cobre-zinc superóxido dismutasa (Cu/ZnSOD), la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) y la superóxido dismutasa extracelular (ECSOD). Cada una de ellas está codificada por genes distintos y tienen diferentes localizaciones: Cu/ZnSOD se la encuentra en citoplasma, núcleo y membrana mitocondrial; la MnSOD en matriz mitocondrial y la

ECSOD en membrana plasmática y matriz extracelular (Miao y Clair, 2009). En la tabla 1 se encuentra esta información. Esta compartimentación junto con los numerosos puntos de regulación de la expresión y actividad de las distintas isoformas de SOD contribuyen a la localización y a la regulación de los niveles de ROS.

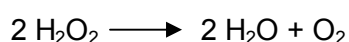
**Tabla 1: Características de las tres isoformas presentes en mamíferos.**

Isoforma	Localización	PM (KDa)	Subunidades	Ion metálico
Cu/ZnSOD	Citoplasma, núcleo y membrana mitocondrial	88	Homodímero	<b>Cu<sup>2+</sup></b> (catalíticamente activo) <b>Zn<sup>2+</sup></b> (mantiene la estabilidad de la enzima)
MnSOD	Matriz mitocondrial	32	Homotetrámero	<b>Mn<sup>2+</sup></b> (catalíticamente activo)
ECSOD	Membrana plasmática y matriz extracelular	135	Glicoproteína homotetrámerico	<b>Cu<sup>2+</sup></b> (catalíticamente activo) <b>Zn<sup>2+</sup></b> (mantiene la estabilidad de la enzima)

Adaptado de Miao y Clair, 2009.

#### 1.4.2.2 Catalasa

La CAT es una hemo-proteína tetramérica ubicada principalmente en los peroxisomas. Su función es detoxificar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, según la siguiente reacción:



Es una enzima ubicua, muy resistente a la proteólisis y desnaturalización. Su expresión está modulada por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y especies reactivas del oxígeno (Chelikani y col., 2004).

#### 1.4.2.3 Glutación

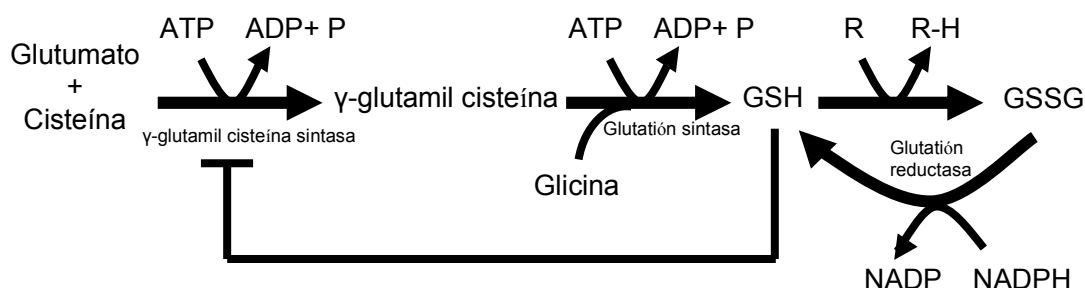
El glutación (L-glutamyl-L-cysteinyl-glicina) es la forma reducida del tripéptido formado por glicina, cisteína y glutamato y es el tiol más abundante en las células eucariotas. El glutación se encuentra en concentraciones 1-10 mM (dependiendo del tipo celular). Existe en la forma reducida (GSH) y en la forma oxidada (GSSG) y esta última es menos del 5 % del contenido total de glutación debido a que la enzima glutación reductasa, que restituye el GSH, es constitutivamente activa e inducible



frente al estrés oxidativo (Akerboom y *col.*, 1982; Franco y Cidlowski, 2009). Aproximadamente el 90 % del glutatión celular se encuentra en el citosol, el 10 % en las mitocondrias y un bajo porcentaje en el retículo endoplasmático (Hwang y *col.*, 1992; Meredith y Reed, 1982).

El glutatión actúa como agente reductor y como el mayor antioxidante presente en las células a través del mantenimiento del estado redox. El GSH, además, está envuelto en numerosas reacciones fisiológicas como ser: señales celulares, metabolismo de xenobióticos, reacciones de intercambio de disulfuros y como un importante reservorio de cisteína. En particular, presenta una gran importancia en el sistema inmune. Adecuadas concentraciones de glutatión son necesarias para la activación linfocitaria (Hamilos y Wedner, 1985; Suthanthiran y *col.*, 1990), activación de células NK (Yamauchi y Bloom, 1993) y citotoxicidad mediada por linfocitos (Driige y *col.*, 1986), entre otros.

Los niveles de GSH son regulados por dos mecanismos principales: la síntesis y la exportación fuera de la célula. Estos dos procesos están influenciados por diferentes agentes y dependen del ciclo celular (Ballatori y *col.*, 2009). Por ejemplo, existen numerosos reportes que indican que uno de los eventos tempranos de la apoptosis es la depleción de GSH del citosol (Franco y *col.*, 2007; Franco y Cidlowski, 2009). Por otro lado, estos procesos están regulados por numerosas enzimas y la síntesis, en particular, requiere de la disponibilidad de cisteína (Diaz Vivancos, 2010; Shelly, 2009;). En la figura 1, encontramos un resumen de algunas de las enzimas y procesos que regulan su disponibilidad.



**Figura 1: Síntesis de glutatión y equilibrio GSH/GSSG**

El glutatión se sintetiza a partir de glutamato, cisteína y glicina. El GSH formado por retroalimentación negativa, inhibe su síntesis. El GSH actúa como agente reductor que reduce a los distintos compuestos, y pasa a la forma oxidada: GSSG. Este último es reducido (volviendo a GSH) por la enzima glutatión reductasa. Adaptado de Diaz Vivancos, 2010.

## 1.5 Infecciones y diabetes

En 1938, Marble y *col.* reportaron que los pacientes con diabetes presentaban una menor resistencia a las infecciones que los individuos no diabéticos. Diferentes

evidencias llevaron a considerar a la patología diabética como un factor que predispone a la presencia de infecciones moderadas y/o severas que ponen en riesgo la vida de estos pacientes (Boyko y Lipsky, 1995; Joshi y col., 1999; Wheat, 1980). Por otro lado, los individuos con diabetes presentan una incidencia de infecciones similar a los demás pacientes, pero difieren en el alto porcentaje de desenlaces fatales ocasionados por estas infecciones severas (Bertoni y col., 2001; Gu y col., 1998). En este sentido se han descrito infecciones respiratorias, renales, de la piel, entre otras. Asimismo, el padecer diabetes presenta un correlato positivo con el riesgo de sufrir la enfermedad periodontal: una infección bacteriana que resulta en la inflamación y la destrucción del periodonto (tejido de sostén de los dientes) con la consiguiente pérdida de las piezas dentales (Mealey, 2000).

Entre las infecciones del tracto respiratorio halladas con mayor frecuencia en pacientes diabéticos se encuentran las neumonías provocadas por dos tipos de microorganismos: *Staphylococcus aureus* (gram negativos) y *Mycobacterium pneumoniae* (Koziel y Koziel, 1995). Existen infecciones provocadas por otros microorganismos (como por ejemplo *Streptococcus pneumoniae*) que están asociadas con un alto índice de mortalidad en pacientes diabéticos (Koziel y Koziel, 1995).

En cuanto a las infecciones urinarias, se demostró una incidencia mucho mayor de bacteriuria en mujeres diabéticas (Fünfstück y col., 2012; Hansen, 1964; Kass, 1957; Vejlsgaard, 1966). Esta patología también predispondría a sufrir infecciones severas del tracto urinario superior, con las serias complicaciones que esto ocasiona (Wheat, 1980). También pueden ocurrir los abscesos perinefróticos causados por el ascenso de las infecciones ocasionadas por *Escherichia coli* o distintas especies de *Proteus sp.* Asimismo, la diabetes también predispone a sufrir infecciones del tracto urinario causadas por hongos, en especial por la especie *Candida albicans* (Joshi y col., 1999).

Asimismo, los pacientes con diabetes presentan frecuentemente infecciones en los pies (Jiang y col., 2012; Joshi y col., 1999). Las complicaciones que pueden ocurrir incluyen la osteomielitis, la amputación de miembro y hasta la muerte del paciente. En este punto se suma la presencia de alteraciones micro y macro vasculares en la evolución y agravamiento del cuadro.

Entre los individuos con diabetes también encontramos una mayor incidencia de otitis externa invasiva (Joshi y col., 1999; Slattery y Brackman, 1996). En la mayoría de los casos, el organismo que la causa es *Pseudomonas aeruginosa* y puede conducir a la pérdida de la audición. Dentro de este grupo, también encontramos a la mucormicosis, una infección provocada por hongos, principalmente del tipo *Zigomycete* orden mucorales, donde el 50% de los casos ocurre en pacientes

diabéticos, dado que el factor de riesgo más importante es la cetoacidosis (Joshi y *col.*, 1999).

Por otro lado, recientemente se han registrado trabajos clínicos en los cuales se describe la existencia de una asociación entre la hiperglucemia no controlada y un alto riesgo a contraer infecciones hospitalarias, en pacientes gravemente enfermos, incluso en aquellos sin antecedentes de diabetes (Butler y *col.*, 2005; Christiansen y *col.*, 2004; DiNardo y *col.*, 2004; Furnary y *col.*, 1999; Latham y *col.*, 2001).

Con relación a la infección con el virus de influenza H1N1, se ha observado una alta incidencia en los pacientes diabéticos (Millar y *col.*, 2011). Además el número de hospitalizaciones y de desenlaces fatales ha sido mayor en este grupo que en el resto de la población normal (Moghadami y *col.*, 2012).

Aunque está clínicamente aceptado que la diabetes predispone a sufrir infecciones severas y los estudios sugieren una asociación entre la diabetes y las infecciones, no está estudiada la presencia de un estado de inmunosupresión en el estado diabético (Peleg y *col.*, 2007). Asimismo, hay individuos con diabetes que presentan una evolución normal frente a un cuadro infeccioso. Es así que surge el interrogante sobre qué mecanismos llevarían a que un individuo diabético se comporte como inmunodeprimido frente a otro que, en la misma situación, no lo manifieste. Dentro de los factores que regularían esta susceptibilidad individual está el condicionamiento genético del individuo.

## 2. Estrés

Todo organismo vivo lucha por mantener un equilibrio dinámico conocido como homeostasis, la cual es diariamente desafiada por eventos internos o externos, ya sean físicos o psicológicos (estresores). De esta manera, se define al estrés como el estado donde se encuentra amenazada la homeostasis, y que es reestablecida mediante un proceso complejo.

Hans Selye fue el primero en introducir el concepto de “Síndrome de adaptación general” en 1936. A través de este proceso el cuerpo confronta cualquier agente nocivo pasando por tres etapas. La primera etapa es la señal de alarma, donde la médula adrenal libera adrenalina y la corteza adrenal libera glucocorticoides. Tanto la adrenalina como los glucocorticoides ayudan a restituir la homeostasis. Esto lleva a una segunda etapa, la etapa de resistencia donde la defensa y adaptación son constantes y óptimas. Si el estresor persiste, sigue la etapa de agotamiento donde la adaptación cesa y las consecuencias pueden ser enfermedad y muerte (McEwen, 2004).

En la actualidad se sabe que no todos los estresores evocan el mismo tipo de respuesta y ésta, además, no es igual en todos los individuos. Principalmente, hubo una reinterpretación de la tercera etapa debido a los nuevos conocimientos sobre los mediadores del estrés, los cuales pueden ser protectores o dañinos dependiendo del momento en que fueron secretados. De esta manera, no es la etapa de agotamiento la que podría causar enfermedades sino los mediadores del estrés por sí mismos. Es así que se adoptó una nueva terminología para asociar los efectos protectores y dañinos de la respuesta biológica al estrés llamados *alostasis* y *carga alostática* (McEwen, 2004; McEwen y Gianaros, 2011).

La alostasis es el proceso que mantiene la estabilidad del organismo en ambientes en constante cambio y es indispensable para la supervivencia. Algunos de los mediadores primarios de la alostasis son las hormonas del eje hipotálamo-hipofisis-adrenal (HPA), las catecolaminas, las citoquinas, los neurotransmisores, entre otras. Cuando la alostasis es ineficaz o inadecuada o el agente que la motiva se prolonga en el tiempo o en la frecuencia de aparición, no se alcanza la adaptación y se produce una activación desproporcionada o ineficaz que da lugar a lo que se conoce como carga alostática. Ésta traduce el desgaste o agotamiento de los sistemas alostáticos y a largo plazo es causa de patología tanto orgánica como cognitiva (McEwen y Gianaros, 2011).

## 2.1 Mediadores del estrés

Los clásicos mediadores del estrés son los glucocorticoides y las catecolaminas. El hipotálamo recibe señales del medio interno y externo a través de las conexiones que recibe del nervio vago, retina, sistema límbico y olfatorio. Frente a una situación de estrés se activa el eje HPA, donde en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) existen neuronas que secretan factor liberador de corticotrofina (CRH) y vasopresina (AVP) al sistema porta-hipotalamo-hipofisario. En la hipófisis anterior se encuentran las células corticotrofas, las cuales son estimuladas por la CRH, secretando la hormona adrenocorticotrofina (ACTH) a la circulación. La ACTH estimula la secreción de glucocorticoides (GC, cortisol en humanos y corticosterona en roedores) en la corteza adrenal (figura 2).

Los principales efectos de los GC son: aumento de glucosa en sangre, inhibición de las hormonas reproductivas y de crecimiento, supresión de la actividad digestiva, aumento de captación proteica por los músculos, disminución de la respuesta inmune y cambios conductuales. Los niveles de GC se regulan por retroalimentación negativa sobre el hipotálamo y la hipófisis, inhibiendo la producción y secreción de CRH y ACTH.

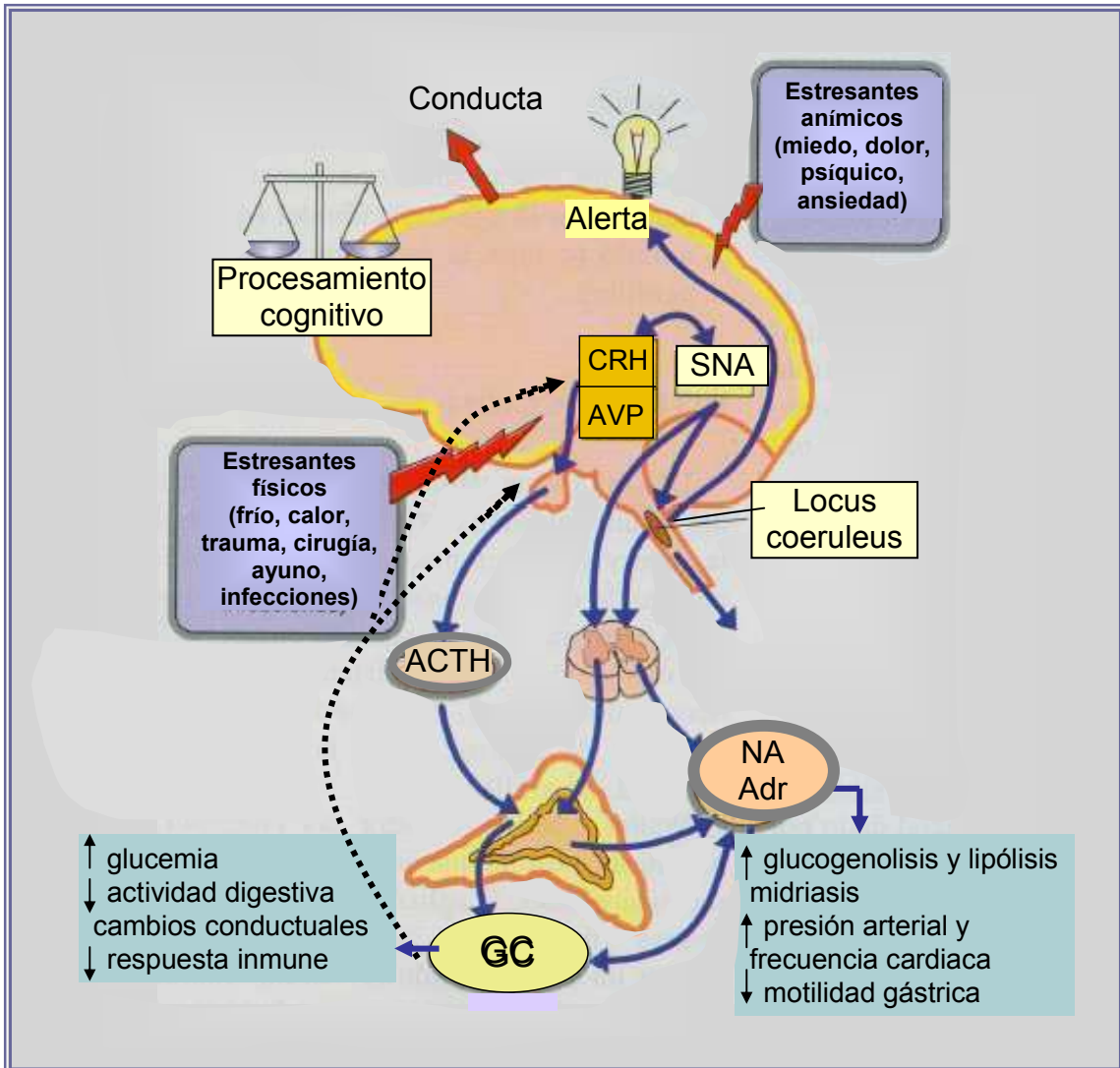
Por otro lado, el PVN tiene proyecciones nerviosas hacia los núcleos preganglionares del sistema nervioso autónomo (SNA). La activación del SNA produce la liberación de adrenalina y noradrenalina por parte de la médula adrenal y por inervación directa del sistema sobre los distintos órganos. La activación del sistema simpático en respuesta al estrés está involucrada en la respuesta de “flight or fight” (huida o pelea) provocando los siguientes efectos: aumento de la glucogenólisis y de la lipólisis (aumentando la glucosa disponible), aumento de la transpiración, midriasis (aumento del diámetro de la pupila), aumento de la presión arterial, aumento de la frecuencia cardíaca, disminución de la motilidad gástrica, disminución del flujo urinario, contracción de esfínteres, etc.

El eje HPA no es el único involucrado en la respuesta a estrés. El hipocampo y la amígdala también cumplen un rol fundamental en la regulación de esta respuesta. Estas dos áreas son importantes productoras de CRH y a través de éste regulan la producción y secreción de CRH hipotalámica. La CRH también activa a neuronas del locus coeruleus (LC) que producen noradrenalina (NA), regulando la respuesta simpática. A su vez, esta NA tendría una regulación positiva sobre el PVN, estimulando la producción de CRH y AVP (Itoi y *col.*, 1999; Itoi y Sugimoto, 2010).

Asimismo, los GC generan efectos en todas las estructuras descritas anteriormente. Los GC pueden unirse a dos tipos de receptores: receptores para

glucocorticoides (R-GC), con menor afinidad y receptores para mineralocorticoides (R-MC), con mayor afinidad (Oitzl y *col.*, 2010; Reul y de Kloet, 1985). En una primera etapa estaría involucrada la unión de los GC a los R-MC, que estarían implicados en el desarrollo de la respuesta al estrés (Gesing y *col.*, 2001). En una segunda etapa, de finalización (conocida como *coping*), en donde el sistema es preparado para poder responder frente a un nuevo estímulo, participarían los R-GC. (Arriza y *col.*, 1988; de Kloet y *col.*, 2005; Groeneweg y *col.*, 2011; Joëls y *col.*, 2008).

Además, es importante mencionar que la respuesta al estrés dependerá del individuo, de la percepción personal del estresor, del condicionamiento genético y de las experiencias previas, entre otros. De esta manera hay individuos que pueden presentar una respuesta más activa, donde va a haber una predominancia simpática y otros individuos con una respuesta más pasiva, donde en la respuesta habrá un predominio cortico-suprarrenal.



**Figura 2: Esquema de respuesta a estrés**

El hipotálamo secreta CRH y AVP, los que estimulan la secreción de ACTH en la hipófisis. La ACTH estimula la producción de GC por la corteza adrenal. Por otro lado, también se activa el sistema nervioso simpático, esto provoca la liberación de adrenalina y noradrenalina por la médula adrenal y por innervación directa. Líneas llenas: estimulantes. Líneas punteadas: inhibitorias.

### 2.3 Efecto de los mediadores del estrés sobre el sistema inmune

Las células del sistema inmune poseen receptores de membrana para los mediadores del estrés. Estos receptores son funcionales y su activación induce cambios en las funciones inmunes como la proliferación celular y las respuestas inmunes específicas.

La NA liberada por las terminales nerviosas ejerce su función a través de receptores adrenérgicos presentes tanto en linfocitos T como en linfocitos B. El principal subtipo de receptor adrenérgico descrito en los linfocitos es el  $\beta 2$  (Bylund y col., 1994; Genaro y col., 1993).

La principal vía hormonal por la cual el sistema nervioso central regula al sistema inmune es el eje HPA a través de las hormonas de la respuesta al estrés. A su vez, las células del sistema inmune producen citoquinas que pueden alterar la función del eje HPA.

El principal receptor para GC en células inmunes, como macrófagos y linfocitos T es el R-GC, por lo que la influencia de estas hormonas sobre la función inmune es mediada a través de este receptor (Marchetti y *col.*, 2001). Los GC pueden regular al sistema inmune de muchas formas. Por ejemplo, pueden modular la expresión de citoquinas, de moléculas de adhesión, de quimioattractantes y otros factores inflamatorios (Adcock y Ito, 2000; Atsuta y *col.*, 1999; Nakagawa y *col.*, 1999). También pueden bloquear la maduración linfocitaria (Wisniewska y *col.*, 2004) y en algunas especies expulsan a los linfocitos de la circulación (Milad y *col.*, 1994) y en ocasiones los destruyen (Bishop y *col.*, 2000).

Durante muchos años se pensó que los GC eran inmunosupresores, sin embargo los estudios que condujeron a estas conclusiones se realizaron utilizando dosis farmacológicas de éstos y moléculas sintéticas (Boumpas y *col.*, 1993). Recientemente se postuló que a concentraciones fisiológicas, los GC serían inmunomoduladores, ya que causan una supresión selectiva de la inmunidad celular Th1 y un cambio hacia la inmunidad celular Th2, más que una inmunosupresión generalizada (Elenkov, 2004). De hecho, los GC a nivel fisiológico estimularían varios aspectos de la función inmune, como ser procesos relacionados a la función de células T (Wilckens y De Rijk, 1997). También estimulan agudamente las reacciones de hipersensibilidad de tipo retardada, mientras que a concentraciones farmacológicas la suprimen (Dhabhar y McEwen, 1999).

### **2.3 Interacción entre estrés y diabetes**

En las últimas décadas el estrés se ha incorporado como un factor importante en la vida diaria. Es así que existen evidencias clínicas que avalan la participación del estrés en el desarrollo de diversas patologías psiquiátricas, alteración del sistema neuroendocrino, del sistema inmune e incluso cáncer (Reiche y *col.*, 2004). En particular, el estrés ha sido asociado con la instauración y la evolución de la patología diabética en humanos. Asimismo, el estado diabético ocasiona un estado de estrés relacionado con el tratamiento con insulina, la regulación de la glucemia, la ingesta alimentaria y el ejercicio físico. La bibliografía documenta la existencia de diversos estudios clínicos en donde existe un correlato positivo entre el estrés, la depresión y el tratamiento y control de la glucemia en pacientes tanto con diabetes mellitus tipo I, como tipo II (Stenstrom y *col.*, 2003; Surwit y *col.*, 2002).



Actualmente, a pesar de las evidencias que apoyan un desbalance inmunológico en el estado de diabetes y en el estrés, la asociación entre síntomas, diagnóstico clínico, evolución y desorden inmunológico no se conoce. Aún más, cabe preguntarse qué mecanismos llevarían a que un individuo expuesto a una situación de estrés crónico desarrolle o agudice los síntomas del estado diabético y otro frente a la misma situación no lo manifieste. Dentro de los factores que regularían esa susceptibilidad individual podría ocupar un lugar destacable el tipo de desregulación que sufre el sistema inmune frente al estrés crónico y el condicionamiento genético innato del individuo.

### 3. Sistema inmune

La inmunología es la ciencia que estudia los procesos moleculares y celulares implicados en la defensa de la integridad biológica del organismo a través de la identificación de las sustancias propias, detección de las sustancias extrañas y su destrucción (Roitt y Delves, 2003). Para que estos fenómenos de defensa se lleven a cabo, los organismos disponen de un conjunto de elementos especiales que constituyen el sistema inmune. La capacidad de defensa se adquiere antes de nacer, pero madura y consolida en los primeros años de la vida fuera del seno materno, ofreciendo respuestas más específicas para cada tipo de infección.

El sistema inmune está compuesto por una amplia y compleja red de células y moléculas que primero deben distinguir lo propio de lo extraño para luego destruir lo no propio. Esto último se refiere a todos los componentes ajenos al organismo, por ejemplo: microorganismos patógenos (parásitos, hongos, bacterias, virus), células y órganos provenientes de otros animales (transplantes). En algunas ocasiones ciertos alimentos y fármacos pueden estimular la generación de reacciones inmunitarias.

#### 3.1 Clasificación de la respuesta inmune

La respuesta inmune puede clasificarse en dos tipos: respuesta inmune innata o natural y respuesta inmune adquirida o específica (Abbas y Lichtman, 2003).

**La respuesta inmune innata** constituye la primera línea de defensa del organismo. En general responde ante epitopes conservados entre los agentes patógenos, es inmediata y no requiere sensibilización previa. A su vez no genera memoria y es importante para inducir la respuesta específica. Es mediada por:

1. Barreras físicas y químicas: los epitelios, las mucosas y las sustancias antimicrobianas producidas por ellos.
2. Componentes humorales: el sistema complemento (sistema lítico e inflamatorio), proteínas de fase aguda (proteínas de la sangre que activan al sistema complemento), interferón  $\alpha$  y  $\beta$  (producidos por macrófagos y fibroblastos, son antivirales) y sustancias inflamatorias.
3. Componentes celulares: células fagocíticas (macrófagos y neutrófilos) y las células NK (natural killer), un tipo de linfocito de gran tamaño que no tiene un receptor específico para antígenos. Reconocen y destruyen células tumorales o infectadas por virus a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), de forma independiente de anticuerpos y de otros tipos celulares.

**La respuesta inmune adaptativa** es exclusiva de los vertebrados y específica para cada antígeno. Es una respuesta más lenta que la innata, genera memoria específica que posibilita una segunda respuesta más efectiva (rápida y potente) ante un nuevo encuentro con el mismo patógeno. Esta respuesta puede dividirse en dos componentes: la **respuesta humoral**, cuyos efectores son los anticuerpos producidos por los linfocitos B y la **respuesta celular** desarrollada por los linfocitos T.

### 3.1.1 *Respuesta inmune adaptativa*

#### 3.1.1.1 Anticuerpos

Los anticuerpos o inmunoglobulinas están compuestos por dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas livianas idénticas entre sí, que se mantienen unidas por puentes disulfuro intercatenarios.

La secuencia N terminal de las cadenas livianas y pesadas muestra una gran variabilidad en cuanto a la secuencia, mientras que las secuencias restantes son constantes. Dentro de la zona variable, podemos encontrar una zona hipervariable, que es la que interviene en la unión con el antígeno.

Existen 5 clases o isotipos de anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig): IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Estos, a su vez, pueden subdividirse en subclases: 2 para la IgA (IgA1 e IgA2) y 4 para la IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) (Abbas y Lichtman, 2003; Roitt y Delves, 2003).

Las moléculas de **IgM** son polímeros pentaméricos, aunque una fracción menor es hexamérica. Tienden a presentar baja afinidad relativa por los antígenos, pero debido a la valencia elevada, los mismos se unen con gran avidéz. Por esta razón las inmunoglobulinas del isotipo IgM son agentes aglutinantes y citolíticos muy eficientes. Se producen en la respuesta inmune primaria (primera exposición al antígeno). Esta inmunoglobulina, al igual que la IgG, puede activar al sistema del complemento. En la membrana celular de los linfocitos B, se encuentra la forma monomérica anclada a membrana como el principal receptor utilizado para reconocer al antígeno.

La **IgG** es la inmunoglobulina de mayor abundancia en circulación y en la mayoría de los tejidos. Esta molécula presenta una elevada afinidad por la unión con el antígeno. Se sintetiza principalmente durante la respuesta inmune secundaria (luego de una segunda exposición al antígeno). Al unirse a la superficie del agente patógeno puede activar al complemento, facilitar la fagocitosis del microorganismo por parte de los macrófagos y activar sistemas de citotoxicidad celular. Puede atravesar la placenta y el intestino del recién nacido.

La **IgA** aparece en secreciones mucosas como saliva, lágrimas, líquido mucoso, transpiración y calostro, entre otras. Su principal función es defender contra el ataque de microorganismos a las superficies corporales externas expuestas.

La **IgD** se encuentra principalmente sobre en el linfocito B y actúa, junto con la IgM, como receptor del antígeno sobre células B no estimuladas.

La **IgE** se une a los mastocitos y el contacto con el antígeno provoca la degranulación del mastocito, liberando mediadores inflamatorios que reclutan agentes antimicrobianos. Este anticuerpo también es importante contra ciertas infecciones parasitarias y es responsable de síntomas de alergias.

### 3.1.1.2 Citoquinas

Las citoquinas son mensajeros de bajo peso molecular secretados por una célula con el fin de generar una respuesta sobre sí misma o sobre otras células (son mensajeros autocrinos, paracrinos o endocrinos). Actúan a través de la unión a receptores específicos. Las citoquinas son producidas por casi todas las células y tienen una amplia variedad de funciones. El efecto biológico depende de las citoquinas y las células involucradas, pero por lo general estas moléculas afectan a la activación de células, la división y la apoptosis. Algunas citoquinas son consideradas proinflamatorias, mientras que otras antiinflamatorias. A su vez, existen citoquinas que actúan como agentes quimioattractantes (quimioquinas), que causan la diferenciación y proliferación de células madre (factores estimulantes de colonia), entre otras.

### 3.1.1.3 Células involucradas en la respuesta adaptativa

Las principales células involucradas en este tipo de respuesta son: linfocitos B, linfocitos T y las células presentadoras de antígenos profesionales (Abbas y Lichtman, 2003; Fainboim y Geffner, 2005; Roitt y Delves, 2003).

Los **linfocitos B** son las células encargadas de la producción de anticuerpos. Se originan en la médula ósea y son instruidos allí mismo. Luego migran a los órganos linfoides secundarios (los principales son el bazo y los ganglios linfáticos). Expresan como receptor para el antígeno anticuerpos anclados a membrana (IgM e IgD).

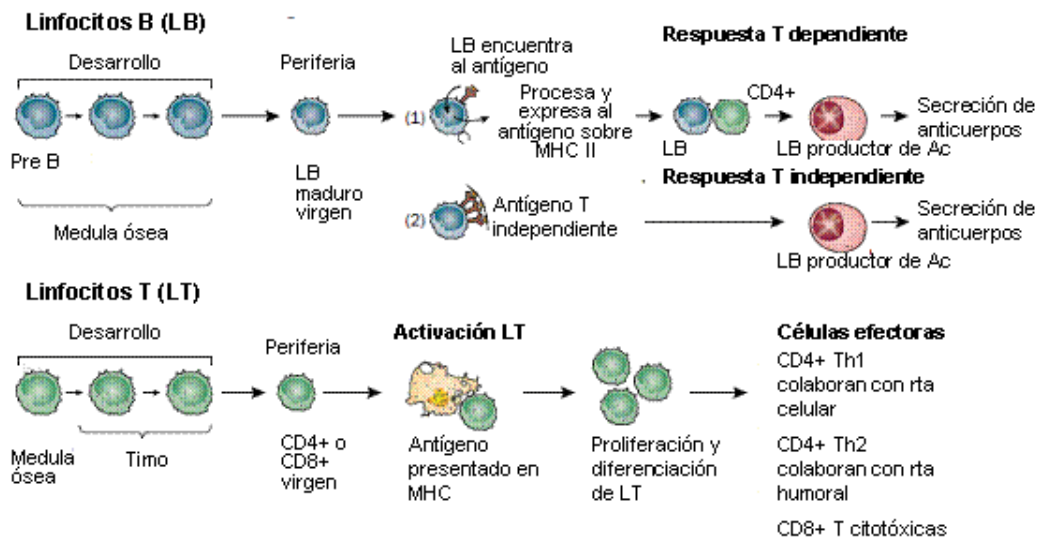
El precursor de los **linfocitos T** proviene de la médula ósea y migra hacia el timo donde se diferencia. Expresan como receptor para el antígeno TCR (*T cell receptor*). Este receptor, al igual que las inmunoglobulinas, tiene zonas de hipervariabilidad que le permiten reconocer un péptido pequeño presentado junto con una molécula del MHC. Los linfocitos T se subdividen en poblaciones funcionalmente distintas. Los **linfocitos T citotóxicos (Tc)** expresan la molécula de superficie CD8

(CD8+), mientras que los **linfocitos T helper o colaboradores (Th)** son positivos para el marcador celular CD4 (CD4+). Los linfocitos CD8+ eliminan las células infectadas. El receptor que expresan es del tipo TCR1, que reconoce al péptido asociado a una molécula del MHC de clase I. Los linfocitos CD4+ expresan como receptor al TCR2, que reconoce al péptido asociado a una molécula del MHC de clase II. Los linfocitos T CD4+ se subdividen en T colaborador 1 (Th1) o en T colaborador 2 (Th2) dependiendo del patrón de citoquinas que secreten. Los linfocitos Th1 liberan interferón  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) e interleuquina 2 (IL-2), que colaboraran en la activación de linfocitos T citotóxicos. Los linfocitos Th2 liberan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, entre otras, que ayudan a la activación de linfocitos B. La generación de una respuesta tipo Th1 o Th2 es mutuamente excluyente: el IFN  $\gamma$  secretado por células Th1 inhibe la proliferación de células Th2, mientras que la IL-10 e IL-4 secretadas por las células Th2 inhibe la secreción de IFN  $\gamma$  e IL-2 por parte de las Th1. El predominio de una u otra de las dos subpoblaciones de linfocitos colaboradores depende a su vez del microambiente de citoquinas en que ocurre la activación y maduración inicial a partir de linfocitos en reposo.

Las moléculas de MHC de clase I se encuentran en la superficie de cualquier célula nucleada normal del organismo. Las moléculas de MHC de tipo II están únicamente en las células presentadoras de antígenos profesionales (CPA profesionales). La función de estas últimas es presentar el antígeno a los linfocitos CD4+ y colaborar en su activación. Las principales CPA profesionales son los macrófagos, las células dendríticas y los linfocitos B (figura 3).

Los **macrófagos** son células con alta capacidad fagocítica. Los antígenos son degradados por completo o en parte, y alguno de ellos puede aparecer procesado en la superficie del macrófago asociado a una molécula de MHC de clase II. Sin embargo, para la activación de los linfocitos T CD4+ vírgenes (que nunca tuvieron contacto con el antígeno) esta presentación parece no ser suficiente, siendo necesaria la presencia de **células dendríticas**. Estas células provienen de la médula ósea. Las células dendríticas inmaduras de distintos tejidos actúan como agentes de muestreo del antígeno; muestran una gran actividad de endocitosis aunque sólo son moderadamente fagocíticas. Los receptores involucrados en la captura de los antígenos son el receptor de manosa (permite reconocer patrones moleculares asociados a patógenos, patrones comunes a todos los patógenos) y los receptores para inmunoglobulinas. Poseen baja cantidad de MHC de clase II en la superficie celular. Una vez que las células dendríticas se han diferenciado completamente, disminuye la capacidad endocítica y aumenta significativamente la cantidad de MHC de clase II y otras moléculas marcadoras en la superficie celular, como por ejemplo CD1 (molécula similar al MHC de clase I), B7 y CD40 (moléculas coestimulantes).

También poseen receptores de quimioquinas. El rol de estas sustancias es la atracción de las células dendríticas hacia las áreas de linfocitos T presentes en los ganglios linfáticos y en el bazo.



**Figura 3: Rol de linfocitos T y B en la respuesta inmune**

Los linfocitos T y B se originan en la médula ósea. Los linfocitos B maduros activados son productores de anticuerpos. Los linfocitos T activados se diferencian en células CD4+ Th1, Th2 y CD8+. Adaptado de Parkin and Cohen, 2001.

### 3.1.1.4 Tejido linfoide secundario

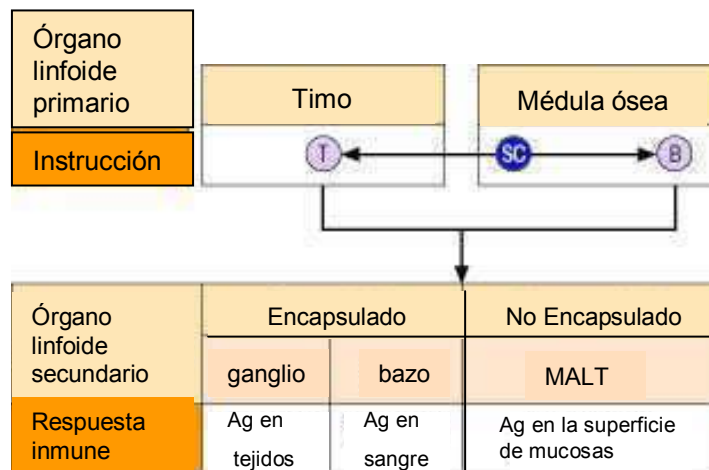
Como tejido linfoide secundario se describen: ganglios linfáticos encapsulados, bazo y tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) (figura 4) (Abbas y Lichtman, 2003; Roitt y Delves, 2003).

Los **ganglios linfáticos** contienen una malla de células reticulares organizadas en senos. Actúan como un filtro para la linfa, la cual puede transportar antígenos que entran en contacto con los macrófagos presentes en el ganglio. Presenta una mayor cantidad de linfocitos T que de linfocitos B (aproximadamente un 80% linfocitos T, frente a un 20% de linfocitos B) y cada uno de estos se encuentran localizados en distintas áreas. El área de linfocitos B está ubicada en la zona más externa del ganglio, en agregaciones foliculares. Dentro de estos folículos y dependiendo del grado de maduración, podemos encontrar, además de linfocitos B, linfocitos T (en menor cantidad), macrófagos y células dendríticas. El área de linfocitos T se encuentra en una zona más interna.

El **bazo** es el órgano encargado de filtrar la sangre, eliminar los glóbulos rojos y linfocitos en desuso y responder a los antígenos que podría transportar la sangre.

Presenta una mayor cantidad de linfocitos B. Los linfocitos T y B también se encuentran separados en distintas áreas.

El **MALT** se encuentra distribuido en el tracto respiratorio, gastrointestinal y genitourinario. Son acumulaciones subepiteliales de tejido linfoide no limitadas. Pueden aparecer como colecciones difusas de linfocitos, células plasmáticas y fagocitos o como un tejido más organizado en folículos bien formados.



**Figura 4: Organización funcional del tejido linfoide.**

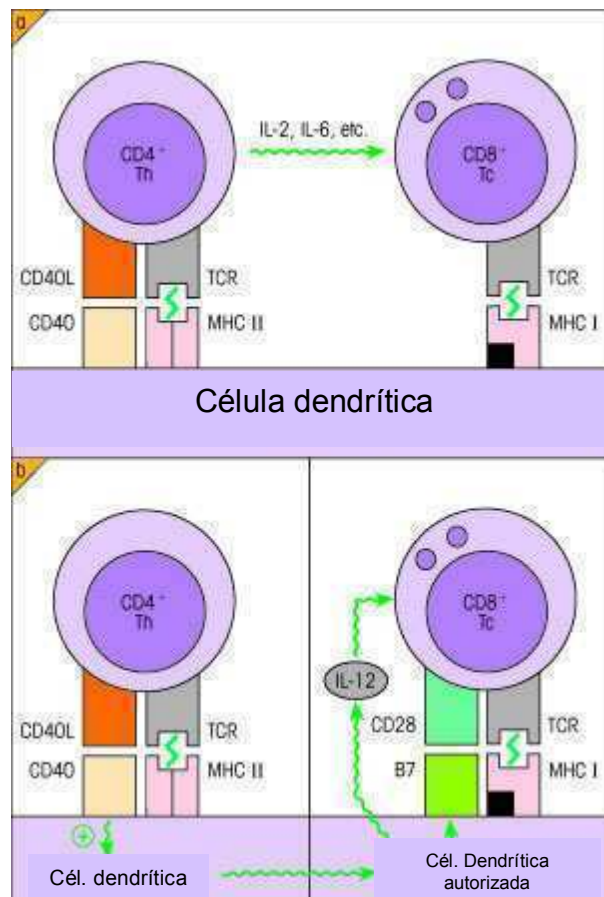
SC: células madre o Stem cells. Ag: antígeno. Las células madre que se originan en la médula ósea se diferencian en linfocitos T y B inmunocompetentes en los órganos linfoides primarios. Luego migran a los órganos linfoides secundarios, donde se organizan las respuestas inmunes. Adaptado de Roitt y Delves, 2003.

### 3.1.1.5 Activación de linfocitos

Para la activación de los linfocitos T no alcanza con la unión del TCR con el antígeno asociado a la molécula de MHC dado que la afinidad de esta interacción es relativamente baja. Para la activación del linfocito T colaborador, CD4+, son necesarias dos señales: la unión TCR al complejo antígeno-MHC clase II y la unión del marcador CD28 al B7 (presente en las células dendríticas), la señal coestimuladora más potente. Asimismo, se produce la unión de otras moléculas de adhesión (como VACM-1, ICAM-1 y LFA-3), que no son coestimuladoras por sí mismas, sino que aumentan el efecto de las señales principales. Una vez que se produjeron estas uniones, comienza una cascada de señales que incluye la fosforilación de distintos sustratos y la activación de la enzima PKC que induce la proliferación linfocitaria, la síntesis de varias citoquinas y de sus receptores.

La activación de los linfocitos T citotóxicos requiere de su unión con una célula dendrítica y de esta última a un linfocito T colaborador. Para que esto ocurra, la célula dendrítica debe procesar y mostrar al antígeno asociado tanto a moléculas de MHC de

clase I como de clase II. De esta forma el linfocito T colaborador, a través de distintas citoquinas, provoca la activación del linfocito T citotóxico (figura 5, panel A). A su vez, es posible que la célula dendrítica se una, en un primer momento, al linfocito CD4+ y así permita que la célula dendrítica interactúe luego con el linfocito CD8+. Esto se logra ya que la célula CD4+ activa a la CPA profesional a través de la unión con el marcador CD40, mostrando moléculas coestimuladoras y liberando citoquinas (figura 5, panel b) (Abbas y Lichtman, 2003; Roitt y Delves, 2003).



**Figura 5: Activación de los linfocitos T citotóxicos por las células T colaboradoras**

La activación de los linfocitos T colaboradores (Th) por la célula dendrítica involucra una señal coestimuladora dada por la unión del CD40L-CD40 y el reconocimiento del complejo antígeno-MHC clase II por el TCR. a) Tanto el linfocito Th como el linfocito T citotóxico (Tc) se presentan en el mismo momento. b) La célula dendrítica y el linfocito Th se unen primero. Este último permite a la célula dendrítica que interactúe más tarde con el linfocito Tc activándolo. Adaptado de Roitt y Delves, 2003.

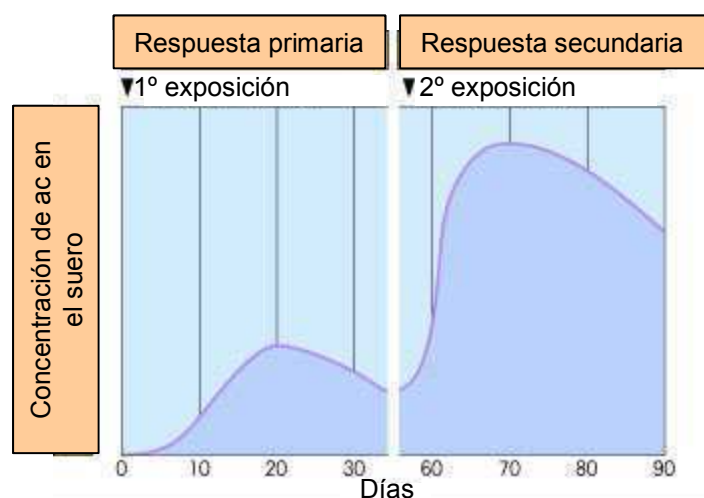
Los linfocitos B se activan en respuesta a dos tipos distintos de antígenos: antígenos timoIndependientes y antígenos timodependientes (Abbas y Lichtman, 2003; Roitt y Delves, 2003). En el caso de los **antígenos timoIndependientes (T-Independientes)**, se trata de antígenos lineales y que tienen un determinante muy repetido, como por ejemplo el lipopolisacárido. Son capaces de estimular a los



linfocitos B en forma directa sin necesidad de que participen los linfocitos T. Esto ocurre a través de un enlace cruzado entre los receptores de los linfocitos B (anticuerpos anclados a membrana) y el antígeno, que genera una serie de fosforilaciones, activación de la enzima PKC y estimulación de la proliferación celular. Este tipo de antígenos producen anticuerpos de tipo IgM y no generan memoria.

Los **antígenos timodependientes (T-dependientes)** necesitan de la colaboración de los linfocitos T para poder activar a los linfocitos B. Para que esto ocurra, los linfocitos B internalizan al complejo formado por el antígeno y el anticuerpo de superficie. Este antígeno es procesado y presentado junto a una molécula de MHC de clase II y puede ser reconocido por un linfocito T colaborador que fue previamente activado. Luego, mediante señales coestimuladoras a través de la interacción CD40 (presente en el linfocito B) con su ligando (CD40L), presente en el linfocito T colaborador, el linfocito B es activado regulando positivamente la aparición de distintos receptores para citoquinas (por ejemplo IL-4) y se impulsa la proliferación, expansión clonal y producción de anticuerpos. Estos tipos de antígenos generan una memoria muy eficiente.

Cuando un linfocito B es expuesto por primera vez a un antígeno timodependiente, genera la producción de anticuerpos tipo IgM. Esto se conoce como **respuesta primaria**. A su vez, un pool de linfocitos B se diferencia a células de memoria, las cuales frente a una segunda exposición al antígeno generan una **respuesta secundaria**, caracterizada por la producción de anticuerpos tipo IgG. Esta respuesta ocurre más rápidamente y persiste por más tiempo, produciéndose mayores títulos de anticuerpos con respecto a la respuesta primaria (figura 6).



**Figura 6: Respuesta primaria y secundaria**

Se inyecta un antígeno T dependiente en dos ocasiones distintas. La producción de anticuerpos (ac) ante la segunda exposición es más rápida e intensa. Adaptado de Roitt y Delves, 2003.

## 4. Modelos animales

Tal como se mencionó anteriormente, los pacientes con diabetes presentan una diferente susceptibilidad a desarrollar infecciones (Chang y *col.*, 2004; Thomsen y *col.*, 2004). Dentro de los factores que regularían esta susceptibilidad individual está el condicionamiento genético del individuo así como también la participación de factores ambientales, principalmente el estrés. En este sentido, el estudio en animales de laboratorio nos brinda la posibilidad de obtener un conjunto de resultados más homogéneos dado que las variables tanto genéticas como experimentales son más controladas. Es así que se han desarrollado modelos de patologías humanas en ratones endocriados y en particular las cepas de ratones BALB/cByJ y C57BL/6J son modelos muy utilizados para estudiar el efecto de las diferencias genéticas en la patogénesis de muchas enfermedades.

Estas dos cepas presentan diferencias en la inmunidad innata (Watanabe y *col.*, 2004) y adquirida (Guinazu y *col.*, 2004) y han sido muy utilizadas para la investigación de la patogénesis de infecciones intracelulares (Ulett y *col.*, 2000; Roggero y *col.*, 2009; Autenrieth y *col.*, 1994). Asimismo, frente a un desafío antigénico estas cepas responden con un perfil diferente de citoquinas, los ratones BALB/cByJ dan respuesta con predominio Th2 y los C57BL/6J con predominio Th1.

Por otro lado, los ratones de la cepa BALB/cByJ y C57BL/6J difieren en la respuesta comportamental y en los parámetros neuroquímicos. En este sentido, ratones de la cepa BALB/cByJ expuestos a estrés crónico mostraron una menor capacidad de aprendizaje y memoria que los controles no estresados, mientras que este efecto no se observó en los ratones C57BL/6J (Palumbo y *col.*, 2009). Se encontró que este déficit cognitivo podía estar asociado a una diferente regulación del balance Th1/Th2 (Palumbo y *col.*, 2010). Además, se reportó que ambas cepas presentan diferente respuesta metabólica a una dieta alta en grasa (Nishikawa y *col.*, 2007).

### 4.1 Modelos animales de estrés

Existen numerosos modelos animales de estrés. Dependiendo de la duración del estímulo pueden clasificarse como agudos o crónicos. Se pueden aplicar distintos agentes estresantes, entre ellos podemos mencionar el shock eléctrico, la inmovilización, la restricción de la comida, el frío, el ejercicio, la exposición a un predador. La aplicación de estos por un periodo de tiempo prolongado (más de una semana) (Joels y Baram, 2009) es considerado como modelo de estrés crónico. Estos

modelos también se han asociado al desarrollo de trastornos de ansiedad y depresión (Willner y *col.*, 1992). Por esta razón muchos modelos de estrés crónico han sido utilizados para probar fármacos antidepresivos.

Los diferentes modelos animales también se pueden clasificar por la cantidad de estresores que se usen. De esta manera, si se usa un único estresor (como el estrés por inmovilización) se los conoce como modelos homotrópicos. Si se usa una combinación de diferentes estresores se los llama modelos heterotrópicos.

Un modelo de estrés heterotrópico es el modelo de estrés crónico moderado (CMS). El mismo consiste en exponer a los animales a una serie de estresores considerados moderados que se aplican de manera crónica, secuencial y alternada para no producir acostumbamiento por parte del animal (Moreau, 1997; Willner y *col.*, 1992). Este modelo implica un bajo grado de estrés ofreciendo una aproximación razonable a diversos estresores de la vida diaria. En este sentido, el modelo de CMS ofrece una simulación realista de los efectos biológicos del estrés crónico.

Es importante tener en cuenta que la sensibilidad a este modelo puede variar de acuerdo con la cepa utilizada, el sexo, la edad e inclusive al proveedor de los animales. Asimismo es importante considerar que las cepas BALB/cByJ y C57Bl/6J han sido denominadas “reactivas” y “relativamente resistentes” al estrés, respectivamente (Lepicard y *col.*, 2000; Tannenbaum y Anisman, 2003).

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---

### 1. Hipótesis de trabajo

Postulamos la existencia de una alteración en la respuesta inmune en el estado diabético la cual esta afectada por el estrés. En esta alteración participan factores genéticos y no genéticos, teniendo un rol fundamental la hiperglucemia.

### 2. Objetivos

#### 2.1 Objetivos generales

Estudiar la respuesta inmune en la diabetes mellitus tipo 1 y también los mecanismos que participan en la misma ampliando el conocimiento acerca de los factores genéticos y no genéticos que participan en la evolución del estado diabético y la alteración de la respuesta inmune. En lo que respecta a los factores genéticos se contemplará el condicionamiento innato del individuo. Dentro de los posibles factores no genéticos que afectarían la progresión de la diabetes están los factores ambientales, siendo de particular importancia el estrés. La respuesta adaptativa al estrés involucra clásicamente, la activación del eje Hipotálamo-Hipofisis-Adrenal y el Sistema Nervioso Autónomo, que a su vez regulan la respuesta inmune. Por otra parte, la hiperglucemia es el principal factor determinante del inicio y la progresión de las complicaciones que sufre el paciente con diabetes, entre ellas la falta de una respuesta inmune eficiente frente a cuadros infecciosos. Por este motivo, es de interés determinar la influencia de estos mediadores neuroendocrinos en los efectos del estrés en la respuesta inmune de los animales con diabetes.

#### 2.2 Objetivos específicos

- Estudiar la respuesta inmune en un modelo experimental murino de diabetes mellitus tipo 1 en dos cepas de ratones: BALB/cByJ y C57Bl/6J (con el fin de tener distintos condicionamientos genéticos) en función del tiempo transcurrido desde la inducción de la enfermedad a través de ensayos *in vivo* e *in vitro*. *In vivo* se evaluará la respuesta inmune humoral a través de la producción de anticuerpos, luego de una inmunización con antígenos T-dependientes y T-independientes. La respuesta inmune se estudiará *in vitro* mediante el análisis de la proliferación de poblaciones celulares enriquecidas en linfocitos T o B luego de una estimulación con mitógenos selectivos para cada población.

- Con el fin de estudiar la influencia del estrés sobre la instauración y evolución de la diabetes se utilizarán dos modelos de estrés crónico: un modelo de estrés homotrópico (inmovilización) y uno de estrés heterotrópico (estresores diferentes aplicados de manera aleatoria) y se aplicarán previa y posteriormente a la instauración de la diabetes. Se evaluarán las glucemias y los niveles de hemoglobina glicosilada.
- Analizar la asociación entre diabetes, estrés y la alteración inmune en ambas cepas de ratones estudiando la proliferación linfocitaria. Para estudiar la participación de los mecanismos neuroendocrinos, se determinarán los niveles de corticosterona y catecolaminas en bazo.
- Estudiar la participación de la hiperglucemia en las alteraciones inmunológicas observadas en el estado diabético. A tal fin se analizará, el efecto del agregado de concentraciones crecientes de glucosa en el medio de cultivo sobre la respuesta inmune de linfocitos normales provenientes de ambas cepas de ratones.
- Estudiar la participación del estrés oxidativo en las alteraciones observadas. Se determinarán los niveles de ROS, la peroxidación lipídica y las defensas antioxidantes en linfocitos normales provenientes de ambas cepas de ratones incubados en presencia de altas concentraciones de glucosa. También se evaluará la reversión de las alteraciones observadas utilizando el antioxidante N-acetilcisteína.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

## 1. Animales

Se utilizaron ratones endocriados hembra de 2 meses de edad de las cepas BALB/cByJ y C57Bl/6J obtenidos del bioterio central de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Buenos Aires. A excepción de cuando se indica, los animales se mantuvieron en condiciones estándar de luz (de 7:00 a 19:00 hs) y temperatura ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) con libre acceso a comida y agua. Todos los protocolos utilizados fueron aprobados por el Comité Institucional para el cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, el cual sigue los principios de la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, U.S. National Research Council, 1996.

## 2. Modelos animales

La diabetes se indujo mediante la administración de múltiples dosis bajas de estreptozotocina. Con relación al estrés, se utilizaron dos modelos: estrés crónico moderado y estrés por inmovilización.

### 2.1 Modelo animal de diabetes mellitus tipo 1

Para la inducción de la diabetes, los ratones fueron inyectados intraperitonealmente (i.p.) con múltiples dosis de estreptozotocina (STZ, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA). Cada una de estas dosis fue de 45 mg de STZ por kg de peso corporal disuelta en buffer citrato pH 4,5 y fueron administradas durante 5 días consecutivos a la misma hora (Like y Rossini, 1976). Como control se utilizaron ratones de iguales características tratados en paralelo con buffer citrato pH 4,5.

El estado diabético se corroboró mediante la medición de la glucemia aproximadamente a las 12 hs, luego de 2 horas de ayuno a partir del día 14 desde la aplicación de la primera dosis de STZ. Fueron considerados diabéticos los animales que presentaron una glucemia superior a 110 mg/dl. Los ratones presentan una buena sobrevida, sin la necesidad de administrar insulina exógena.

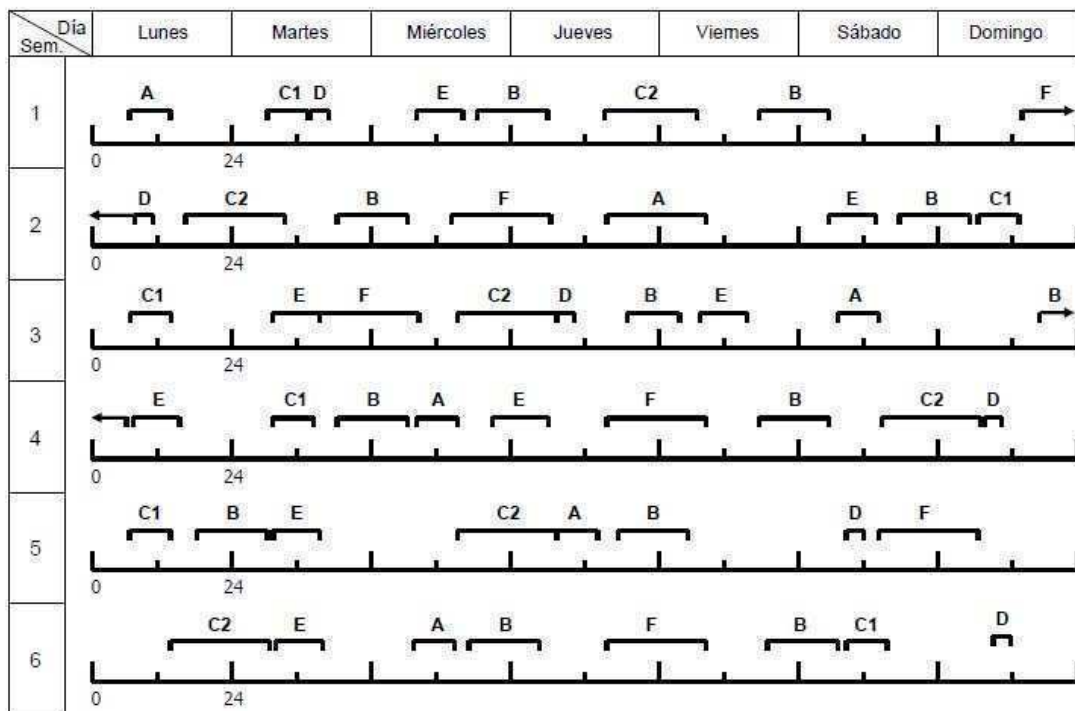
### 2.2 Estrés crónico moderado (CMS, del inglés: *Chronic Mild Stress*)

Se utilizó el modelo desarrollado por Willner y *col.* (1992) en rata y modificado por Monleón y *col.* (1995) para ratón. El modelo consiste en la aplicación de estresores variados (heterotrópico) de intensidad moderada según fueron clasificados por "Animals (Scientific Procedures) Act of 1986 (UK legislation)". Los estresores utilizados fueron los siguientes.:



- 1 periodo de 3 horas de privación de agua y alimento;
- 1 periodo (7 horas) de privación de agua;
- 2 periodos de iluminación continua durante la noche;
- 2 periodos (7 y 17 horas) de inclinación de la jaula a 45°;
- 1 periodo de 8 horas de privación de alimento;
- 1 periodo de 17 horas compartiendo la jaula (se agrupa siempre el mismo par de animales alternando el orden de la jaula usada).

Para evitar el acostumbamiento del animal, el orden de los estresores se aplicó de manera alternada (sin seguir un orden estipulado), según se indica en la figura 7. Luego de la sexta semana se comenzó con el mismo esquema desde el inicio. Con esta exposición se logra una condición de estrés crónico moderado que induce un estado de depresión que se traduce en la disminución en la preferencia por la bebida dulce (Anhedonia) a partir de la cuarta semana, llegando al máximo a partir de la sexta semana (Edgar y col., 2002).



**Figura 7: Esquema del modelo de estrés crónico moderado.**

El gráfico muestra cómo fueron usados los estresores. Los corchetes indican el tiempo en el cual fue aplicado el estresor a cada ratón. A- un periodo de 7 hs de privación de agua, B- dos periodos de iluminación continua durante la noche, C1-un periodo de 7 hs de inclinación de la jaula a 45°, C2- un periodo de 17 hs de inclinación de la jaula a 45°, D- un periodo de 3 hs de privación de agua y alimento, E- un periodo de 8 hs de privación de alimento, F- un periodo de 17 hs compartiendo la jaula.

### 2.3 Estrés crónico por inmovilización (CRS, del inglés: *Chronic Restraint Stress*)

Los animales fueron expuestos a la inmovilización en tubos de polipropileno (de 2,8 cm de diámetro x 11,5 cm de largo) bien ventilados, sin acceso a agua ni alimento, por 6 hs diarias (de 10:00 a 16:00 hs) durante 21 días consecutivos (Alfonso y col., 2006). Los animales no se comprimen ni sufren ningún tipo de dolor y luego de la exposición prolongada muestran los disturbios conductuales típicos observados en otros modelos validados como ser una alteración en la actividad locomotora en el test de campo abierto y una reducción en la latencia al escape en el test de natación forzada y en el test de suspensión de la cola (Frick y col., 2009; Willner y Mitchell, 2002).

### 2.4 Combinación de los distintos modelos

Según corresponda, los modelos se combinaron de la siguiente manera (figura 8):

*-Estrés crónico por inmovilización previo a la inducción de la diabetes:* los animales fueron inmovilizados por 21 días y luego se indujo la diabetes. Los grupos experimentales con los que trabajamos fueron:

- Animales controles
- Animales expuestos a CRS (CRS)
- Animales diabéticos (Diab)
- Animales expuestos a CRS a los que se les indujo la diabetes (CRS + Diab).

*-Estrés crónico moderado previo a la inducción de la diabetes:* los animales fueron sometidos al esquema de estrés crónico moderado por seis semanas. Finalizado este periodo, se indujo la diabetes. Los grupos experimentales con los que trabajamos fueron:

- Animales controles
- Animales expuestos a CMS (CMS)
- Animales diabéticos (Diab)
- Animales expuestos a CMS a los que se les indujo la diabetes (CMS + Diab).

*-Estrés crónico por inmovilización posterior a la inducción de la diabetes:* se indujo la diabetes y seguidamente los animales fueron inmovilizados por 21 días. Los grupos experimentales con los que trabajamos fueron:

- Animales controles
- Animales expuestos a CRS (CRS)
- Animales diabéticos (Diab)
- Animales a los que se les indujo la diabetes y luego fueron expuestos a CRS (Diab + CRS).

*-Estrés crónico moderado posterior a la inducción de la diabetes:* se indujo la diabetes y seguidamente los animales fueron sometidos al esquema de estrés crónico moderado durante todo el tiempo experimental. Los grupos experimentales con los que trabajamos fueron:

- Animales controles
- Animales expuestos a CMS (CMS)
- Animales diabéticos (Diab)
- Animales a los que se les indujo la diabetes y luego fueron expuestos a CMS (Diab + CMS).

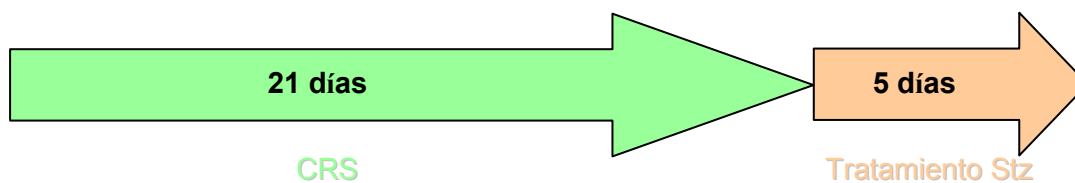
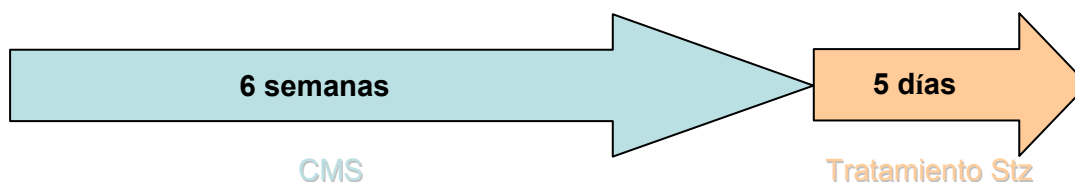
**Estrés crónico por inmovilización previo a la inducción de la diabetes****Estrés crónico moderado previo a la inducción de la diabetes****Estrés crónico por inmovilización posterior a la inducción de la diabetes****Estrés crónico moderado posterior a la inducción de la diabetes**

Figura 8: Esquema de la combinación de los distintos tratamientos.

### 3. Determinación de parámetros bioquímicos y hormonales

#### 3.1 Medición de la glucemia

Las glucemias fueron determinadas aproximadamente a las 12:00 horas luego de 2 horas de ayuno. La sangre se obtuvo realizando un pequeño corte en la punta de la cola. La glucemia se midió utilizando un glucómetro comercial (One Touch Ultra test, Lifescan, Johnson-Johnson Co, Milipitas, CA, EUA).

### 3.2 Determinación de los niveles de hemoglobina glicosilada

La hemoglobina glicosilada se determinó en sangre entera anticoagulada con EDTA utilizando un kit comercial basado en el método de inhibición inmunturbidimétrica para la determinación cuantitativa de HbA1c (Wiener Laboratorios S.A.I.C., CABA, Argentina). Este método mide mediante dos reacciones independientes los nivel de hemoglobina A1c (HbA1c) y de hemoglobina total (Hb) de la muestra y determina la concentración de HbA1c como un porcentaje de la Hb (%HbA1c).

### 3.3 Medición de los niveles de insulina

La muestra se tomó luego de 2 hs de ayuno y siempre a las 11.00 hs. Para la obtención, los animales fueron anestesiados con CO<sub>2</sub> y sangrados. La sangre fue recogida en tubos con 30 µl de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,1 mM a 4°C. El plasma fue separado en una centrífuga refrigerada y guardado a -70°C hasta el momento de la determinación.

Para la determinación de la hormona se utilizó un radioinmunoensayo comercial desarrollado para la medición de la insulina en roedores (Linco Research, Millipore, Billerica, MA, EUA). El trazador utilizado fue insulina-<sup>125</sup>I con una actividad específica AE=367 µCi/µg y el rango de concentración de la curva estándar fue de 0,1 ng/ml a 10 ng/ml. Para el ensayo, se colocó en tubos de polipropileno 100 µl de estándar o de muestra, 100 µl del trazador y 100 µl del anticuerpo anti-insulina. Se incubó durante toda la noche a 4°C y luego se agregó 1 ml de la solución de precipitación. Se incubó por 20 minutos a 4°C y se centrifugó 2000 x g a una temperatura de 4°C por 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y se midió el precipitado en un contador gamma (1470 Wizard Gamma Counter, Wallac, Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA).

### 3.4 Medición de los niveles de corticosterona

Para evitar fluctuaciones en los niveles de la hormona debido a los ritmos circadianos, la muestra de sangre fue tomada siempre a las 10 hs. Los animales fueron anestesiados con CO<sub>2</sub>, y las muestras de sangre fueron obtenidas y conservadas de acuerdo a lo descrito en el ítem anterior. En todos los casos el tiempo de sangrado fue menor de 20 segundos.

Para la determinación se utilizó un radioinmunoensayo desarrollado en el laboratorio. Como trazador se utilizó corticosterona-<sup>3</sup>H con una actividad específica AE=62,6 Ci/mmol (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA). Se utilizó un anticuerpo anti-

corticosterona con una  $K_a=70 \times 10^9$  L/mol (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA). La curva estándar se realizó con un solución madre de corticosterona (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) en un rango de concentraciones de 62,5 pg/0,1 ml a 2000 pg/0,1 ml. Para el ensayo, se colocó en tubos de polipropileno: 100  $\mu$ l de estándar o una dilución 1/20 de la muestra, 500  $\mu$ l de la dilución del anticuerpo y 100  $\mu$ l de la dilución del trazador. Se incubó durante 1 hora a 37°C y luego se agregó 100  $\mu$ l de una solución de 5 mg/ml carbón 5 mg/ml dextran T70 previamente disuelta (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA y Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia, respectivamente). El buffer utilizado en el ensayo fue buffer Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,1 M, BSA 0,1 % pH 8. Luego se centrifugó a 2000 x g a una temperatura de 4°C por 20 minutos y se tomó el sobrenadante, se agregó 1 ml de una solución centelladora comercial (Optiphase HISAFE 3, Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA) y se midió la radioactividad presente en un contador de centelleo líquido (Tricarb 2800 TR Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA). El anticuerpo utilizado presenta reacciones cruzadas del 20% con desoxicorticosterona, del 15% con progesterona, del 8% con testosterona y con 20  $\alpha$ -OH- progesterona, entre las principales.

### 3.5 Medición de los niveles de catecolaminas

Como estrategia experimental, las catecolaminas fueron determinadas en el bazo de los ratones debido a la importante inervación simpática que presenta este órgano (Hori y *col.*, 1995; Kim y *col.*, 2004). Para su dosaje se utilizó la técnica fluorométrica de Laverty y Taylor (1968), que determina principalmente noradrenalina. Se homogeneizaron los bazos en una solución de 12,5% de  $\text{SO}_3\text{Na}_2$ , 10% EDTA y 0,4N de ácido perclórico. Luego se centrifugaron a 15000 x g por 20 minutos a 4°C y los sobrenadantes fueron llevados a pH 8,2 y sembrados en columnas de alúmina las que previamente fueron equilibradas con acetato de sodio 0,2N pH 8,2. Se eluyó con ácido acético 0,2N. Paralelamente, se realizó una curva estándar con noradrenalina en un rango de concentraciones de 10 a 100 ng. Los eluatos fueron oxidados con iodo en medio alcalino. Se determinó la fluorescencia excitando con una longitud de onda de 380 nm y midiendo la emisión a 480 nm en un espectrofluorómetro (JASCO FP 770, Easton, MD, EUA). Para determinar la eficiencia de la purificación en la columna se realizó la oxidación de una curva estándar que no fue purificada a través de las columnas y se comparó con aquella que sí lo fue. En todos los ensayos obtuvimos una eficiencia superior al 80%.

## 4. Determinaciones *in vivo*

### 4.1 Inmunizaciones

Los ratones normales y diabéticos fueron inyectados i.p. con 200  $\mu$ l de una suspensión de glóbulos rojos de carnero (GRc, Laboratorio Alfredo C. Gutierrez, CABA, Argentina) al 2,5% en PBS (antígeno T dependiente) o con una suspensión de lipopolisacárido (LPS, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) de 0,05 mg/ml (antígeno T independiente). Como control se administró PBS (buffer fosfato 150 mM, con el agregado de NaCl hasta llegar a una concentración de 9 g/l).

Luego de 10 días de inmunizados, los animales fueron anestesiados con CO<sub>2</sub> y mediante punción retroorbital se extrajeron muestras de sangre. El suero se guardó a -20°C y posteriormente se utilizó para medir anticuerpos de tipo IgM, anti-GRc y anti-LPS, según cada caso.

Los ratones tratados con GRc fueron inmunizados por segunda vez con 200  $\mu$ l de una suspensión de glóbulos rojos de carnero (GRc) al 2,5% en PBS al día siguiente de la punción retroorbital. A los 7 días, se extrajo la sangre de los animales y los mismos fueron sacrificados por dislocación cervical. El suero obtenido se guardó a -20°C y posteriormente se utilizó para medir anticuerpos tipo IgG anti-GRc.

### 4.2 Titulación

La valoración del título de los anticuerpos presentes en los sueros provenientes de los animales inmunizados se realizó mediante la técnica de enzimoimmunoensayo (ELISA). Para esto se realizaron diluciones seriadas de los sueros anti-GRc (1° y 2° inmunización) y anti-LPS.

#### 4.2.1 *Obtención de membranas de glóbulos rojos de carnero*

Los GRc fueron lavados 3 veces en PBS. Luego fueron lisados con agua destilada y centrifugados a alta velocidad (12000 x g) durante 30 minutos a 4°C. A continuación, se realizaron 3 lavados con buffer CO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub> 100 mM pH 11-12 y centrifugados a 12000 x g durante 30 minutos a 4°C. Se midió la concentración de proteínas mediante la técnica de Bradford.

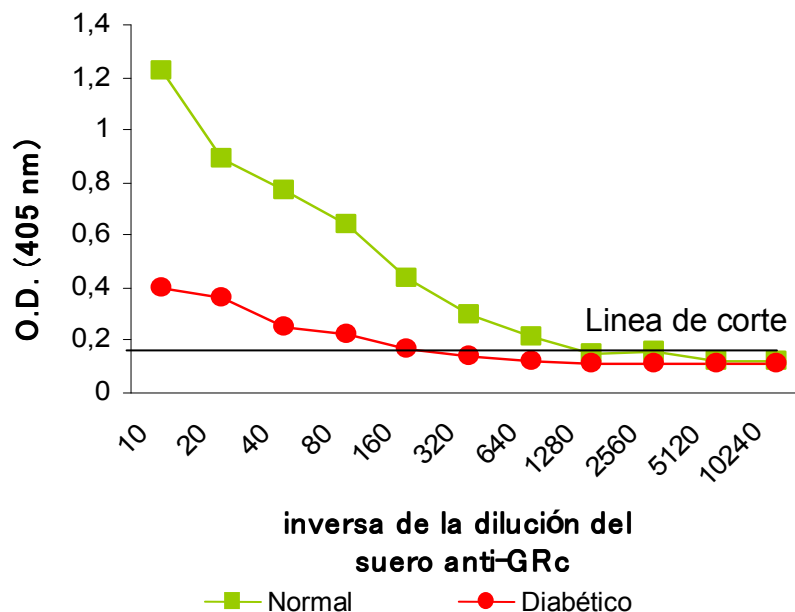
#### 4.2.2 *Determinación del título de anticuerpos por ELISA*

En función del suero utilizado (anti-GRc o anti-LPS), se sensibilizaron placas de ELISA (Greiner Bi-one, Frickenhausen, Alemania) de 96 pocillos con 7,5  $\mu$ g de

proteína de GRc o con 1 µg de LPS por pocillo disueltos en 50 µl de buffer  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  100 mM pH 11-12 (Silberman y *col.*, 2003). Las placas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente fueron lavadas con PBS 5 veces e incubadas con PBS-albúmina al 2,5% a 37°C por una hora (bloqueo). Como paso siguiente, se realizaron diluciones seriadas al 1/2 en PBS-albúmina al 1% de los plasmas obtenidos de animales inmunizados y no inmunizados y se incubaron 50 µl del suero anti-GRc o anti-LPS en las respectivas placas a 37°C por 2 horas. Se lavaron con PBS-Tween 0,05% 5 veces y se incubaron por 1 hora a 37°C con el anticuerpo de cabra conjugado con fosfatasa alcalina. Se utilizó un anticuerpo anti-IgM (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) para el suero anti-GRc (1<sup>ra</sup> inmunización) y anti-LPS y anti-IgG (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) para el suero anti-GRc (2<sup>da</sup> inmunización). En todos los casos, la dilución del anticuerpo utilizada fue 1:5000. Las placas se lavaron 5 veces con PBS-Tween 0,05% y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad con 1 mg/ml de para-nitrofenilfosfato (pNPP, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) disuelto en 100 µl de buffer  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  100 mM pH 11-12, como sustrato de la fosfatasa alcalina. La reacción se detuvo con 100 µl de NaOH 3 N y la coloración obtenida se leyó a 405 nm en un lector de microplacas (BIORAD modelo 3550, Hercules, CA, EUA). Las lecturas provenientes de los animales no inmunizados se utilizaron para determinar el valor correspondiente a una lectura no positiva (línea de corte). Para ello se utilizó el criterio: promedio + 2 x desvío estándar de los plasmas de animales no inmunizados. El título se consideró como la máxima dilución mayor a la línea de corte.

En la figura 9 se puede observar un experimento representativo de las curvas de titulación de anticuerpos tipo IgG obtenidas con animales normales y diabéticos luego de transcurrido un mes de la inducción de la patología. En la misma se observa que el animal diabético presenta una disminución significativa en la producción de anticuerpos de tipo IgG con respecto al normal.





**Figura 9: Curva de titulación de anticuerpos producidos por animales normales y diabéticos.**

Utilizando la técnica de ELISA, se midió la producción de anticuerpos en ratones normales y diabéticos de 1 mes. Los animales se inmunizaron con 2 inoculaciones, con diez días de diferencia, de GRC al 2,5%. A la semana de la segunda inmunización se midió en el suero la producción de IgG anti-GRC. Esta curva muestra un experimento representativo.

## 5 Determinaciones *in vitro*

### 5.1 Obtención de las suspensiones celulares

Los ratones controles, CMS, diabéticos y Diab + CMS se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajeron asépticamente el bazo y los ganglios inguinales, axilares y mesentéricos. Trabajando en un flujo laminar, los órganos linfoides se disgregaron manualmente a través de una malla metálica de 1 mm con RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) a temperatura ambiente. La suspensión obtenida se pasó por una aguja GS 30 a fin de quitar los grumos presentes en la suspensión. Luego de tres lavados en medio RPMI 1640 a 300 x g a temperatura ambiente por 10 minutos, la suspensión celular fue resuspendida en el mismo medio suplementado con 10% de suero fetal bovino (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), glutamina 2 mM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

### 5.2 Determinación de la viabilidad celular

La viabilidad celular fue estimada luego de teñir las células con una solución al 0,04% de azul tripán (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) (Genaro y *col.*, 1993). Este colorante se encuentra en las células que presentan lesionada la membrana

plasmática. El número de células viables se determinó a través del conteo de las células azul tripán negativas (viables) y positivas (muertas) en una cámara de Newbauer observadas con microscopio a 400x de aumento. En cada caso, se contaron por lo menos 200 células. La viabilidad de las células recientemente obtenidas fue mayor del 95 %.

### **5.3 Incubación celular**

Para los estudios del efecto de las altas concentraciones de glucosa, las suspensiones celulares obtenidas en condiciones de esterilidad fueron incubadas en medio RPMI 1640 suplementado, al cual se le agregaron las respectivas cantidades de D-glucosa (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) o D-manitol (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) de modo de alcanzar la concentración final descrita en cada experimento. De este modo,  $3 \times 10^6$  células por ml provenientes de ganglio y bazo, se colocaron en ausencia (medio estándar, 0,2 g% de glucosa) o presencia de altas concentraciones de glucosa o manitol a 37°C y en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 hs. Para todos los casos se partió de una solución madre de glucosa al 40% y una solución de manitol al 15% en agua destilada. Para las incubaciones realizadas en presencia del antioxidante N-acetilcisteína (NAC, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA), el mismo se agregó en el medio de cultivo en una concentración final de 5 mM en el mismo momento en que se añadió la glucosa.

### **5.4 Determinación de la apoptosis**

Luego de la incubación en medio RPMI 1640 suplementado en ausencia o en presencia de alta glucosa o manitol y con la adición de NAC (cuando correspondió) durante 24 hs, se determinó la presencia de células apoptóticas. Las mismas fueron identificadas mediante la observación por microscopía de fluorescencia de la morfología nuclear de las células teñidas con Hoescht 33342 (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA), mediante el análisis por citometría de flujo de los linfocitos teñidos con ioduro de propidio (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) ó con Anexina V-FITC (BD Biosciences) e ioduro de propidio.

#### *5.4.1. Tinción con Hoeschst 33342*

Para determinar la presencia de células apoptóticas, se colocó una gota de una suspensión celular de  $1 \times 10^5$  células/ml sobre un portaobjeto y se dejó secar en la estufa a 37°C. Luego, el portaobjetos fue cubierto con etanol 100%. Se dejó secar en estufa a 37°C. Este procedimiento se repitió 3 veces para fijar las células. A

continuación, se incubó durante 15 minutos en oscuridad con solución de Hoeschst (50 µg/ml) diluido 1:10 en PBS y se lavó tres veces con PBS. Los núcleos celulares ya fijados y teñidos fueron observados en un microscopio de fluorescencia a 1000x (Olympus IMT2, Tokyo, Japón), donde se analizó la presencia de cromatina condensada y fragmentada, morfología compatible con una célula en proceso apoptótico.

#### 5.4.2. *Análisis por citometría de flujo de los linfocitos teñidos con ioduro de propidio*

Se utilizó una modificación de la técnica de Nicoletti (Nicolletti y col., 1991).

Luego de la incubación con altas concentraciones de glucosa, las células provenientes de ganglio y bazo fueron fijadas con etanol 70% frío durante toda la noche. Luego del lavado con buffer fosfato conteniendo 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0,1 M de ácido cítrico (pH 7.8), las células fueron teñidas en la oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente con una solución de ioduro de propidio (50 µg/ml de ioduro de propidio, 0,1% Triton X-100, 50 µg/ml RNAsa A). El análisis de las muestras se realizó por citometría de flujo (FACScan, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) adquiriéndose 10000 células para cada muestra. Se utilizó el programa WinMDI para Windows para el análisis de los datos. Mediante la obtención y análisis de los histogramas, se calculó el porcentaje de células apoptóticas (Zamai y col., 1993). En dicho histograma, la tinción con ioduro de propidio permite observar al núcleo apoptótico como un ancho pico de ADN hipodiploide que es fácilmente discriminable del pico angosto de ADN que muestran las células normales (diploide). Cabe destacar que cuando la muerte celular es inducida por caminos distintos al de la apoptosis, no se observa este pico ancho, demostrando que solo aparece cuando el mecanismo utilizado para la muerte celular es la apoptosis (Nicolletti y col., 1991; Zamai y col., 1993).

#### 5.4.3. *Análisis por citometría de flujo utilizando Anexina V-FITC e ioduro de propidio*

La apoptosis también fue determinada utilizando Anexina V-FITC e ioduro de propidio. La anexina se une a la fosfatidilserina en presencia de calcio. Durante la apoptosis, la fosfatidilserina (que se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática en las células vivas) es translocada a la cara externa de la membrana. El ioduro de propidio se utiliza para distinguir aquellas células que perdieron la integridad de la membrana. Para esta técnica, las células fueron lavadas en PBS y resuspendidas en buffer 10 mM Hepes/NaOH pH 7,5; 0,14M NaCl; 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> e incubadas con 0,5 µg/ml de Anexina V-FITC y 2,5 µg/ml de ioduro de propidio a

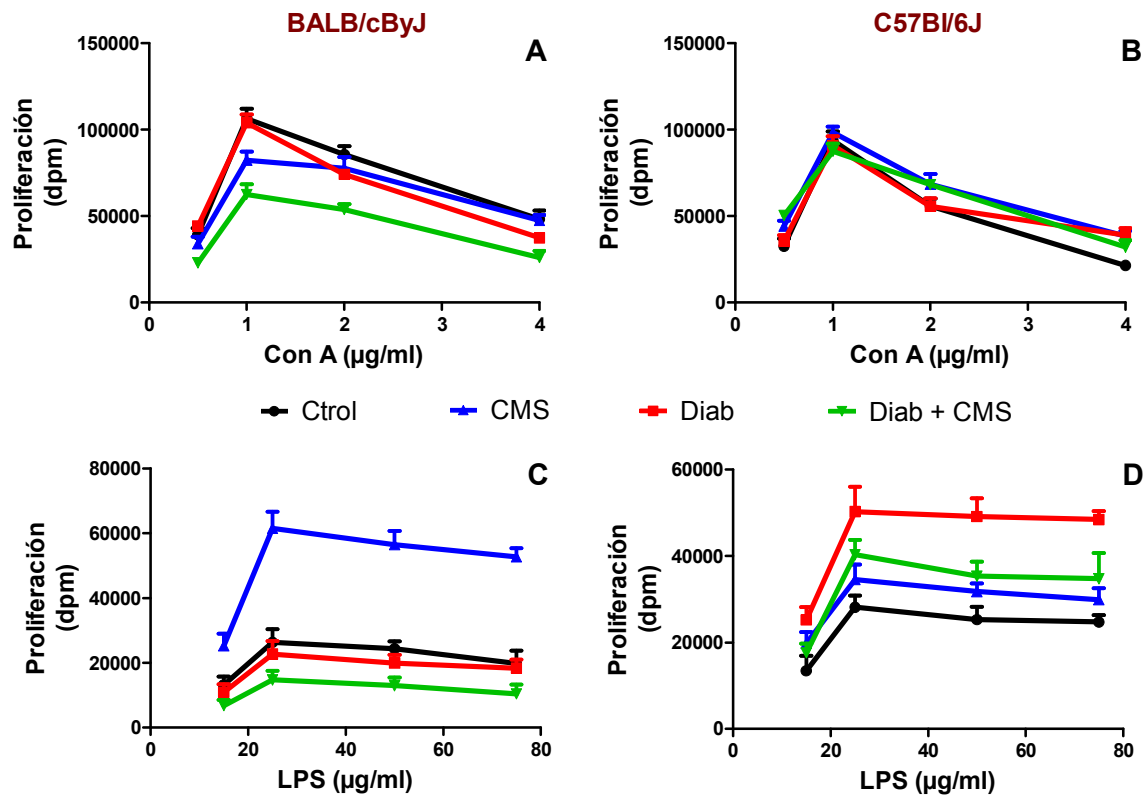
temperatura ambiente en la oscuridad por 15 minutos (Walsh y *col.*, 1998). Se realizó el análisis por citometría de flujo (FACScan, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ EUA). Para cada muestra, se adquirieron 10000 células y se analizaron utilizando el programa winMDI para Windows.

## 5.5 Medición de la proliferación celular

### 5.5.1 *Por incorporación de timidina-<sup>3</sup>H*

Suspensiones celulares ( $1,5 \times 10^6$  de células por ml) fueron incubadas a 37°C y en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> en placas de 96 pocillos (Axygen, Union City, CA, EUA) en un volumen final de 200 µl de RPMI 1640 suplementado. Las células provenientes de los ganglios, se incubaron en presencia de concanavalina A (Con A, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA), mitógeno selectivo para linfocitos T. Las células provenientes del bazo, se incubaron en presencia de lipopolisacárido (LPS, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA), mitógeno selectivo para linfocitos B. La proliferación basal, en ausencia de mitógenos, se determinó reemplazando el agregado de los mismos por igual volumen de medio RPMI 1640. Luego de 24 hs de incubación, se agregó a cada pocillo 0,75 µCi de timidina-<sup>3</sup>H (actividad específica: 20 Ci/mmol, Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA) y se continuó incubando en estufa gaseada por 72 hs más. Las células estimuladas por los mitógenos presentaron la cinética de proliferación esperada (Cazaux y *col.*, 1995), observándose un pico en el cuarto día de cultivo, momento en el cual las placas fueron congeladas hasta su procesamiento. Las placas fueron descongeladas, el contenido de cada pocillo fue filtrado utilizando un cosechador para placas de 96 pocillos (Packard Bioscience Co, Meriden, CT, EUA) y la fracción macromolecular insoluble quedó retenida en filtros de fibra de vidrio GF/C (Whatman, Maidstone, Kent, UK). Los filtros fueron embebidos en 1 ml de una solución centelladora comercial (Optiphase HISAFE 3, Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA) y se midió la radioactividad presente en un contador de centelleo líquido (Tricarb 2800 TR Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA).

Se determinó la concentración óptima de los mitógenos a utilizar mediante la realización de curvas concentración-respuesta (figura 10). Las concentraciones óptimas de trabajo con Con A y LPS fueron 1 µg/ml y 25 µg/ml respectivamente. No se observaron diferencias en el perfil de estimulación de los mitógenos entre las poblaciones linfocitarias provenientes de animales normales y tratados.



**Figura 10: Curva concentración-respuesta de linfocitos estimulados mitogenicamente.**

Poblaciones linfocitarias provenientes de ganglio (panel A y B) y bazo (panel C y D) de las cepas BALB/cByJ (panel A y C) y C57Bl/6J (panel B y D) fueron estimuladas con distintas concentraciones de Con A y LPS. La proliferación se determinó mediante la incorporación de timidina-<sup>3</sup>H.

### 5.5.2 Por dilución del colorante CFSE

La proliferación linfocitaria también se determinó a través de la dilución del colorante 5(6)-carboxifluorescein diacetato succinimidilester (CFSE, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) (Lyons y Parish, 1994). Las suspensiones celulares fueron lavadas con PBS e incubadas con 5 µM de CFSE por 15 minutos a 37°C en la oscuridad. Finalizada la incubación, las células fueron lavadas 3 veces con PBS, Luego fueron resuspendidas en RPMI, estimuladas con los mitógenos e incubadas a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> por 5 días. A continuación las células fueron fijadas en formaldehído al 3,7% por 15 minutos a temperatura ambiente y analizadas por citometría de flujo (FACScan, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ EUA). Para cada muestra, se adquirieron 10000 células y se analizaron utilizando el programa winMDI para Windows.

## 5.6 Estimación del estado oxidativo.

### 5.6.1 Determinación de los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS)

Poblaciones linfocitarias provenientes de ganglio y bazo ( $3 \times 10^6$  cél/ml) fueron incubadas durante 24 hs en medio RPMI 1640 sin (medio control, estándar) o con la adición al medio de cultivo de glucosa. Luego,  $1 \times 10^6$  células fueron lavadas con PBS e incubadas con  $5 \mu\text{M}$  de diacetato de 2'-7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) durante 15 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . A continuación, las células fueron lavadas y resuspendidas en PBS, de esta forma, quedan listas para la medición. La célula es permeable al DCFH-DA y este, en presencia de los ROS, se convierte en 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF), producto que no puede atravesar la membrana celular y que fluoresce a 530 nm, luego de una excitación a 488 nm. Se determinó la fluorescencia utilizando un espectrofluorómetro (JASCO FP 770, Easton, MD, EUA). Los valores experimentales fueron interpolados en una curva estándar realizada con concentraciones crecientes de DCF (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA). Cabe aclarar que el DCFH-DA puede ser oxidado por varios intermediarios reactivos, por lo que no puede ser utilizado para determinar la presencia de una especie reactiva específica.

### 5.6.2 Determinación de la peroxidación lipídica

Cuando el estado oxidativo de las células está aumentado, se producen reacciones que involucran la acción de los radicales libres sobre los ácidos grasos de las membranas formando, entre otros subproductos, el malondialdehído (MDA) (especie principal). De esta forma, se puede estudiar el grado de peroxidación lipídica a través de la determinación del malondialdehído formado. Este último reacciona con el ácido tiobarbitúrico produciendo especies que presentan absorbancia a 535 nm (Buege y Aust, 1979). Los TBARS por definición, son especies que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico.

Para determinar el grado de peroxidación lipídica, poblaciones linfocitarias provenientes de ganglio y bazo ( $3 \times 10^6$  cél/ml) fueron preincubadas durante 24 hs en medio RPMI 1640 sin (medio control, estándar) o con la adición al medio de cultivo de glucosa. Luego,  $20 \times 10^6$  células fueron centrifugadas por 10 minutos a  $800 \times g$ . Los pellets fueron resuspendidos en TCA 5 % y guardados a  $-20^\circ\text{C}$  hasta el momento de la determinación.

Para la determinación, las muestras fueron centrifugadas a  $1000 \times g$  por 30 minutos y el sobrenadante fue incubado por 15 minutos a  $100^\circ\text{C}$  con 15% de ácido tricloroacético, 0,375% ácido tiobarbitúrico (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) y

0,25 N ácido clorhídrico. Luego de enfriarse se determinó la absorbancia a 535 nm en un espectrofotómetro (Beckman Coulter DU800, Brea, CA, EUA). Paralelamente, se realizó una curva estándar de MDA usando el 1,1,3,3-tetraetoxipropano (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA).

### 5.6.3 *Determinación de la capacidad antioxidante total*

Debido a la dificultad metodológica y la poca sensibilidad que tienen las técnicas utilizadas para medir cada una de las enzimas y moléculas involucradas en la actividad antioxidante propia de la célula, se eligió determinar la actividad antioxidante total siguiendo la técnica desarrollada por Erel (2004). Este método se basa en la disminución de la absorbancia a 660 nm, utilizando el reactivo 2,2-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonato) (ABTS<sup>+</sup>). El ABTS<sup>+</sup> (oxidado) presenta absorbancia a 660nm (entre otros picos de absorbancia), cuando éste se reduce a ABTS es incoloro. Cuando el ABTS<sup>+</sup> está en presencia de un compuesto que puede ser oxidado, este se reduce a la forma ABTS mientras que el compuesto se oxida.

Poblaciones linfocitarias provenientes de ganglio o bazo fueron preincubadas en medio RPMI 1640 sin (medio control, estándar) o con la adición al medio de cultivo de glucosa durante 24 hs. Luego,  $7 \times 10^6$  células fueron centrifugadas por 10 minutos a 800 x g y el pellet fue resuspendido en PBS y guardado a -70°C hasta el momento de la determinación.

Para la determinación, las muestras fueron descongeladas y centrifugadas a 5000 x g por 30 minutos, utilizándose el sobrenadante en el ensayo. Paralelamente, se preparó una curva estándar utilizando Trolox (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA), la forma hidrosoluble de la vitamina E. En una microplaca de 96 pocillos se colocó buffer acetato 0,4 mol/l pH 5,8, se agregaron las muestras y la curva estándar y se determinó la absorbancia a 660nm (blanco de muestra). Inmediatamente se agregó la solución de ABTS<sup>+</sup> 10 mmol/l (0,549 g de ABTS, MP Biomedicals, Solon, OH, EUA, disueltos en buffer acetato 30 mmol/l pH 3,6 con el agregado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con una concentración final 2 mmol/l). Se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y se midió la absorbancia a 660 nm en un lector de microplacas (Biotek  $\mu$ Quant, Winooski, VT, EUA).

### 5.6.4 *Determinación de los niveles de glutatión*

Se determinaron los niveles de glutatión total y oxidado (GSSG) utilizando una adaptación de la técnica original descrita por Tietze (1968) para la lectura en microplaca (Baker y col., 1990). Brevemente, el glutatión reducido (GSH) reacciona

con el compuesto ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) produciendo un compuesto coloreado, ácido 5-thio-2-nitrobenzoico (TNB). Este último puede medirse espectrofotométricamente a 412 nm (máxima absorbancia).

Las suspensiones celulares provenientes de ganglio o bazo fueron preincubadas en medio RPMI 1640 sin (medio control, estándar) o con la adición al medio de cultivo de glucosa durante 24 hs. Luego,  $10 \times 10^6$  células fueron centrifugadas por 10 minutos a  $800 \times g$  y el pellet fue resuspendido en TCA 0,5 % y guardadas a  $-70^\circ\text{C}$  hasta el momento de la determinación.

Para la determinación, las muestras fueron centrifugadas a  $5000 \times g$  por 30 minutos y una fracción del sobrenadante fue utilizado para la medición de glutatión total y la fracción restante para la determinación del GSSG, incubándola por 1 hora a temperatura ambiente con una solución 1 M de 2-vinilpiridina (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) para atrapar el GSH. Paralelamente, se prepararon dos curvas estándar utilizando GSSG (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA, el que será reducido a GSH por acción de la enzima glutatión reductasa), una de las cuales fue incubada con 2-vinilpiridina. A continuación, las muestras y las curvas (50  $\mu\text{l}$ ) fueron cargadas en una microplaca de 96 pocillos y se agregó 100  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción conteniendo 0,32 mM DTNB (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA), 0,32 mM NADPH (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Alemania), buffer 36 mM  $\text{NaPO}_4$  pH 7,5 0,36 mM EDTA, y 0,138 U glutatión reductasa (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA). La absorbancia fue determinada con un lector de ELISA (BIORAD modelo 3550, Hercules, CA, EUA) a 405 nm inmediatamente luego de agregar la mezcla de reacción (tiempo 0) y cada 2 minutos hasta los 10 minutos inclusive. Los valores de las muestras fueron interpolados en la curva y la cantidad de GSH fue calculada a partir de la diferencia entre glutatión total y GSSG.

## 6 Análisis estadístico

Las diferencias entre grupos se analizaron por el análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos vías con tratamiento y tiempo o cepa y tratamiento como factores principales. Cuando la interacción fue significativa se realizó el análisis por efectos simples. Para comparar las diferencias entre grupos se realizó el post-test de Student-Newman-Keuls (SNK). La normalidad fue analizada utilizando la prueba de Shapiro Wilks, mientras que la homocedacidad fue analizada con el test de Levene. Cuando las variables no seguían una distribución normal o no cumplían con la



homocedacidad fueron transformadas con operaciones aritméticas y nuevamente fue probada la normalidad y homocedacidad. Para la producción de anticuerpos se utilizó el test no paramétrico de Kruskal Wallis debido a que la variable no es continua. Para el análisis de supervivencia, se realizaron las curvas de Kaplan-Meier y se compararon usando el test de Log-Rank. Para comparar la relación entre glucosa, corticosterona, catecolaminas y proliferación linfocitaria se calculó la correlación utilizando el coeficiente de Pearson. Todos los test fueron de dos colas y se consideró estadísticamente diferente con un  $p < 0,05$ . El análisis estadístico fue realizado utilizando los siguientes programas: GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) e Infostat (Universidad de Córdoba, Córdoba, Argentina).

# **RESULTADOS**

---

## PARTE I: RESPUESTA INMUNE EN LA DIABETES

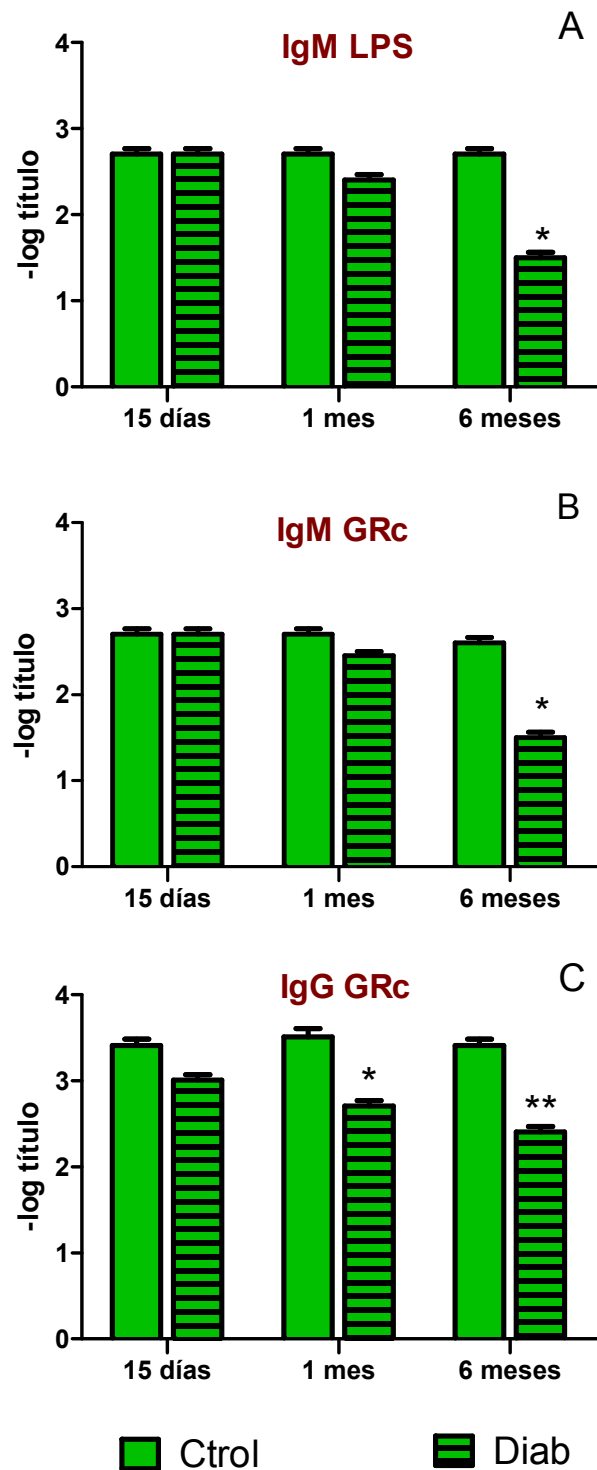
Los estudios se realizaron en ratones de la cepa BALB/cByJ cuya diabetes de tipo 1 experimental se indujo mediante la administración de múltiples dosis bajas de estreptozotocina (STZ). En este modelo de diabetes, esta cepa de ratones arriba a un estado diabético que presenta hiperglucemias leves y sostenidas (que oscilan entre 150 y 200 mg/dl) con buena sobrevida sin la necesidad de administrar insulina exógena.

La respuesta inmune se estudió tanto *in vivo* como *in vitro*. *In vivo* se investigó si el estado diabético está asociado a cambios en la producción de anticuerpos, mientras que *in vitro* se analizó la proliferación de linfocitos T y B luego de una estimulación con mitógenos selectivos para cada población.

### 1.1 Respuesta inmune *in vivo*

Se estudió la respuesta inmune en el estado diabético mediante la producción de anticuerpos luego de una inmunización con un antígeno T-dependiente (glóbulos rojos de carnero, GRc) o independiente (lipopolisacárido, LPS) luego de transcurridos 15 días, 1 mes y 6 meses desde la inducción de la patología diabética. El grupo que fue inmunizado con GRc, recibió una segunda inmunización a los once días de la primera. Luego de transcurridos 10 y 7 días de la primera y segunda inmunizaciones respectivamente, se extrajo el suero y utilizando la técnica de ELISA, se midió la producción de anticuerpos. Se determinó el título de IgM, para la primera inmunización con GRc y para la inmunización con LPS (respuesta primaria) e IgG para la segunda inmunización con GRc (respuesta secundaria).

Se observó una disminución en la producción de anticuerpos de tipo IgM a los seis meses de inducido el estado diabético, tanto al inmunizar con GRc como así también con LPS (figura 11). Cuando se evaluó la producción de IgG (realizando una segunda inmunización con GRc), la disminución en la producción de anticuerpos se observó más tempranamente: al mes de inducido el estado diabético (Test de Kruskal Wallis. IgM LPS:  $H(6)=20,48$ ;  $p=0,0003$ ; IgM GRc:  $H(6)=19,69$ ;  $p=0,0004$ ; IgG GRc:  $H(6)=28,27$ ;  $p<0,0001$ ).



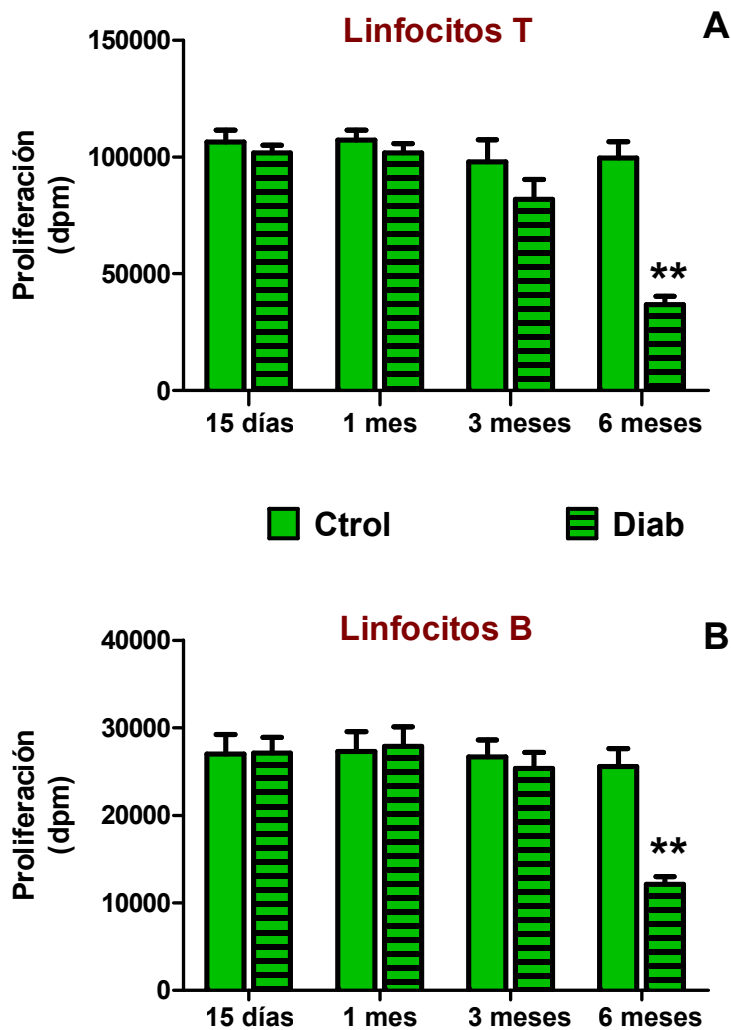
**Figura 11: Título de anticuerpos producidos en función del tiempo transcurrido luego de la inducción del estado diabético.**

Se midió la producción de anticuerpos en ratones BALB/cByJ normales, con 15 días, 1 y 6 meses de diabetes. **Panel A:** producción de IgM anti-LPS. **Panel B:** producción de IgM anti-GRc. **Panel C:** producción de IgG anti-GRc. Los resultados refieren al logaritmo de la última dilución del suero que da reacción positiva, son el promedio  $\pm$  ES realizado con el suero de 6 animales en cada grupo. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  respecto del control.

## 1.2 Respuesta inmune *in vitro*

Para evaluar la respuesta inmune *in vitro* se estudió la proliferación linfocitaria. Poblaciones linfocitarias provenientes de ganglio (linfocitos T) y de bazo (linfocitos B) fueron estimulados con mitógenos selectivos para cada población. Para los linfocitos T se utilizó concanavalina A (Con A) y para linfocitos B se usó lipopolisacárido (LPS). Se midió la proliferación linfocitaria a través de la incorporación de timidina-<sup>3</sup>H. La máxima proliferación se obtuvo con 1 µg/ml de Con A y 25 µg/ml de LPS para todos los grupos estudiados.

El análisis comparativo de los resultados obtenidos (figura 12) permitió evidenciar una disminución de la respuesta proliferativa tanto de linfocitos T como B a partir de los seis meses de inducido el estado diabético (ANOVA de dos vías para muestras no apareadas, respuesta proliferativa T: efectos principales: interacción tratamiento x tiempo  $F(3, 40)=10,2$ ;  $p<0,0001$ ; análisis efectos simples: 15 días  $F(1, 40)=0,28$ ;  $p$  no significativo; 1 mes  $F(1, 40)=0,39$ ;  $p$  no significativo; 3 meses  $F(1, 40)=3,43$ ;  $p$  no significativo; 6 meses  $F(1, 40)=52,92$ ;  $p<0,0001$ . ANOVA de dos vías para muestras no apareadas, respuesta proliferativa B: efectos principales: interacción tratamiento x tiempo  $F(3, 40)=4,54$ ;  $p=0,0079$ ; análisis por efectos simples: 15 días  $F(1, 40)=0,002$ ;  $p$  no significativo; 1 mes  $F(1, 40)=1,24$ ;  $p$  no significativo; 3 meses  $F(1, 40)=0,21$ ;  $p$  no significativo; 6 meses  $F(1, 40)=18,41$ ;  $p=0,0001$ ).



**Figura 12: Proliferación de linfocitos T y B en función del tiempo transcurrido luego de la inducción del estado diabético.**

**Panel A:** Linfocitos T estimulados con 1  $\mu\text{g/ml}$  de Con A. **Panel B:** Linfocitos B estimulados con 25  $\mu\text{g/ml}$  de LPS. Los resultados expresan la media  $\pm$  ES de seis animales en cada grupo. \*\* $p < 0,01$  respecto al valor control, células provenientes del ratón normal.

## PARTE II: EFECTO DEL ESTRÉS EN LA INSTAURACIÓN Y EVOLUCIÓN DE LA DIABETES

Para estudiar el efecto del estrés sobre la instauración y evolución de la diabetes, se utilizaron dos modelos de estrés, uno homotrópico, como es el estrés por inmovilización y otro heterotrópico como es el modelo de estrés crónico moderado en ratones de la cepa BALB/cByJ.

La exposición a estrés se realizó previa y posteriormente a la instauración de la diabetes. Se evaluó la variación de la glucemia, del peso y los valores de hemoglobina glicosilada sobre cada grupo de animales.

### 2.1 Efecto del estrés previo a la instauración de la diabetes

#### 2.1.1 *Estrés crónico por inmovilización*

Los animales fueron inmovilizados durante 6 horas por día durante un período de 21 días consecutivos. Finalizado este tratamiento, se les realizó la inducción de la diabetes y se midieron las glucemias y los pesos a partir de la segunda semana desde que se inició el tratamiento con STZ. Se determinaron los niveles de hemoglobina glicosilada al final del tratamiento.

En la figura 13 se observa un aumento en las glucemias en los animales diabéticos con respecto al control y un aumento aún mayor en los ratones estresados y diabéticos (CRS + Diab) luego de 8 semanas de inducida la diabetes. Los valores de hemoglobina glicosilada fueron coincidentes con el aumento en las glucemias. No se observaron variaciones en los pesos (Glucemias: ANOVA de dos vías apareado en el tiempo: efectos principales: interacción tratamiento x semanas  $F(9, 129)=1,98$ ;  $p=0,046$ . Análisis por efectos simples: semana 2:  $F(1, 106)=4,88$ ;  $p=0,0292$ ;

semana 4:  $F(1, 106)=13,32$ ;  $p=0,0004$ ;

semana 6:  $F(1, 106)=9,41$ ;  $p=0,0027$ ;

semana 8:  $F(1, 106)=28,64$ ;  $p<0,0001$ ;

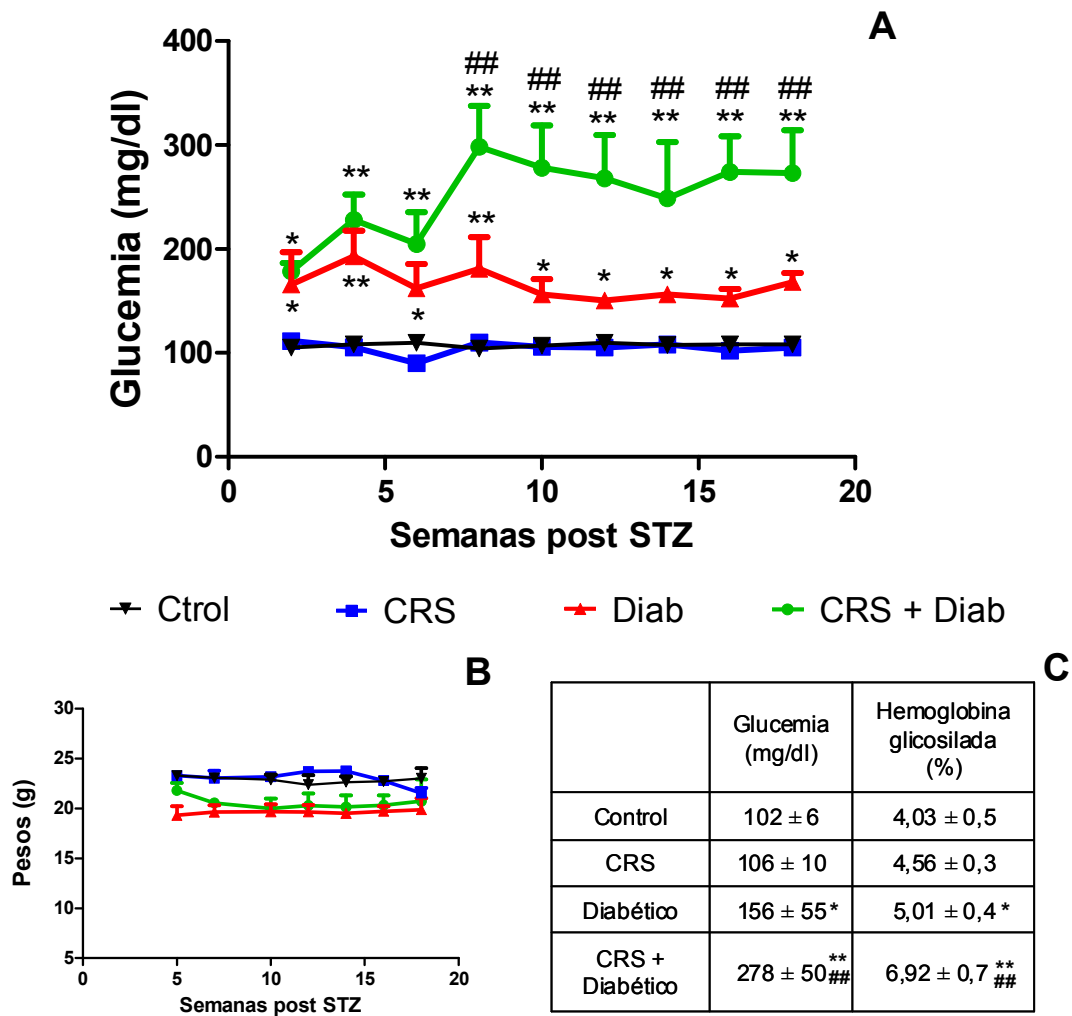
semana 10:  $F(1, 106)=22,95$ ;  $p<0,0001$ ;

semana 12:  $F(1, 106)=20,25$ ;  $p<0,0001$ ;

semana 14:  $F(1, 106)=15,44$ ;  $p=0,0002$ ;

semana 16:  $F(1, 106)=22,41$ ;  $p<0,0001$ ;

semana 18:  $F(1, 106)=21,65$ ;  $p<0,0001$ ).



**Figura 13: Efecto del CRS previo a la inducción del estado diabético.**

**Panel A:** Se determinaron las glucemias en función de las semanas post tratamiento con STZ en los animales controles, expuestos a CRS, diabéticos y CRS + diabetes. **Panel B:** Pesos (en gramos) en función de las semanas post tratamiento con STZ. **Panel C:** Valores de hemoglobina glicosilada. Los datos mostrados representan la media ± ES de diez animales en cada grupo. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  respecto al valor control, ##  $p < 0,01$  respecto al valor diabético.

### 2.1.2 Estrés crónico moderado

Los animales fueron expuestos a estrés crónico moderado (CMS) durante seis semanas. Finalizado este periodo, se realizó la inducción de la diabetes y se midieron las glucemias y los pesos a partir de la segunda semana desde que se inició el tratamiento con STZ. Se determinaron los niveles de hemoglobina glicosilada al final del tratamiento.

Los resultados mostraron (figura 14) un aumento en las glucemias en los animales diabéticos con respecto al control. Sin embargo, en los ratones estresados y diabéticos (CMS + Diab) los niveles de glucemia fueron similares al diabético. Los valores de hemoglobina glicosilada fueron coincidentes con el aumento en las



glucemias. No se observaron variaciones en los pesos (Glucemias: ANOVA de dos vías apareado en el tiempo: efectos principales: interacción tratamiento x semanas  $F(22, 327)=2,75$ ;  $p<0,0001$ . Análisis por efectos simples: semana 2:  $F(2, 330)=16,54$ ;  $p<0,0001$ ; semana 4:  $F(2, 330)=22,15$ ;  $p<0,0001$ ;

semana 6:  $F(2, 330)=31,94$ ;  $p<0,0001$ ;

semana 8:  $F(2, 330)=36,50$ ;  $p<0,0001$ ;

semana 10:  $F(2, 330)=38,91$ ;  $p<0,0001$ ;

semana 12:  $F(2, 330)=24,44$ ;  $p<0,0001$ ;

semana 14:  $F(2, 330)=19,12$ ;  $p<0,0001$ ;

semana 16:  $F(2, 330)=22,89$ ;  $p<0,0001$ ;

semana 18:  $F(2, 330)=40,85$ ;  $p<0,0001$ ).

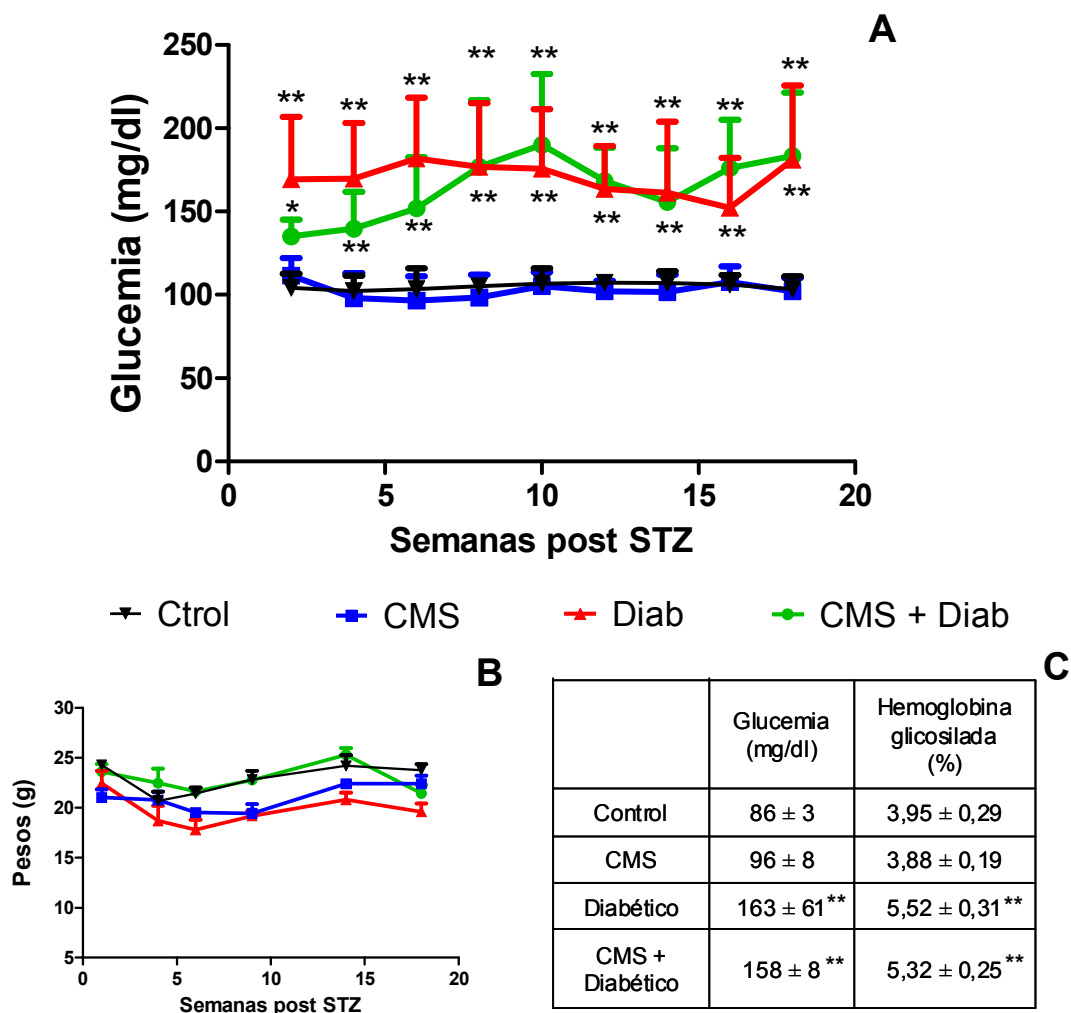


Figura 14: Efecto del CMS previo a la inducción del estado diabético.

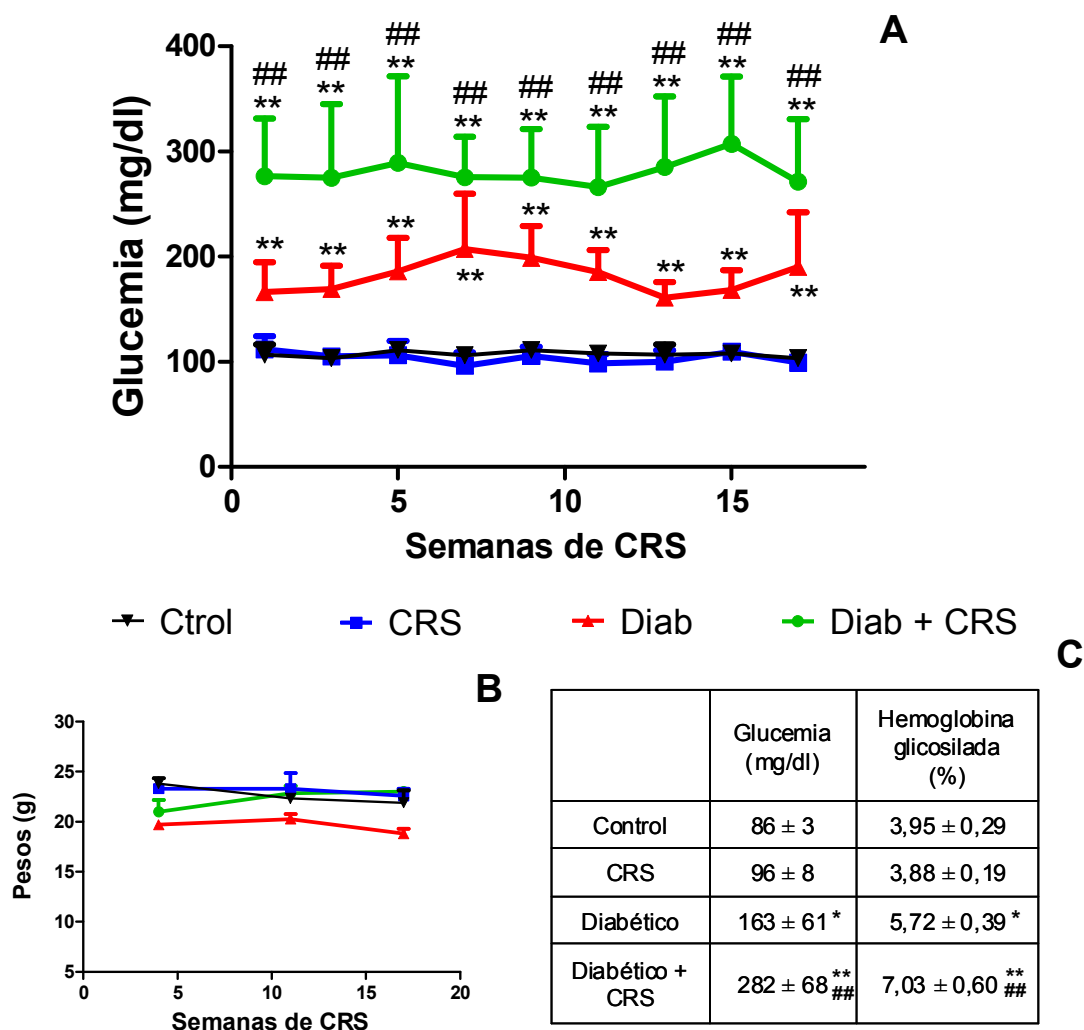
**Panel A:** Se determinaron las glucemias en función de las semanas post tratamiento con STZ en los animales controles, expuestos a CMS, diabéticos y CMS + diabéticos. **Panel B:** Pesos (en gramos) en función de las semanas post tratamiento con STZ. **Panel C:** Valores de hemoglobina glicosilada. Los datos mostrados representan la media ± ES de diez animales en cada grupo. \* $p<0,05$  y \*\* $p<0,01$  respecto al valor control.

## **2.2 Efecto del estrés posterior a la instauración de la diabetes**

### **2.2.1 Estrés crónico por inmovilización**

Se realizó la inducción de la diabetes y seguidamente los animales fueron expuestos a CRS durante 21 días consecutivos. Se midieron las glucemias y los pesos a partir de la segunda semana desde que se inició el tratamiento con STZ, semana que corresponde a la primera de CRS. Se determinaron los niveles de hemoglobina glicosilada al final del tratamiento.

En la figura 15, se observa un aumento en las glucemias en los animales diabéticos con respecto al control y un aumento aún mayor en los ratones diabéticos y estresados (Diab + CRS) a partir de la primera semana de CRS. Los valores de hemoglobina glicosilada fueron coincidentes con el aumento en las glucemias. No se observaron variaciones en los pesos (Glucemias: ANOVA de dos vías apareado en el tiempo: efectos principales: tratamiento:  $F(2, 30)=449,17$ ;  $p<0,0001$ ; semanas:  $F(5, 241)=0,78$ ;  $p$  no significativo; interacción tratamiento x semanas  $F(16, 241)=1,24$ ;  $p$  no significativo).



**Figura 15: Efecto del CRS luego de la inducción del estado diabético.**

**Panel A:** Se determinaron las glucemias en función de las semanas post iniciado el CRS en los animales controles, expuestos a CRS, diabéticos y diabéticos + CRS. **Panel B:** Pesos (en gramos) en función de las semanas post iniciado el CRS. **Panel C:** Valores de hemoglobina glicosilada. Los datos mostrados representan la media ± ES de diez animales en cada grupo. \*\* $p < 0,01$  respecto al valor control, ##  $p < 0,01$  respecto al valor diabético.

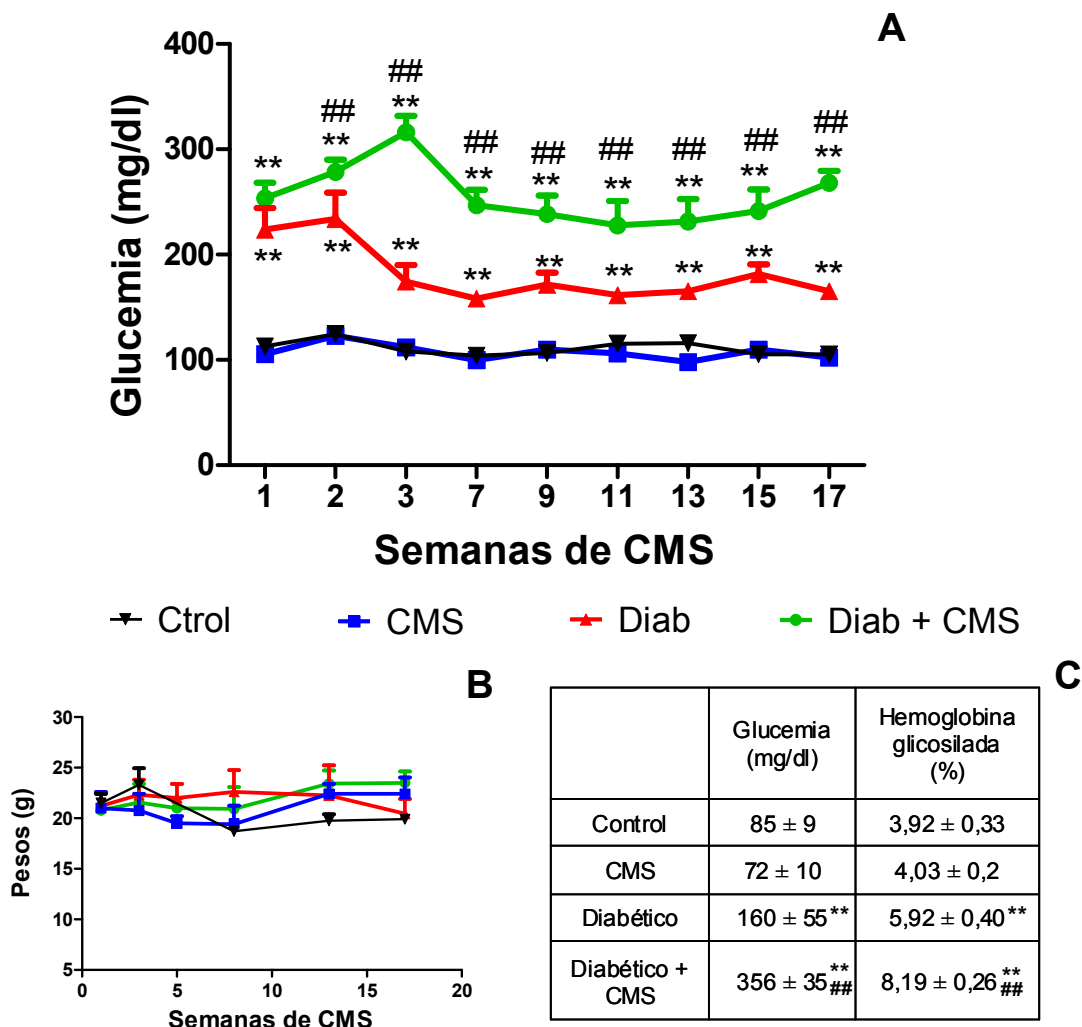
### 2.2.2 Estrés crónico moderado

Con posterioridad a la inducción de la diabetes, los animales fueron expuestos a CMS durante todo el tiempo experimental. Se midieron las glucemias y los pesos a partir de la segunda semana desde que se inició el tratamiento con STZ, semana que corresponde a la primera de CMS. Se determinaron los niveles de hemoglobina glicosilada al final del tratamiento.

Los resultados mostraron (figura 16) un aumento en las glucemias en los animales diabéticos con respecto al control. En los ratones diabéticos y estresados (Diab + CMS) los niveles de glucemia fueron aún mayores que en los diabéticos a partir de la segunda semana de CMS. Los valores de hemoglobina glicosilada fueron

coincidentes con el aumento en las glucemias. No se observaron variaciones en los pesos (Glucemias: ANOVA de dos vías apareado en el tiempo; interacción tratamiento x semanas  $F(15, 302)=3,66$ ;  $p<0,0001$ . Análisis por efectos simples: semana 1:  $F(1, 228)=45,98$ ;  $p<0,0001$ ; semana 2:  $F(1, 228)=49,33$ ;  $p<0,0001$ ;

semana 3:  $F(1, 228)=75,52$ ;  $p<0,0001$ ;  
semana 7:  $F(1, 228)=37,51$ ;  $p<0,0001$ ;  
semana 9:  $F(1, 228)=30,94$ ;  $p<0,0001$ ;  
semana 11:  $F(1, 228)=24,69$ ;  $p<0,0001$ ;  
semana 13:  $F(1, 228)=28,57$ ;  $p<0,0001$ ;  
semana 15:  $F(1, 228)=33,59$ ;  $p<0,0001$ ;  
semana 17:  $F(1, 228)=48,12$ ;  $p<0,0001$ ).



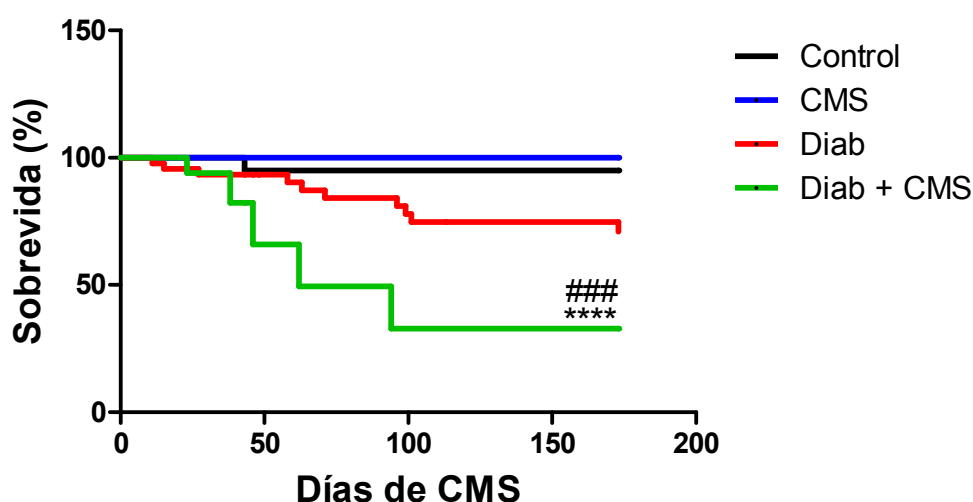
**Figura 16: Efecto del CMS luego de la inducción del estado diabético.**

**Panel A:** Se determinaron las glucemias en función de las semanas de CMS en los animales controles, sometidos a CMS, diabéticos y diabéticos + CMS. **Panel B:** Pesos (en gramos) en función de las semanas de CMS. **Panel C:** Valores de hemoglobina glicosilada. Los datos mostrados representan la media ± ES de diez animales en cada grupo. \*\* $p<0,01$  respecto al valor control, ##  $p<0,01$  respecto al valor diabético.

### 2.2.2.1 Sobrevida

Los siguientes estudios se realizaron en los animales expuestos a estrés posterior a la instauración del estado diabético debido a que el estrés mostró una influencia sobre la evolución de la patología diabética. Se eligió para trabajar el modelo de CMS ya que se asemeja al tipo de estrés al que se ve sometido el hombre en su vida diaria, a saber estresores de intensidad moderada recibidos de manera aleatoria, impredecible y crónica. Sobre este grupo de animales se analizó la sobrevida a lo largo del tiempo.

El análisis de sobrevida se realizó comparando las curvas de Kaplan-Meier con el análisis de LogRank. Dicho análisis reveló la existencia de diferencias significativas entre los grupos estudiados ( $\chi^2=20,09$ ;  $p=0,0002$ ). Los resultados se muestran en la figura 17, donde se observa una disminución en la sobrevida para los animales Diab + CMS (vs. control:  $\chi^2=16,81$ ;  $p<0,0001$ ; vs. diabéticos:  $\chi^2=12,55$ ;  $p=0,0004$ ) sin verse disminuida la sobrevida para los animales diabéticos (vs. control:  $\chi^2=2,945$ ;  $p$  no significativo) ni para los CMS (vs. control:  $\chi^2=0,8143$ ;  $p$  no significativo), sugiriendo una peor prognosis cuando el animal diabético es expuesto a CMS.



**Figura 17: Efecto del estrés y la diabetes en la sobrevida.**

Porcentaje de sobrevida en función de los días de CMS. Los datos mostrados representan la media  $\pm$  ES de 10 animales en cada grupo. \*\*\*\* $p<0.0001$  respecto a animales controles, y #### $p<0.001$  respecto a animales diabéticos.

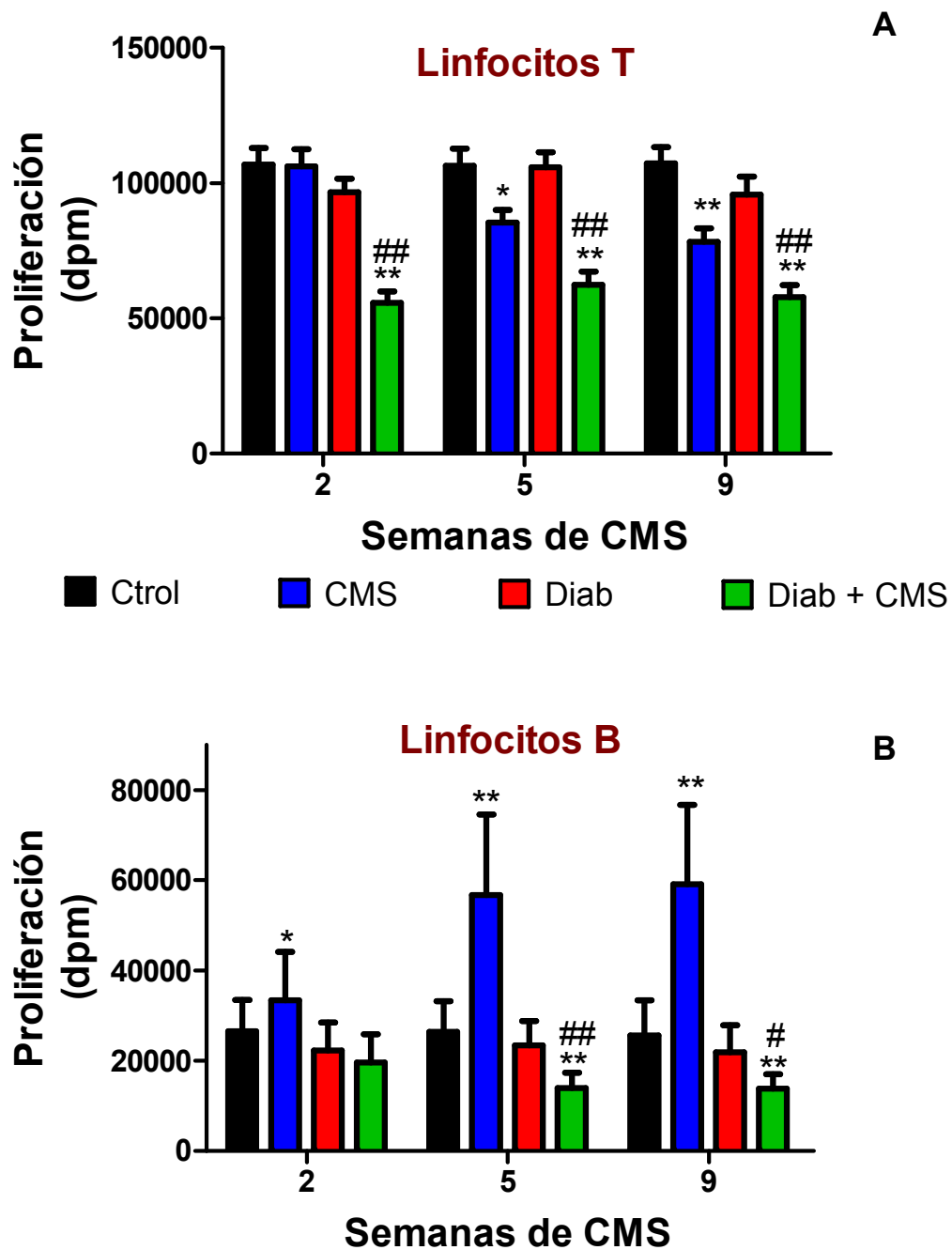
## **PARTE III: EFECTO DEL ESTRÉS Y LA DIABETES EN LA RESPUESTA INMUNE: MEDIADORES NEUROENDOCRINOS INVOLUCRADOS.**

Con el fin de determinar el efecto del estrés y la diabetes en la respuesta inmune y los mediadores involucrados se analizó la respuesta proliferativa, los niveles de insulina y los mediadores neuroendocrinos del estrés como son la corticosterona y las catecolaminas en los animales diabéticos de la cepa BALB/cByJ expuestos a CMS.

### **3.1 Estudio de la proliferación linfocitaria**

Con el fin de evaluar si el estrés crónico moderado y el estado diabético afectan la respuesta inmune, se analizó la proliferación linfocitaria estimulada por mitógenos selectivos para cada población.

En la figura 18 podemos observar que los animales diabéticos expuestos a CMS presentan una disminución de la proliferación de linfocitos T y B a partir de la segunda y quinta semana de CMS, respectivamente, hecho que no se observa en los animales diabéticos. Cabe recordar que dichos animales presentaron una disminución de la proliferación linfocitaria luego de seis meses de inducido el estado diabético (ver figura 12). Con respecto a los animales con CMS, estos presentan una disminución en la proliferación de linfocitos T a partir de la quinta semana de CMS y un aumento en la proliferación de linfocitos B a partir de la segunda semana de CMS (ANOVA de dos vías para muestras no apareadas, repuesta proliferativa T: efectos principales: interacción tratamiento x semanas  $F(6, 96)=2,45$ ,  $p=0,0301$ ; análisis por efectos simples: 2<sup>da</sup> semana  $F(3, 96)=19,29$ ,  $p<0,0001$ ; 5<sup>ta</sup> semana  $F(3, 96)=14,33$ ,  $p<0,0001$ ; 9<sup>na</sup> semana  $F(3, 96)=15,33$ ,  $p<0,0001$ ; ANOVA de dos vías para muestras no apareadas, repuesta proliferativa B: efectos principales: interacción tratamiento x semanas  $F(6, 96)=2,51$ ,  $p=0,0267$ ; análisis por efectos simples: 2<sup>da</sup> semana  $F(3, 96)=2,93$ ,  $p=0,0372$ ; 5<sup>ta</sup> semana  $F(3, 96)=18,25$ ,  $p<0,0001$ ; 9<sup>na</sup> semana  $F(3, 96)=19,87$ ,  $p<0,0001$ ).



**Figura 18: Respuesta proliferativa de linfocitos T y B.**

Poblaciones linfocitarias provenientes de todos los grupos de animales a diferentes tiempos de CMS (2, 5 y 9 semanas) fueron estimuladas Con A (1 µg/ml, **panel A**) y LPS (25 µg/ml, **panel B**). Los resultados mostrados son el promedio ± ES de nueve animales en cada grupo. \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  respecto a animales controles. # $p < 0.05$  y ## $p < 0.01$  respecto a animales diabéticos.

### 3.2 Estudio sobre los niveles de corticosterona y catecolaminas

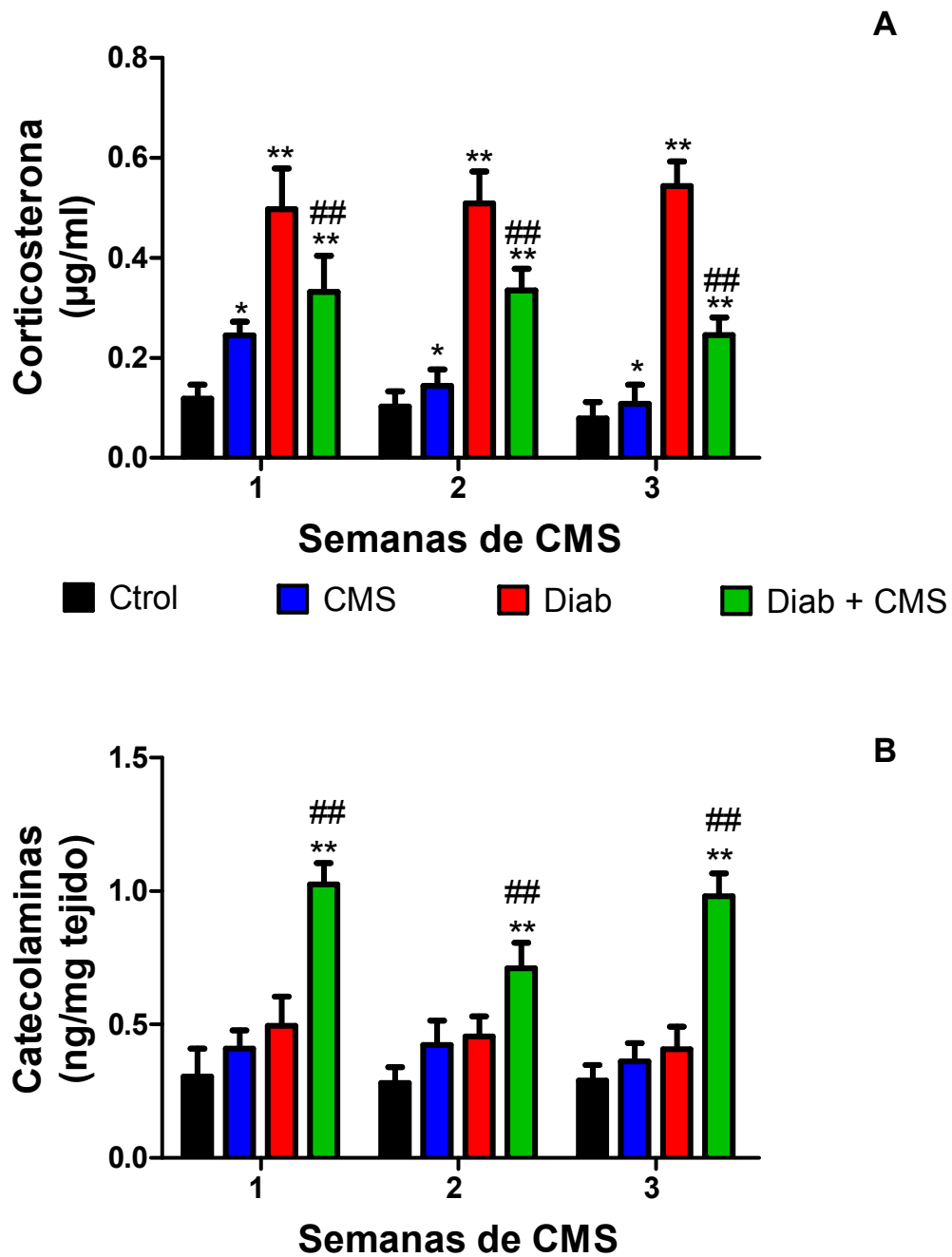
Para evaluar si la activación temprana del eje HPA y del sistema nervioso simpático (SNS) está involucrada en la evolución negativa de los ratones diabéticos expuestos a CMS (disminución de la supervivencia y disminución de la proliferación

linfocitaria) se determinó la concentración plasmática de corticosterona y los niveles de catecolaminas en el bazo debido a la importante inervación simpática que presenta este órgano (Hori y *col.*, 1995; Kim y *col.*, 2004).

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 19, donde se observa un aumento en los niveles de corticosterona en los ratones expuestos a CMS. Por otro lado, los ratones diabéticos presentaron niveles de corticosterona mayores que los controles. Sin embargo, los ratones diabéticos expuestos a CMS tuvieron un incremento en los niveles de corticosterona menor que el observado en los diabéticos (ANOVA de dos vías para muestras no apareadas, efectos principales: tratamiento:  $F(3, 132)=43,79$ ,  $p<0,0001$ ; semanas:  $F(2, 132)=2,14$ ,  $p$  no significativo; interacción tratamiento x semanas:  $F(6, 132)=1,21$ ,  $p$  no significativo).

En cuanto a las catecolaminas (figura 19 panel B), las mismas se encontraron incrementadas sólo en los ratones diabéticos expuestos a CMS (ANOVA de dos vías para muestras no apareadas, efectos principales tratamiento:  $F(6, 132)=31,67$ ,  $p<0,0001$ ; semanas:  $F(2, 132)=1,19$ ,  $p$  no significativo; interacción tratamiento x semanas:  $F(6, 132)=1,15$ ,  $p$  no significativo).





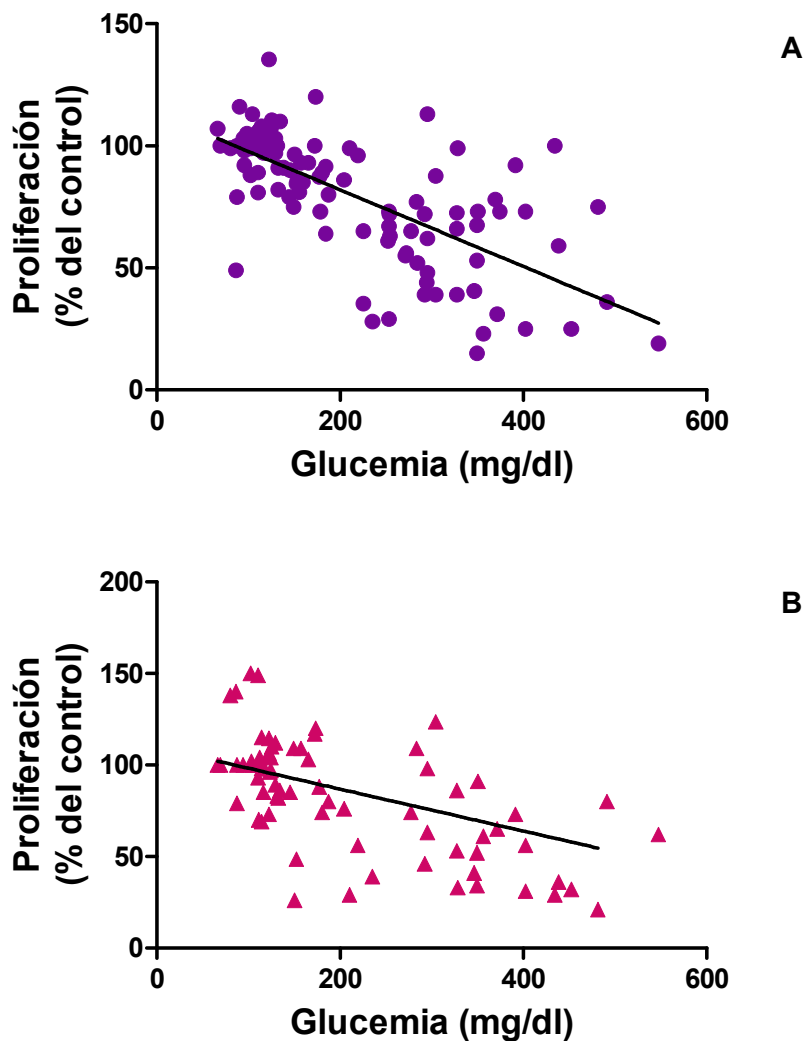
**Figura 19: Determinación de los niveles de corticosterona y catecolaminas.**

Se obtuvieron el plasma y los bazos de todos los grupos de animales a diferentes tiempos de CMS (1, 2 y 3 semanas) y se determinaron los niveles de corticosterona (**panel A**) y de catecolaminas (**panel B**). Los resultados mostrados son el promedio  $\pm$  ES de doce animales en cada grupo a cada tiempo. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  respecto a animales controles. ## $p < 0,01$  respecto a animales diabéticos.

### 3.3 Correlación entre los niveles de glucemias, corticosterona o catecolaminas y la proliferación linfocitaria

Para evaluar si la disminución en la respuesta proliferativa en los animales Diab + CMS estaba asociada con los cambios en los niveles de glucemia, corticosterona o

catecolaminas se analizó la correlación existente entre estos parámetros (figura 20), hallándose sólo una correlación positiva entre la glucemia y la proliferación tanto de linfocitos T como B. Para linfocitos T se correlacionó la proliferación de la 2°, 5° y 9° semanas de CMS, mientras que para linfocitos B se correlacionó la 5° y 9° semanas de CMS que corresponden a aquellas donde se observó una disminución en la respuesta proliferativa para los animales Diab + CMS (Glucemia vs. proliferación: respuesta proliferativa T  $r=-0,6822$ ,  $p<0,0001$ ; respuesta proliferativa B  $r=-0,6286$ ,  $p<0,0001$ . Corticosterona vs. proliferación: respuesta proliferativa T  $r=-0,1702$ ,  $p$  no significativo; respuesta proliferativa B  $r=-0,1170$ ,  $p$  no significativo. Catecolaminas vs. proliferación: respuesta proliferativa T  $r=-0,1321$ ,  $p$  no significativo; respuesta proliferativa B  $r=-0,1534$ ,  $p$  no significativo).



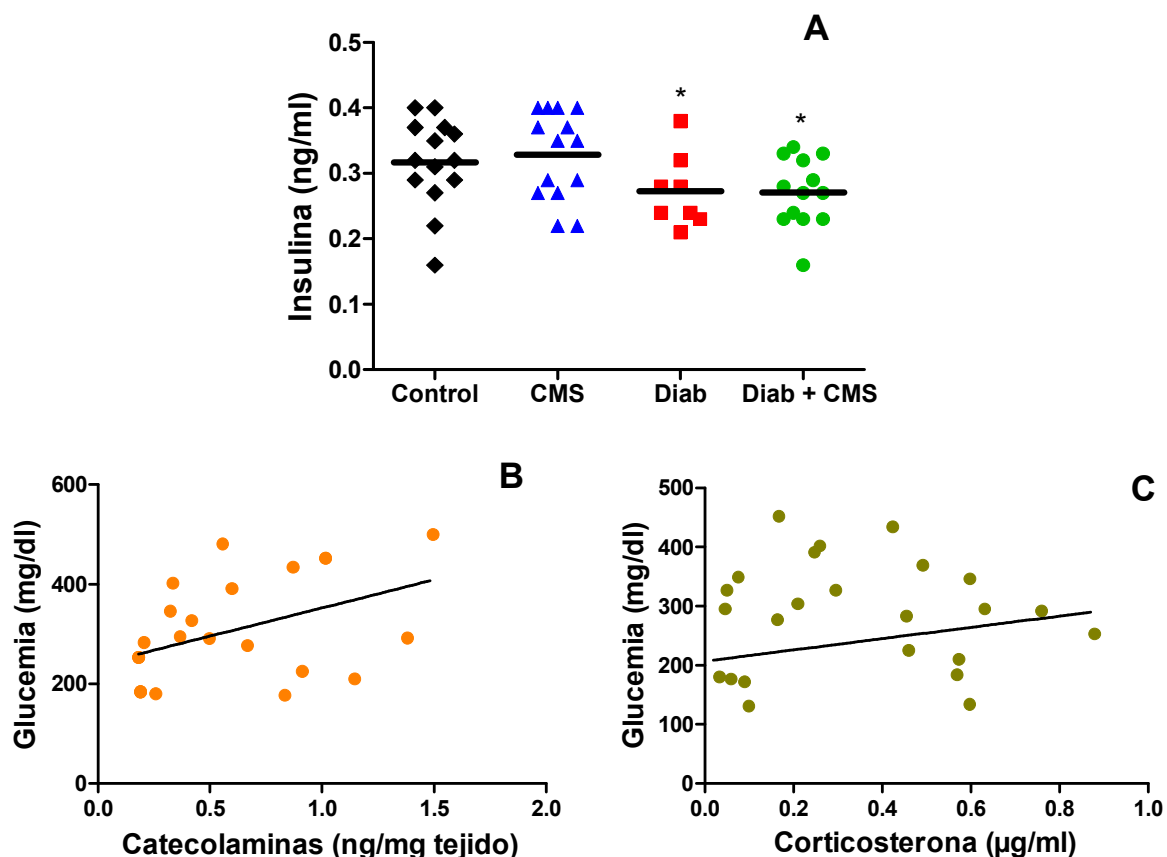
**Figura 20: Análisis de correlación.**

Correlación entre los niveles de glucemia y la respuesta proliferativa de linfocitos provenientes de ganglio (panel A,  $n=108$ ) y de bazo (panel B,  $n=72$ ) de todos los grupos experimentales.

### 3.4 Correlación entre los niveles de insulina, corticosterona o catecolaminas y la glucemia.

Dado que la glucemia es regulada por la secreción de insulina, se determinaron sus niveles en los cuatro grupos experimentales en la 3<sup>o</sup> semana de CMS. Los resultados mostraron una disminución en los animales diabéticos (figura 21, panel A), mientras que el CMS no modificó los niveles de insulina. De esta manera, en los animales Diab + CMS no se observaron diferencias con respecto a los diabéticos (ANOVA de una vía para muestras no apareadas  $F(3, 36) = 4,813$ ;  $p = 0,0039$ ).

Con el fin de determinar si el mayor incremento en la glucemia observado en de los animales diabéticos expuestos a CMS podía deberse a los cambios en corticosterona o en catecolaminas, se evaluó la correlación de estos parámetros. Sólo se encontró (figura 21, panel B) una correlación positiva y significativa entre la glucemia y los niveles de catecolaminas ( $r = 0,4432$ ,  $p = 0,0342$ ) y no entre la glucemia y la corticosterona ( $r = 0,3207$ , no significativo).



**Figura 21: Determinación de los niveles de insulina y correlación entre catecolaminas y glucemias.** **Panel A:** Se obtuvo el plasma de animales de cada grupo en la 3ra semana de CMS y se determinaron los niveles de insulina. Cada punto representa 1 animal y la línea representa el promedio del grupo. \* $p < 0.05$  respecto a animales controles. **Panel B:** Correlación entre las catecolaminas y la glucemia solo para animales diabéticos. **Panel C:** Correlación entre la corticosterona y la glucemia solo para animales diabéticos.

## PARTE IV: PARTICIPACIÓN DEL CONDICIONAMIENTO GENÉTICO. ESTUDIO SOBRE LA CEPA C57Bl/6J.

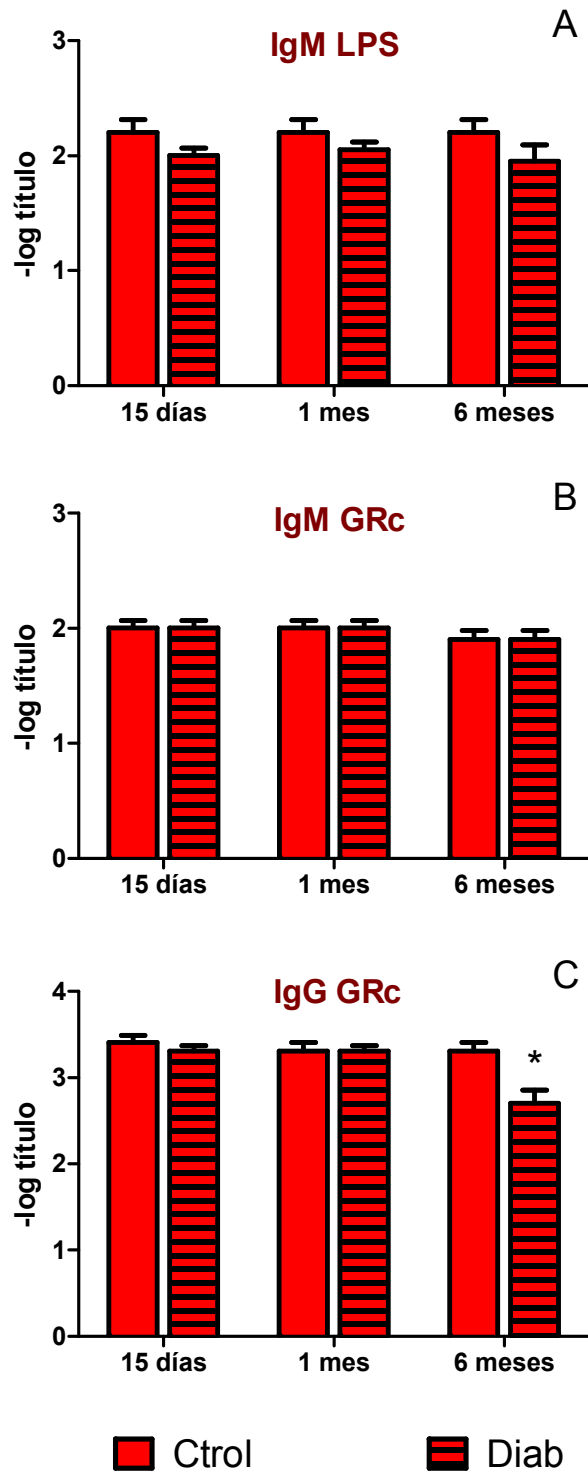
Con el fin de estudiar la participación del condicionamiento genético en los efectos observados se utilizaron animales de la cepa C57Bl/6J a los que se les indujo la diabetes experimental a través de la administración de STZ. En esta cepa de ratones observamos glucemias mayores que en los BALB/cByJ (glucemias diabéticos BALB/cByJ entre 150 y 200 mg/dl; glucemias diabéticos C57Bl/6J entre 160 y 300 mg/dl) pero que, sin embargo, mantienen una buena sobrevida sin la necesidad de administrar insulina exógena.

### 4.1 Respuesta inmune en la diabetes

La respuesta inmune se estudió tanto *in vivo* como *in vitro*. *In vivo* se estudió si el estado diabético está asociado a cambios en la producción de anticuerpos, mientras que *in vitro* se analizó la proliferación de linfocitos T y B luego de una estimulación con mitógenos selectivos para cada población.

#### 4.1.1 Respuesta inmune *in vivo*

Los animales controles y diabéticos de la cepa C57Bl/6J fueron inmunizados con un antígeno T-dependiente (GRc) o independiente (LPS) y se analizó la producción de anticuerpos *in vivo* luego de transcurridos 15 días, 1 mes y 6 meses desde la inducción de la diabetes. Se determinó el título de IgM, para la primera inmunización con GRc y para la inmunización con LPS (respuesta primaria) e IgG para la segunda inmunización con GRc (respuesta secundaria). Sólo se observó una disminución en la producción de IgG a los seis meses de inducido el estado diabético (figura 22, Test de Kruskal Wallis. IgM LPS:  $H(6)=5,85$ ; no significativo. IgM GRc:  $H(6)=1,8$ ;  $p$  no significativo. IgG GRc:  $H(6)=12,13$ ;  $p=0,0155$ ).

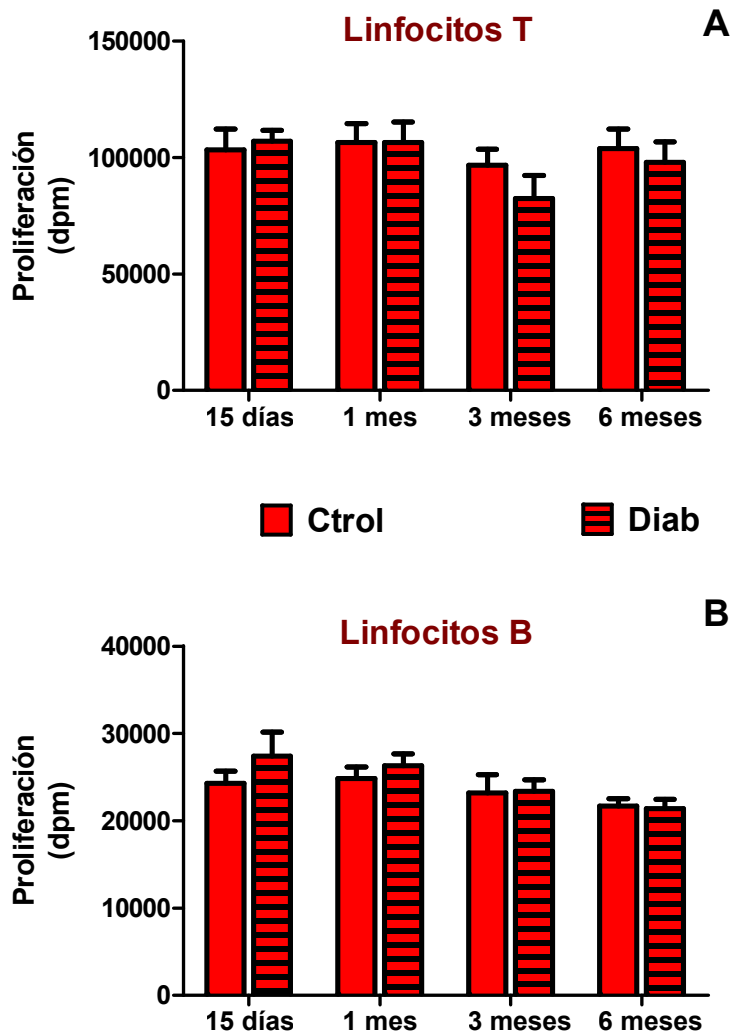


**Figura 22:** Título de anticuerpos producidos en función del tiempo transcurrido luego de la inducción del estado diabético.

Se midió la producción de anticuerpos en ratones C57Bl/6J normales, con 15 días, 1 y 6 meses de diabetes. **Panel A:** producción de IgM anti-LPS. **Panel B:** producción de IgM anti-GRc. **Panel C:** producción de IgG anti-GRc. Los resultados refieren al logaritmo de la última dilución del suero que da reacción positiva, son el promedio  $\pm$  ES realizado con el suero de 6 animales en cada grupo. \* $p < 0.05$  respecto del control.

4.1.2 *Respuesta inmune in vitro*

La respuesta inmune *in vitro* se estudió mediante el análisis de la proliferación linfocitaria estimulada por mitógenos selectivos para cada población. Los resultados obtenidos (figura 23) no mostraron disminución en la proliferación aún luego de seis meses de diabetes (ANOVA de dos vías para muestras no apareadas, respuesta proliferativa T: efectos principales: tratamiento  $F(1, 40)=0,04$ ;  $p$  no significativo; tiempo  $F(3, 40)=0,4$ ;  $p$  no significativo; interacción tratamiento x tiempo  $F(3, 40)=0,18$ ;  $p$  no significativo. Respuesta proliferativa B: efectos principales: tratamiento  $F(1, 40)=0,35$ ;  $p$  no significativo; tiempo  $F(3, 40)=0,96$ ;  $p$  no significativo; interacción tratamiento x tiempo  $F(3, 40)=0,18$ ;  $p$  no significativo).



**Figura 23: Proliferación de linfocitos T y B en función del tiempo transcurrido luego de la inducción del estado diabético.**

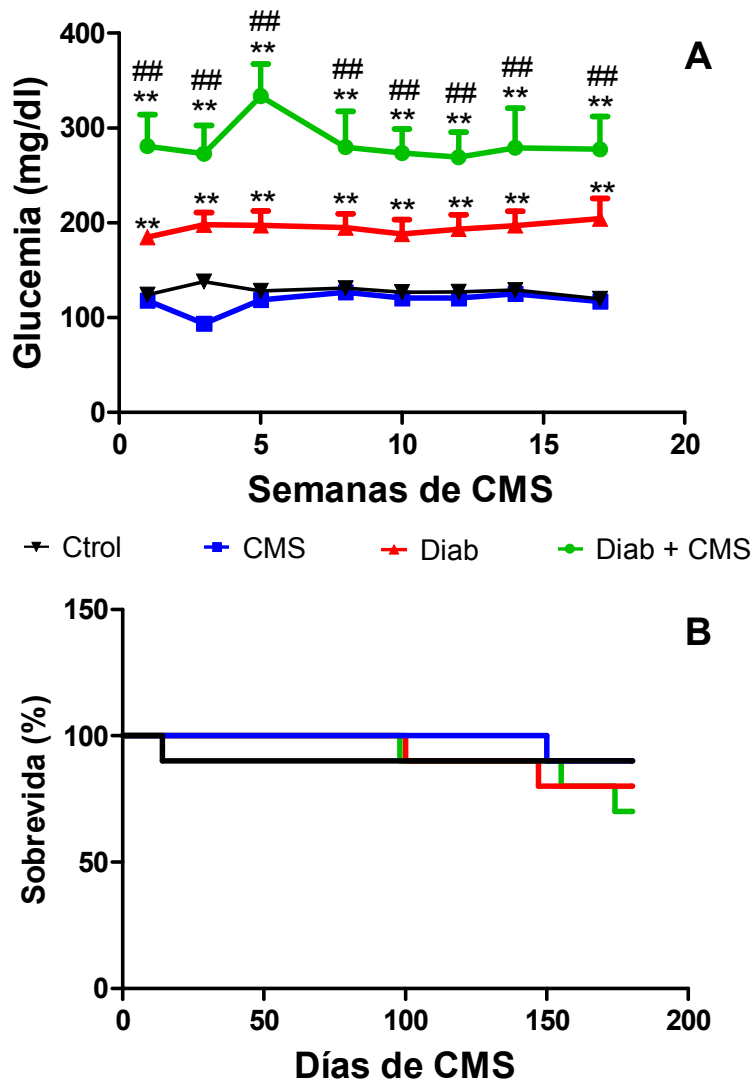
**Panel A:** Linfocitos T estimulados con 1  $\mu\text{g/ml}$  de Con A. **Panel B:** Linfocitos B estimulados con 25  $\mu\text{g/ml}$  de LPS. Los resultados expresan la media  $\pm$  ES de seis animales en cada grupo.

**4.2 Efecto del estrés en la evolución de la diabetes.**

Con el objetivo de estudiar el efecto del estrés sobre la evolución del estado diabético, animales de la cepa C57Bl/6J fueron tratados con STZ y luego expuestos a CMS de igual manera que se realizó con los ratones de la cepa BALB/cByJ.

En la figura 24, panel A puede observarse el incremento en los valores de glucemia de los animales diabéticos y que éste es aún mayor cuando los animales diabéticos fueron expuestos a CMS (ANOVA de dos vías apareado en el tiempo; efectos principales: tratamiento  $F(2, 26)=23,4$ ;  $p<0,0001$ ; semanas  $F(7, 21)=1,41$ ;  $p$  no significativo; interacción tratamiento x semanas  $F(12, 185)=0,12$ ;  $p$  no significativo).

Al analizar la sobrevida en función del tiempo, los resultados no mostraron cambios significativos (figura 24, panel B; curvas de Kaplan-Meyer con análisis de LogRank:  $\chi^2=1,681$ ,  $p$  no significativo).



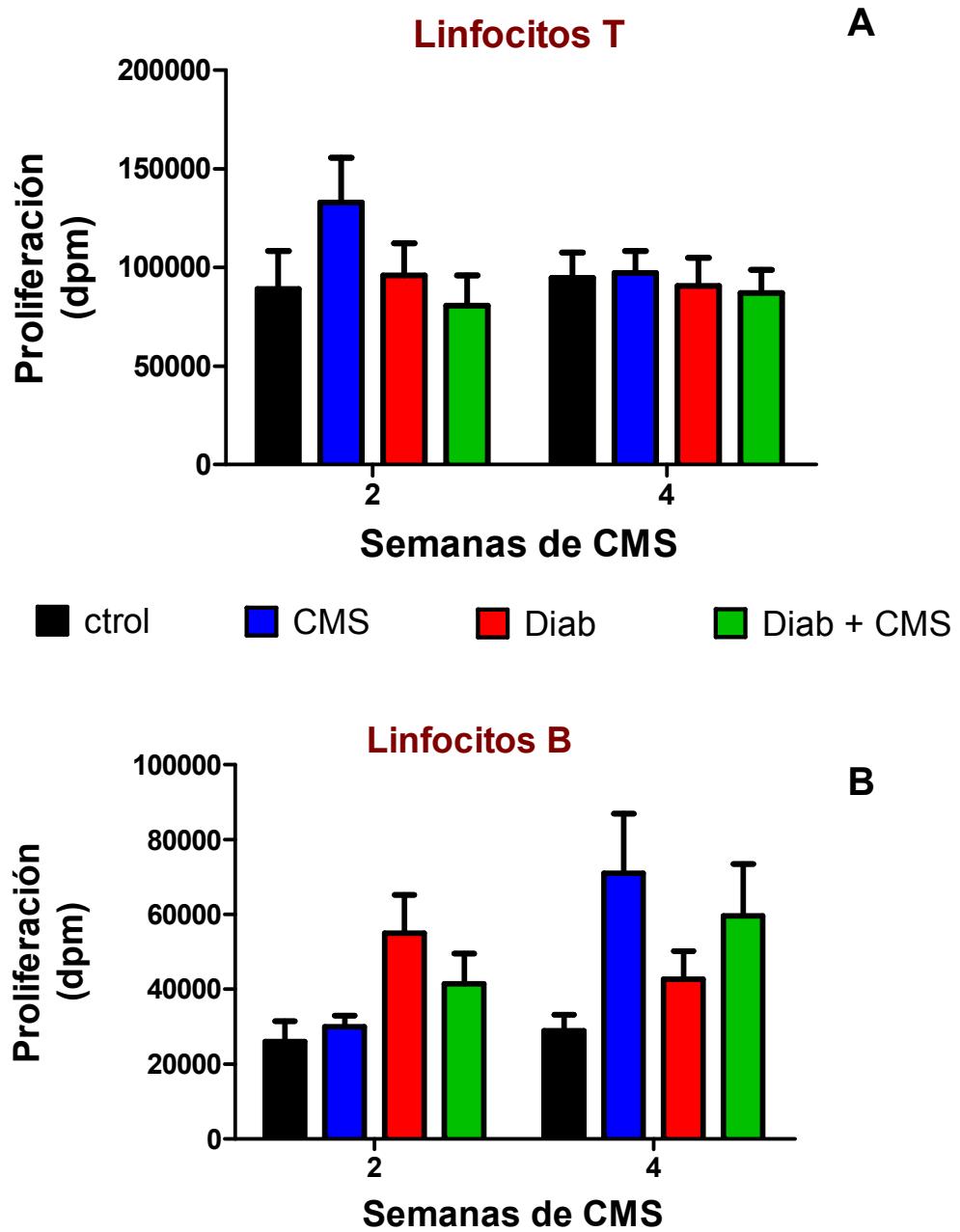
**Figura 24: Efecto del estrés y la diabetes en los valores de glucemia y en la sobrevida.** **Panel A:** Glucemias promedio en función de las semanas de CMS. **Panel B:** Porcentaje de sobrevida en función de los días de CMS. Los datos mostrados representan la media  $\pm$  ES de 10 animales en cada grupo. \*\* $p<0,01$  respecto a animales controles y ## $p<0,01$  respecto a animales diabéticos.

### **4.3 Efecto del estrés y la diabetes en la respuesta inmune en animales C57Bl/6J: mediadores neuroendocrinos involucrados**

#### *4.3.1 Estudio de la proliferación linfocitaria*

Se obtuvieron las poblaciones linfocitarias de animales de la cepa C57Bl/6J las que fueron estimuladas con mitógenos selectivos para cada población. La máxima proliferación se obtuvo con 1  $\mu\text{g/ml}$  de Con A y 25  $\mu\text{g/ml}$  de LPS (figura 10). Los resultados obtenidos (figura 25) no mostraron cambios en la proliferación en ninguno de los grupos estudiados tanto para linfocitos T como B (ANOVA de dos vías para muestras no apareadas, repuesta proliferativa T: efectos principales: tratamiento  $F(3, 64)=1,42$ ,  $p$  no significativo; tiempo  $F(1, 64)=0,41$ ,  $p$  no significativo; interacción tratamiento x semanas  $F(3, 64)=0,77$ ,  $p$  no significativo. ANOVA de dos vías para muestras no apareadas, repuesta proliferativa B: efectos principales: tratamiento  $F(3, 64)=2,3$ ,  $p$  no significativo; tiempo  $F(1, 64)=1,97$ ,  $p$  no significativo; interacción tratamiento x semanas  $F(3, 64)=1,91$ ,  $p$  no significativo).





**Figura 25: Respuesta proliferativa de linfocitos T y B.**

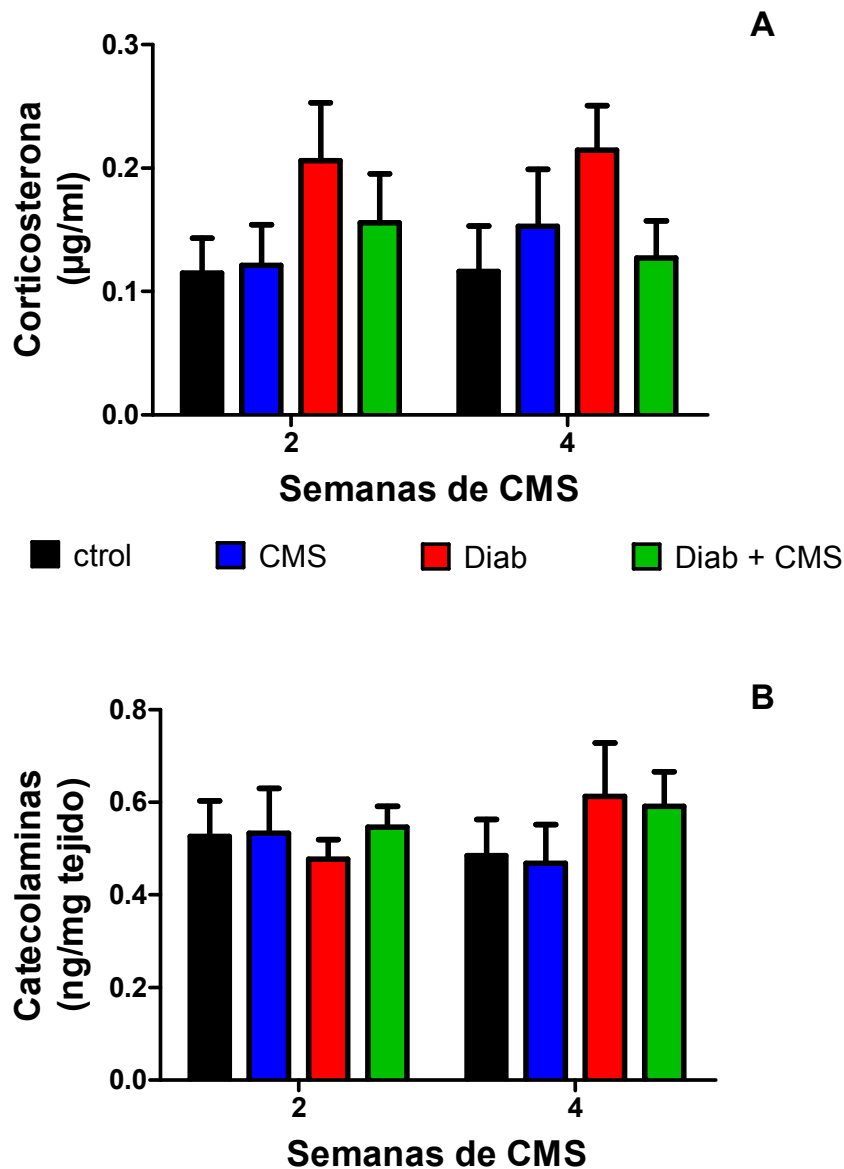
Poblaciones linfocitarias provenientes de todos los grupos de animales a diferentes tiempos de CMS (2 y 4 semanas) fueron estimuladas con Con A (1 µg/ml, **panel A**) y LPS (25 µg/ml, **panel B**). Los resultados mostrados son el promedio ± ES de nueve animales en cada grupo.

#### 4.3.2 Estudio sobre los niveles de corticosterona y catecolaminas

Se evaluó la activación temprana del eje HPA y del SNA determinando la concentración plasmática de corticosterona y los niveles de catecolaminas en el bazo.

Los resultados obtenidos se encuentran en la figura 26, donde se observa una tendencia al aumento en los niveles de corticosterona de los animales diabéticos sin

encontrarse cambios en los otros grupos (ANOVA de dos vías para muestras no apareadas, efectos principales: tratamiento:  $F(3, 88)=2,6$ ,  $p$  no significativo; tiempo:  $F(1, 88)=0,01$ ,  $p$  no significativo; interacción tratamiento x tiempo:  $F(3, 88)=0,09$ ,  $p$  no significativo). Con respecto a los niveles de catecolaminas, ninguno de los grupos estudiados mostró cambios significativos (ANOVA de dos vías para muestras no apareadas, efectos principales: tratamiento:  $F(3, 88)=1,04$ ,  $p$  no significativo; tiempo:  $F(1, 88)=0,93$ ,  $p$  no significativo; interacción tratamiento x tiempo:  $F(3, 88)=0,43$ ,  $p$  no significativo).



**Figura 26: Determinación de los niveles de corticosterona y catecolaminas.**

Se obtuvieron el plasma y los bazos de todos los grupos de animales a las 2 y 4 semanas de CMS y se determinaron los niveles de corticosterona (**panel A**) y de catecolaminas (**panel B**). Los resultados mostrados son el promedio  $\pm$  ES de doce animales en cada grupo a cada tiempo.

## **PARTE V: PARTICIPACIÓN DE LA HIPERGLUCEMIA Y DEL ESTRÉS OXIDATIVO.**

Los resultados obtenidos para la cepa BALB/cByJ muestran una disminución en la proliferación linfocitaria en los animales diabéticos expuestos a CMS a partir de la segunda y quinta semana de CMS para, respectivamente, linfocitos T y B y a partir del sexto mes para los animales diabéticos. Estos resultados se correlacionan con el aumento en la glucemia. Teniendo en cuenta que numerosos estudios poblacionales involucran a la hiperglucemia como el principal factor determinante del inicio y la progresión de las complicaciones que sufre el paciente con diabetes, se evaluó el efecto de altas concentraciones de glucosa sobre la actividad linfocitaria normal.

Asimismo, los animales diabéticos, expuestos o no a CMS, de la cepa C57Bl/6J presentaron glucemias más elevadas que los ratones BALB/cByJ. Sin embargo, no se observaron alteración en la respuesta proliferativa. Esto podría asociarse, dentro de un contexto clínico, con aquellos individuos con diabetes que manifiestan una evolución normal ante la presencia de un cuadro infeccioso. Esto estaría sugiriendo la participación de distintos factores que regularían esta susceptibilidad individual, dentro de los cuales podríamos encontrar el condicionamiento genético de cada individuo. Por esta razón los siguientes estudios se realizaron en ambas cepas de ratones: BALB/cByJ y C57Bl/6J.

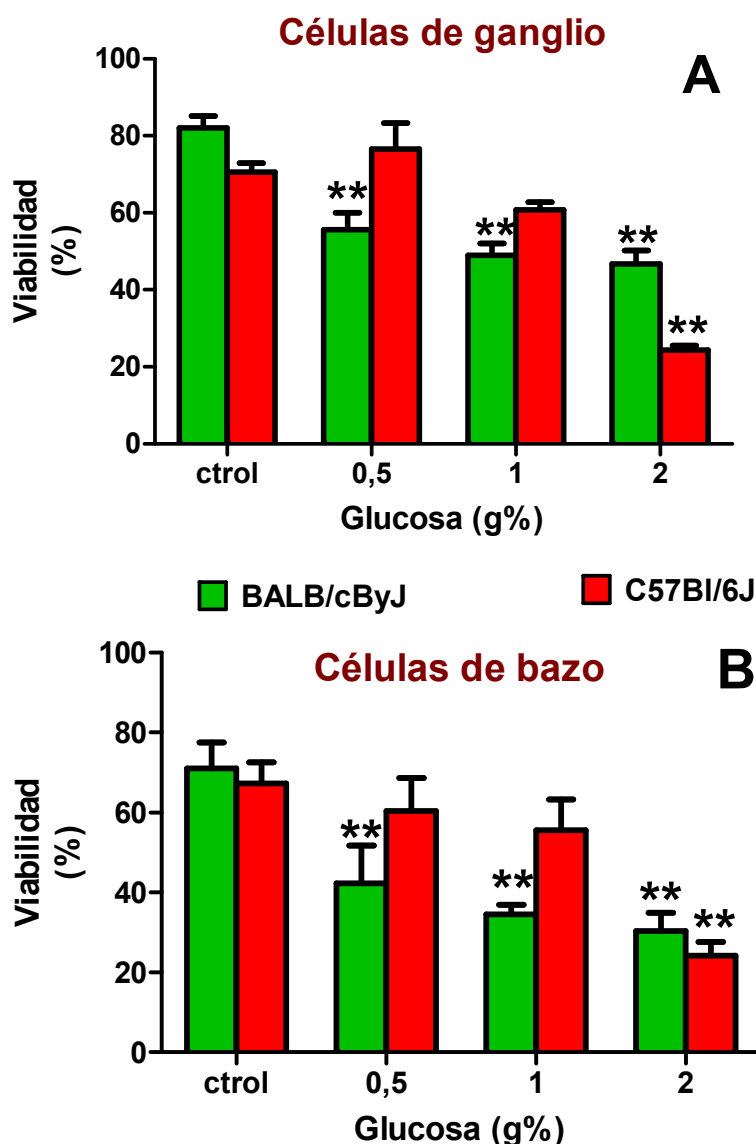
### **5.1 Efecto de altas concentraciones de glucosa sobre la actividad linfocitaria normal.**

Se estudió el efecto que ejercen altas concentraciones de glucosa presentes en el medio de cultivo sobre la actividad linfocitaria normal. Para esto, poblaciones linfocitarias provenientes de ganglio y bazo extraídas de ratones normales de la cepa BALB/cByJ y C57Bl/6J fueron incubadas con altas concentraciones de glucosa (0,5; 1 y 2 g%) durante 24 hs después de lo cual se evaluó la viabilidad, la proliferación y la apoptosis.

#### *5.1.1 Viabilidad y apoptosis*

Poblaciones linfocitarias fueron incubadas con altas concentraciones de glucosa y se determinó la viabilidad celular a través del criterio de exclusión del azul tripán. Los resultados se muestran en la figura 27, donde se observa una disminución, concentración dependiente, de la viabilidad de linfocitos provenientes de ganglio así

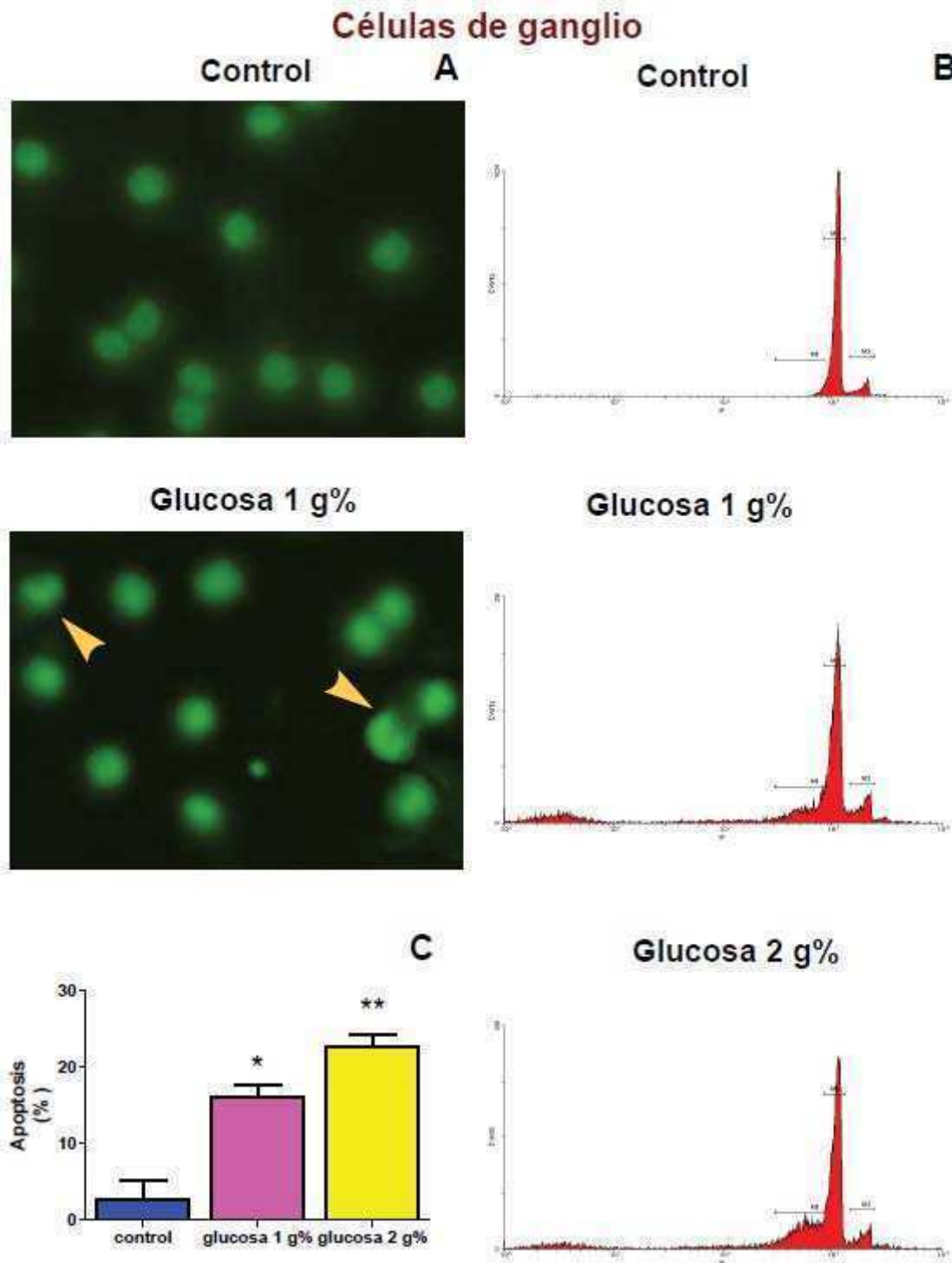
como también de bazo de ratones de la cepa BALB/cByJ. En cuanto a las células provenientes de ratones de la cepa C57Bl/6J no se observó disminución en la viabilidad con concentraciones de 0,5 g% y 1 g%. Cuando la incubación se realizó con glucosa 2 g%, se observó una disminución en la viabilidad (ANOVA de dos vías para muestras no apareadas, células de ganglio: efectos principales: interacción tratamiento x cepa  $F(3, 32)=24,83$ ;  $p<0,0001$ ; análisis efectos simples: BALB/cByJ,  $F(3, 32)=17,00$ ;  $p<0,0001$ ; C57Bl/6J,  $F(3, 32)=69,50$ ;  $p<0,0001$ ; células de bazo: efectos principales: interacción tratamiento x tiempo  $F(3, 32)=12,6$ ;  $p<0,0001$ ; análisis efectos simples: BALB/cByJ,  $F(3, 32)=41,59$ ;  $p<0,0001$ ; C57Bl/6J,  $F(3, 32)=45,00$ ;  $p<0,0001$ ).

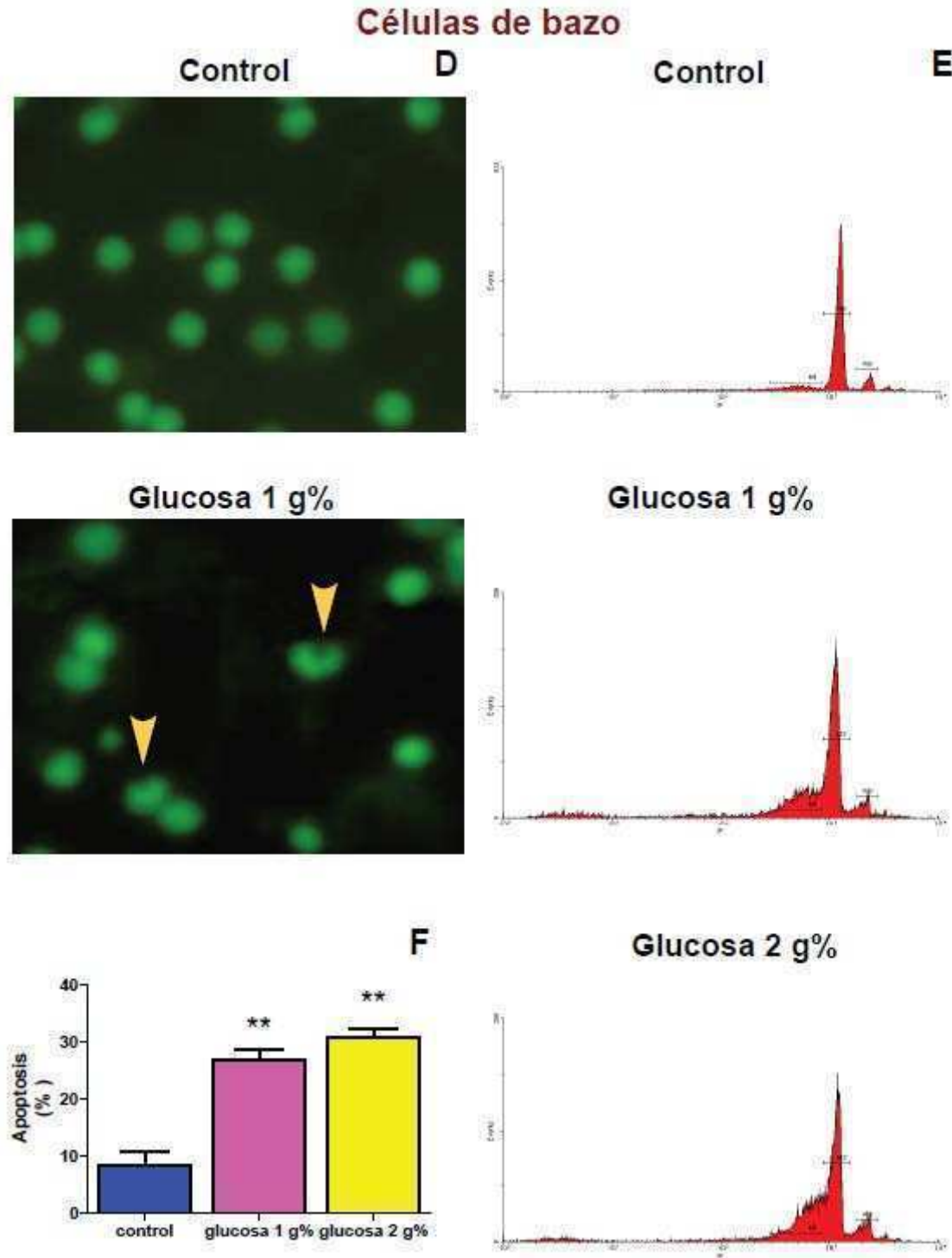


**Figura 27: Efecto de altas concentraciones de glucosa sobre la viabilidad de células provenientes de ganglio y bazo de ratones BALB/cByJ y C57Bl/6J normales.**

Células provenientes de ganglio (panel A) o bazo (panel B) de ratones BALB/cByJ o C57Bl/6J fueron incubados durante 24 hs en medio RPMI 1640 sin (control, medio estándar) o con la adición al medio de cultivo de glucosa. Se determinó la viabilidad. Los resultados son el promedio  $\pm$  ES de 5 experimentos independientes. \*\* $p<0,01$  respecto a su valor control.

Se estudió la participación de la apoptosis en la disminución de la viabilidad celular, analizando la presencia de células apoptóticas. Los resultados mostraron -en los ratones BALB/cByJ- un aumento en la apoptosis, concentración de glucosa dependiente, para ambas poblaciones linfocitarias (figura 28, ANOVA de una vía para muestras no apareadas, células de ganglio:  $F(2, 6)=13,409$ ;  $p=0,0061$ ; células de bazo:  $F(2, 6)=18,23$ ;  $p=0,0028$ ).



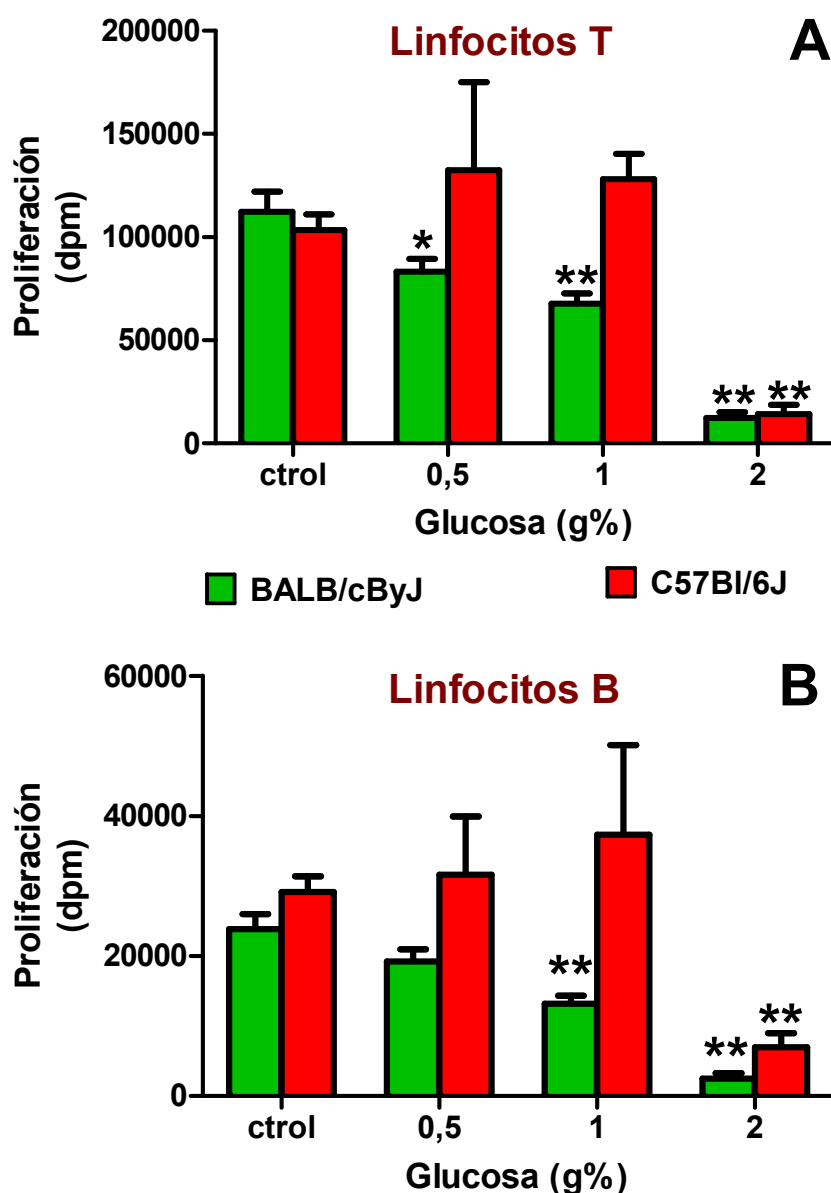


**Figura 28: Efecto de altas concentraciones de glucosa sobre la apoptosis de células provenientes de ganglio y bazo de ratones BALB/cByJ normales.**

Células provenientes de ganglio (paneles A, B y C) o bazo (paneles D, E y F) de ratones BALB/cByJ fueron incubados durante 24 hs en medio RPMI 1640 sin (control, medio estándar) o con la adición al medio de cultivo de glucosa. Se determinó la presencia de células apoptóticas. Las mismas fueron identificadas ya sea mediante la observación por microscopía de fluorescencia (a 1000x) de la morfología nuclear de las células teñidas con Hoescht 33342 (paneles A y D) o mediante el análisis por citometría de flujo de los linfocitos marcados con yoduro de propidio (paneles B y E). Los paneles A y D muestran un experimento representativo de 3 ensayos realizados independientemente. Panel C y F: Promedio  $\pm$  ES de los resultados obtenidos por citometría de flujo de 4 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  respecto al valor control. Las flechas amarillas indican aquellas células con morfología nuclear compatible con células apoptóticas.

### 5.1.2 Proliferación linfocitaria

Poblaciones linfocitarias fueron incubadas durante 24 hs con altas concentraciones de glucosa, se determinó la viabilidad celular y  $1,5 \times 10^6$  de células vivas por ml fueron estimuladas con mitógenos selectivos para cada población (Con A para linfocitos T y LPS para linfocitos B). Se analizó la proliferación linfocitaria a través de la incorporación de timidina- $^3\text{H}$ . Los resultados se muestran en la figura 29, donde encontramos que la incubación con cantidades de glucosa iguales o superiores a 0,5 g% presentes en el medio de cultivo produjeron en los linfocitos T provenientes de la cepa BALB/cByJ una disminución, concentración dependiente, de la proliferación linfocitaria. Para linfocitos B, el efecto se observó a partir de una concentración de 1 g%. Sin embargo, en los linfocitos provenientes de la cepa C57Bl/6J no se observó una disminución en la proliferación linfocitaria al preincubar las células con concentraciones de 0,5 y 1 g% de glucosa (ANOVA de dos vías para muestras no apareadas, respuesta proliferativa T: efectos principales: interacción tratamiento x cepa  $F(3, 32)=8,04$ ;  $p=0,0004$ ; análisis efectos simples: BALB/cByJ,  $F(3, 32)=166,7$ ;  $p<0,0001$ ; C57Bl/6J,  $F(3, 32)=196,7$ ;  $p<0,0001$ ; respuesta proliferativa B: efectos principales: interacción tratamiento x tiempo  $F(3, 32)=8,47$ ;  $p=0,0003$ ; análisis efectos simples: BALB/cByJ,  $F(3, 32)=108,2$ ;  $p<0,0001$ ; C57Bl/6J,  $F(3, 32)=60,8$ ;  $p<0,0001$ ).



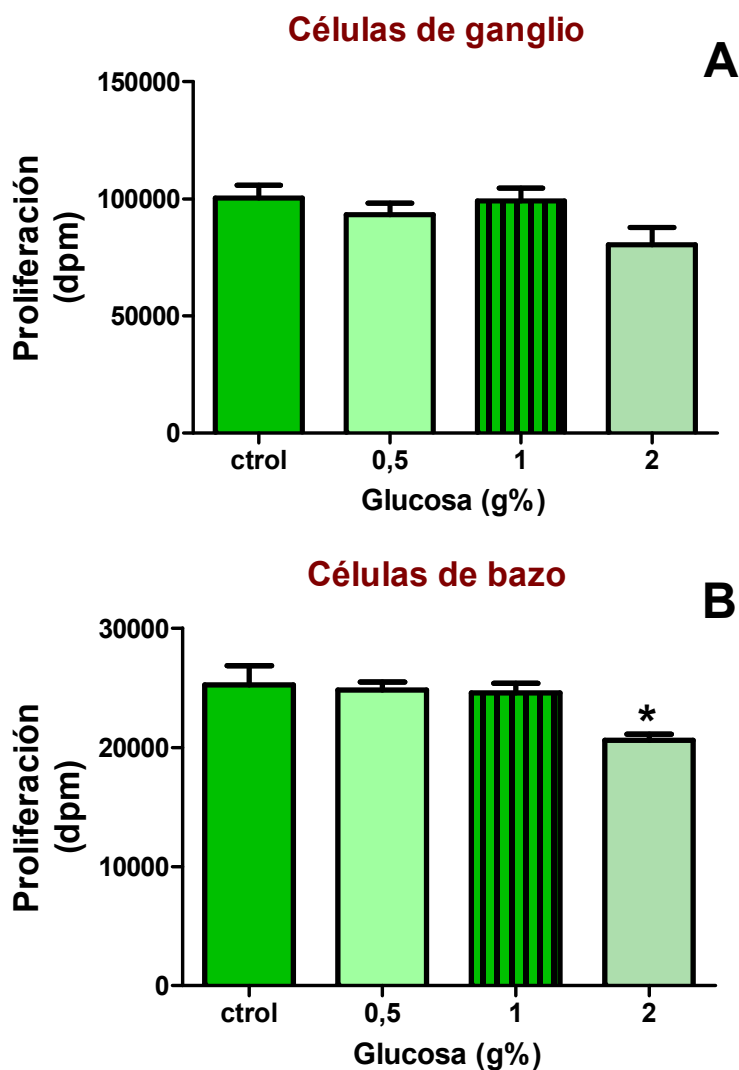
**Figura 29: Efecto de altas concentraciones de glucosa sobre la proliferación de linfocitos T y B de ratones BALB/cByJ y C57Bl/6J normales.**

Linfocitos T (**panel A**) o Linfocitos B (**panel B**) de ratones BALB/cByJ o C57Bl/6J fueron incubados durante 24 hs en RPMI 1640 sin (control, medio estándar) o con la adición al medio de cultivo de glucosa. Se determinó la proliferación linfocitaria. Los resultados son el promedio  $\pm$  ES de 5 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  respecto a su valor control.

Se estudió si el efecto de las altas concentraciones de glucosa observado en los linfocitos provenientes de la cepa BALB/cByJ era reversible. Para ello, las poblaciones linfocitarias de la cepa BALB/cByJ fueron incubadas durante 24 hs con altas concentraciones de glucosa. Transcurrido ese período, se reemplazó el medio de cultivo con medio fresco (con concentraciones estándar de glucosa) y seguidamente se estimuló la proliferación linfocitaria con el agregado de los mitógenos selectivos



para cada población. En estas condiciones se obtuvo una reversión del efecto inhibitorio previamente observado. De este modo, los linfocitos expuestos a alta glucosa mejoran su respuesta proliferativa cuando el exceso de glucosa es removido del medio de incubación (figura 30, ANOVA de una vía para muestras no apareadas; respuesta proliferativa T:  $F(3, 16)= 2,83$ ;  $p$  no significativo; respuesta proliferativa B:  $F(3, 16)= 6,45$ ;  $p=0,0045$ ).



**Figura 30: Efecto del lavado luego de la incubación con altas concentraciones de glucosa sobre la proliferación de linfocitos T y B de ratones BALB/cByJ normales.** Linfocitos T (**panel A**) o Linfocitos B (**panel B**) de ratones BALB/cByJ fueron incubados durante 24 hs en RPMI 1640 sin (control, medio estándar) o con la adición al medio de cultivo de glucosa. Luego de dicho periodo las células se lavaron e incubaron con medio fresco estándar. Se determinó la proliferación linfocitaria. Los resultados son el promedio  $\pm$  ES de 5 experimentos independientes. \* $p<0,05$  respecto al valor control.

Cabe aclarar que altas concentraciones de manitol -azúcar no reductor e isómero de la glucosa- no alteró significativamente la viabilidad, proliferación ni la apoptosis de las células provenientes de ganglio y bazo de ratones BALB/cByJ normales (tabla 2), descartando la participación del estrés osmótico en las alteraciones observadas por las altas concentraciones de glucosa.

**Tabla 2**  
**Viabilidad, apoptosis y proliferación de células provenientes de ganglio y bazo de ratones BALB/cByJ luego de 24 hs de incubación en un medio conteniendo concentraciones crecientes de manitol**

Agregado al medio	Viabilidad (% del control)		Apoptosis (%)		Proliferación (% del control)	
	Células de ganglio	Células de bazo	Células de ganglio	Células de bazo	Linfocitos T	Linfocitos B
Manitol 0,5 g %	111 ± 10	101 ± 9	2,9 ± 0,8	8,5 ± 2,3	111 ± 6,7	101 ± 7
Manitol 1 g %	97 ± 5	97 ± 6	3,2 ± 1,1	8,9 ± 2,5	97 ± 4,6	97 ± 8,5
Manitol 2 g %	76 ± 8	74 ± 9	6,2 ± 1,9	12,3 ± 2,9	72 ± 9,2	74 ± 4,4

Los datos son el promedio ± ES de cinco experimentos.

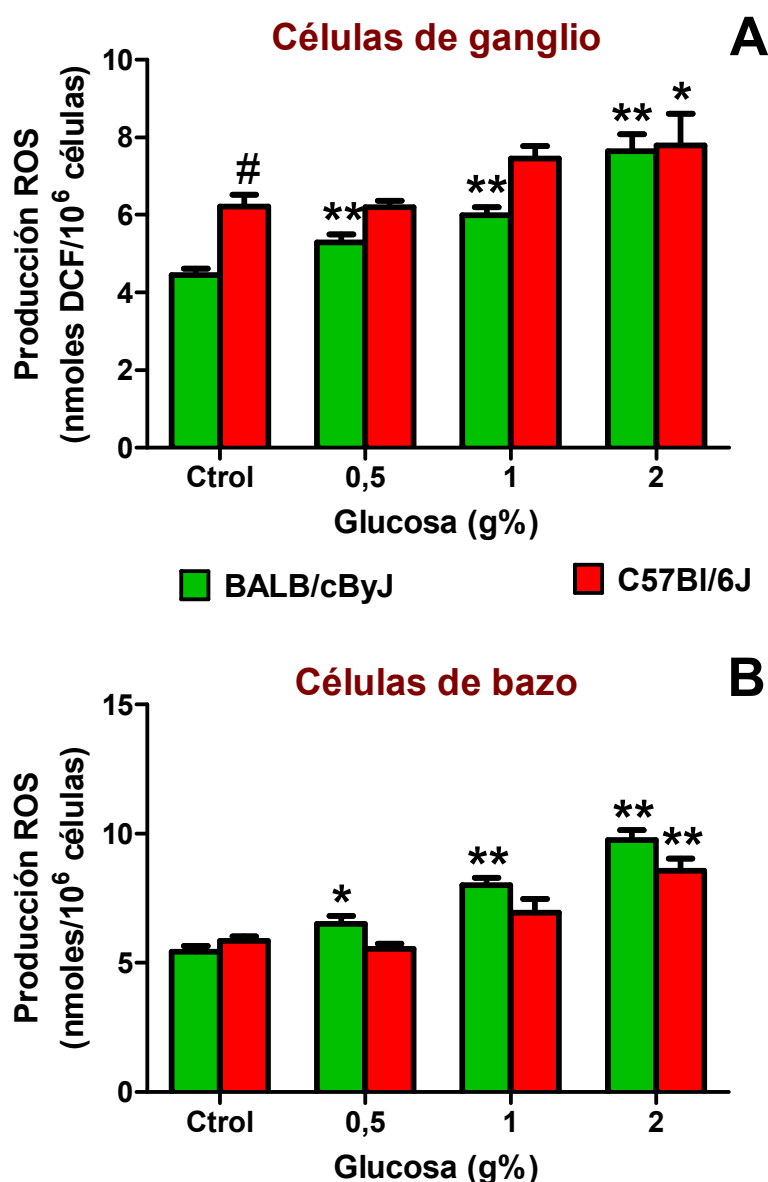
## **5.2 Acción de la alta glucosa sobre el estrés oxidativo.**

Dado que existen evidencias experimentales que describen que el aumento en el estrés oxidativo es un factor clave en el desarrollo de las alteraciones en la diabetes y que a su vez la hiperglucemia puede generar especies reactivas del oxígeno y atenuar los mecanismos antioxidantes creando un estado de estrés oxidativo, estudiamos el efecto de altas concentraciones de glucosa (0,5; 1 y 2 g%) sobre el estrés oxidativo. Se determinó la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la peroxidación lipídica.

### **5.2.1 Determinación de la producción de especies reactivas del oxígeno**

Poblaciones linfocitarias provenientes de ratones normales BALB/cByJ y C57Bl/6J fueron incubadas con altas concentraciones de glucosa por 24 hs. Cumplido este periodo, se determinó la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), encontrándose un incremento en su generación, concentración dependiente, en células de ganglio y bazo provenientes de ratones BALB/cByJ (figura 31). En cuanto a los linfocitos provenientes de ratones C57Bl/6J no hubo diferencias significativas en la

producción de ROS cuando la preincubación se realizó con glucosa 0,5 y 1 g%. Asimismo, encontramos diferencias entre los controles de ambas cepas para las células de ganglio, siendo la producción basal de ROS mayor en la cepa C57Bl/6J que en la BALB/cByJ (ANOVA de dos vías para muestras no apareadas, células de ganglio: efectos principales: interacción tratamiento x cepa  $F(3, 32)=5,39$ ;  $p=0,004$ ; análisis efectos simples: particionando por cepa: BALB/cByJ,  $F(3, 32)=29,41$ ;  $p<0,0001$ ; C57Bl/6J,  $F(3, 32)=3,53$ ;  $p=0,0257$ ; particionando por tratamiento: control,  $F(1, 32)=28,98$ ;  $p<0,0001$ ; glucosa 0,5 g%,  $F(1, 32)=5,88$ ;  $p=0,0211$ ; glucosa 1 g%,  $F(1, 32)=7,94$ ;  $p=0,0082$ ; glucosa 2 g%,  $F(1, 32)=0,35$ ;  $p$  no significativo ;células de bazo: efectos principales: interacción tratamiento x cepa  $F(3, 32)= 3,05$ ;  $p=0,0427$ ; análisis efectos simples: particionando por cepa: BALB/cByJ,  $F(3, 32)=24,39$ ;  $p<0,0001$ ; C57Bl/6J,  $F(3, 32)=16,26$ ;  $p <0,0001$ ; particionando por tratamiento: control,  $F(1, 32)=1,63$ ;  $p$  no significativo; glucosa 0,5 g%,  $F(1, 32)=6,34$ ;  $p=0,0169$ ; glucosa 1 g%,  $F(1, 32)=5,12$ ;  $p=0,0305$ ; glucosa 2 g%,  $F(1, 32)=2,92$ ;  $p$  no significativo).

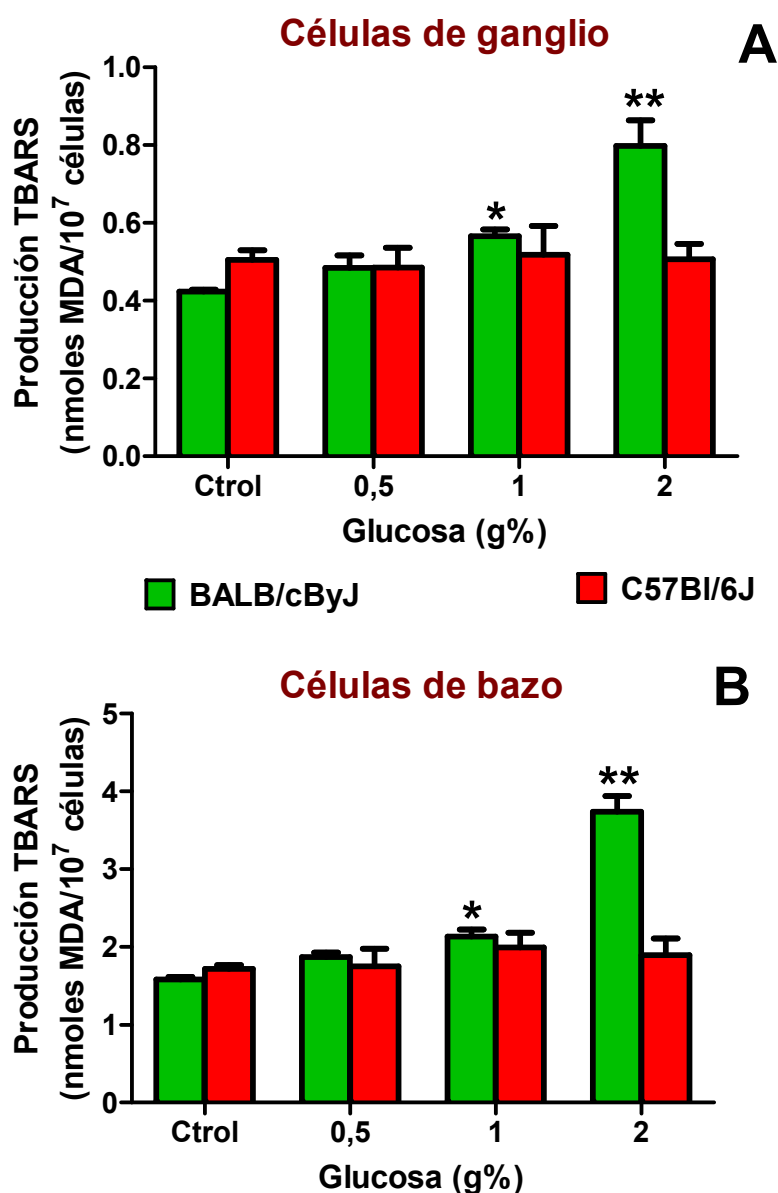


**Figura 31: Determinación de los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS).** Células provenientes de ganglio (panel A) y bazo (panel B) de ratones normales BALB/cByJ o C57Bl/6J fueron incubados durante 24 hs en medio RPMI 1640 sin (control, medio estándar) o con la adición al medio de cultivo de glucosa. Se estudió la concentración de ROS intracelular. Los datos son el promedio  $\pm$  ES de 5 experimentos individuales. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  respecto a su valor control. # $p < 0,05$  respecto al control de la cepa BALB/cByJ.

### 5.2.2 Peroxidación lipídica

Se determinó el grado de peroxidación lipídica, a través de la determinación de las especies que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), en linfocitos que fueron incubados con altas concentraciones de glucosa. Los resultados se muestran en la figura 32, donde se puede observar que se incrementaron los niveles de peroxidación lipídica en ambas poblaciones linfocitarias provenientes de animales de la cepa BALB/cByJ en presencia de alta glucosa. Cuando se utilizaron poblaciones

linfocitarias provenientes de animales C57Bl/6J no se encontraron diferencias significativas en la producción de TBARS (ANOVA de dos vías para muestras no apareadas, células de ganglio: efectos principales: interacción tratamiento x cepa  $F(3, 32)=6,4$ ;  $p=0,0016$ ; análisis efectos simples: BALB/cByJ,  $F(3, 32)=13$ ;  $p<0,0001$ ; C57Bl/6J,  $F(3, 32)=0,093$ ;  $p$  no significativo; células de bazo: efectos principales: interacción tratamiento x cepa  $F(3, 32)=17,57$ ;  $p<0,0001$ ; análisis efectos simples: BALB/cByJ,  $F(3, 32)= 38,83$ ;  $p<0,0001$ ; C57Bl/6J,  $F(3, 32)=0,667$ ;  $p$  no significativo).



**Figura 32: Determinación de la peroxidación lipídica.** Células provenientes de ganglio (panel A) y bazo (panel B) de ratones controles BALB/cByJ o C57Bl/6J fueron incubados durante 24 hs en medio RPMI 1640 sin (control, medio estándar) o con la adición al medio de cultivo de glucosa. Se determinó la producción de TBARS. Los datos son el promedio  $\pm$  ES de 5 experimentos independientes. \* $p<0,05$  y \*\* $p<0,01$  respecto a su valor control.

La incubación con altas concentraciones de manitol no alteró significativamente la producción de ROS ni de TBARS en células provenientes de ganglio y bazo de ratones BALB/cByJ normales (tabla 3), descartando que el aumento en el estrés oxidativo pueda deberse a la generación de estrés osmótico por las altas concentraciones de glucosa.

**Tabla 3**  
**Producción de ROS y TBARS en células provenientes de ganglio y bazo de ratones BALB/cByJ luego de 24 hs de incubación en un medio conteniendo concentraciones crecientes de manitol**

Agregado al medio	ROS (% del control)		TBARS (%)	
	Células de ganglio	Células de bazo	Células de ganglio	Células de bazo
Manitol 1 g %	102 ± 7	96 ± 8	96 ± 5	105 ± 8
Manitol 2 g %	97 ± 6	89 ± 10	101 ± 8	99 ± 8

Los datos son el promedio ± ES de 5 experimentos independientes.

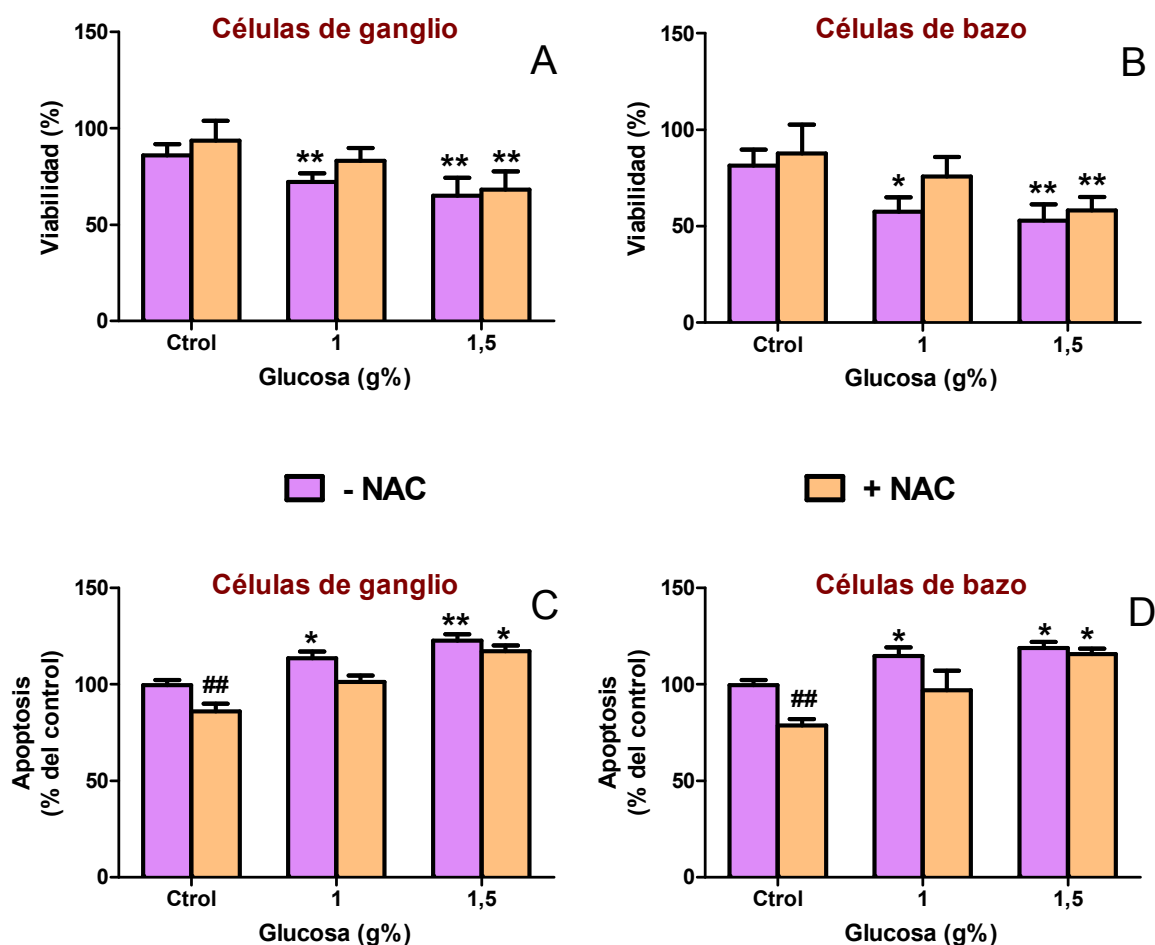
### 5.3 Acción del antioxidante N-acetilcisteína.

De acuerdo a lo observado en las figuras 31 y 32, linfocitos provenientes de la cepa BALB/cByJ en presencia de altas concentraciones de glucosa presentaron un incremento en la producción de ROS y en la peroxidación lipídica, efecto que no se observa en los linfocitos provenientes de ratones C57Bl/6J. Esto sugiere que el estrés oxidativo podría estar participando en las alteraciones inmunológicas observadas en los linfocitos de los ratones BALB/cByJ (disminución de la viabilidad y proliferación y aumento de la apoptosis). Es por ello que se evaluó el efecto que ejerce una droga con acción antioxidante. Poblaciones linfocitarias provenientes de ratones normales de la cepa BALB/cByJ fueron incubadas con altas concentraciones de glucosa en ausencia o presencia de N-acetilcisteína (NAC, 5mM) determinándose la viabilidad, apoptosis y proliferación.

Debido a la gran disminución en la viabilidad obtenida al incubar con glucosa 2 g% y que esto dificultaba la obtención de células para los siguientes estudios, se eligió cambiar esta concentración por glucosa 1,5 g%. De esta manera las concentraciones de glucosa utilizadas fueron 0,5 g%, 1 g% y 1,5 g%.

### 5.3.1 Viabilidad y apoptosis

Al incubar las células en presencia de glucosa 1 g% y NAC se observó que el antioxidante impide la disminución de la viabilidad linfocitaria y el incremento de la muerte celular que ocasiona la alta glucosa (figura 33). Cuando la incubación se realizó con glucosa 1,5 g% y NAC, el efecto deletéreo no pudo ser revertido. (**Viabilidad:** ANOVA de dos vías para muestras no apareadas, células de ganglio: efectos principales: glucosa  $F(2, 24)=21,06$ ;  $p<0,0001$ ; antioxidante  $F(2, 24)=6,31$ ;  $p=0,0191$ ; interacción glucosa x antioxidante  $F(2, 24)=0,58$ ;  $p$  no significativo; células de bazo: efectos principales: glucosa  $F(2, 24)=22,6$ ;  $p<0,0001$ ; antioxidante  $F(2, 24)=7,79$ ;  $p=0,0101$ ; interacción glucosa x antioxidante  $F(2, 24)=1,35$ ;  $p$  no significativo. **Apoptosis:** ANOVA de dos vías para muestras no apareadas, células de ganglio: efectos principales: glucosa  $F(2, 12)=34,27$ ;  $p<0,0001$ ; antioxidante  $F(2, 12)=15,16$ ;  $p=0,0021$ ; interacción glucosa x antioxidante  $F(2, 12)=0,92$ ;  $p$  no significativo; células de bazo: efectos principales: glucosa  $F(2, 12)=36,06$ ;  $p<0,0001$ ; antioxidante  $F(2, 12)=14,93$ ;  $p=0,0023$ ; interacción glucosa x antioxidante  $F(2, 12)=3,44$ ;  $p$  no significativo).



**Figura 33: Acción del NAC sobre el efecto de la alta glucosa en la viabilidad y apoptosis.** Células provenientes de ganglio (paneles A y C) o bazo (paneles B y D) de ratones BALB/cByJ fueron incubadas durante 24 hs en medio RPMI 1640 sin (control, medio estándar) o con la adición al medio de cultivo de glucosa. Las incubaciones se realizaron en ausencia o presencia NAC. Se estudió la viabilidad celular (panel A y B) y se determinó la apoptosis (panel C y D). Los resultados son el promedio  $\pm$  ES de 5 experimentos independientes para viabilidad y de 3 experimentos independientes para apoptosis. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  respecto a su valor control. ## $p < 0,01$  respecto al control sin NAC.

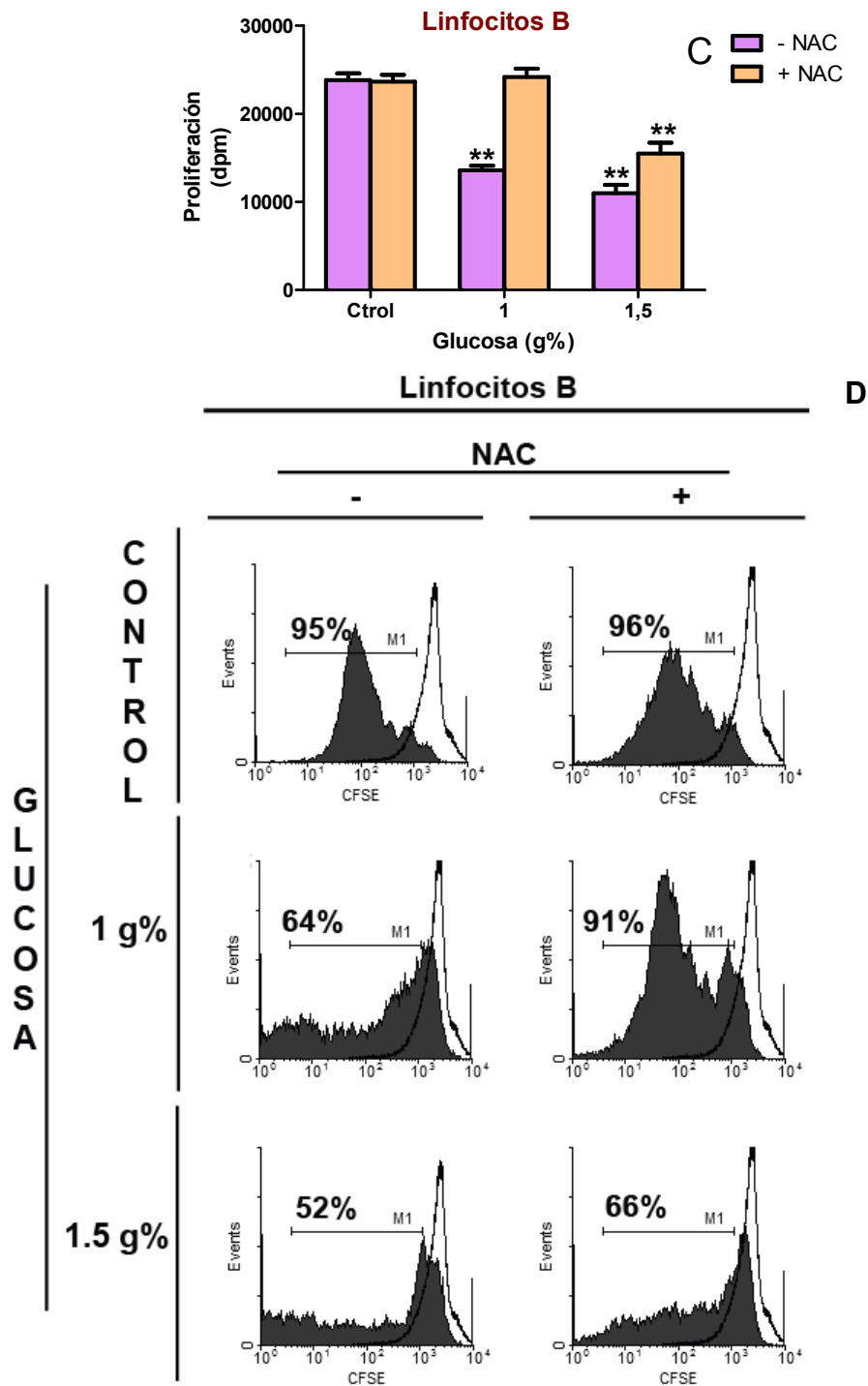
### 5.3.2 Proliferación linfocitaria

Poblaciones linfocitarias provenientes de ratones BALB/cByJ fueron incubadas con altas concentraciones de glucosa en ausencia o presencia del antioxidante NAC. Luego fueron estimuladas con mitógenos selectivos para cada población linfocitaria y se determinó su proliferación ya sea mediante la incorporación de timidina-<sup>3</sup>H, como también a través de la dilución del colorante CFSE.

Como podemos observar en la figura 34, al realizar la incubación en presencia del antioxidante NAC no se observaron los efectos deletéreos de la incubación con glucosa 1 g%. De este modo, el efecto del antioxidante impide la disminución de la proliferación tanto en linfocitos T como B, confirmando la participación del estrés oxidativo en el efecto deletéreo de la alta glucosa (ANOVA de dos vías para muestras







**Figura 34: Acción del NAC sobre el efecto de la alta glucosa en la proliferación linfocitaria.**

Linfocitos T (paneles A y B) o linfocitos B (paneles C y D) de ratones BALB/cByJ fueron incubados durante 24 hs en medio RPMI 1640 sin (control, medio estándar) o con la adición al medio de cultivo de glucosa. Las incubaciones se realizaron en ausencia o presencia de NAC. Se estudió la proliferación linfocitaria a través de la incorporación de timidina-<sup>3</sup>H (paneles A y C) y de la dilución del colorante CFSE (paneles B y D). Los resultados para la incorporación de timidina-<sup>3</sup>H son el promedio ± ES de 5 experimentos independientes. \*\**p*<0,01 respecto al valor control. Los resultados para la dilución del CFSE muestran un experimento representativo (de 4 realizados independientemente), donde el porcentaje expresado es el porcentaje de proliferación.

#### 5.4 Acción de la alta glucosa sobre los mecanismos antioxidantes

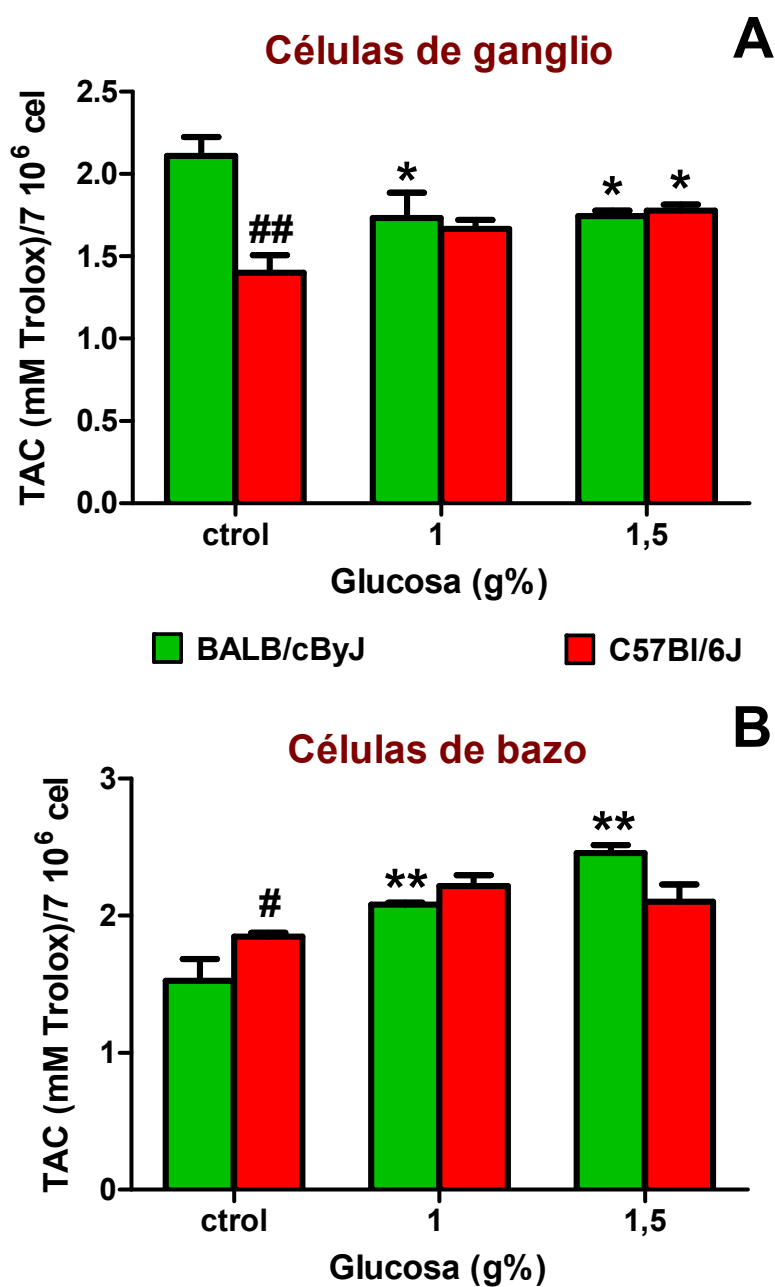
Debido a las diferencias encontradas en relación al estrés oxidativo, donde linfocitos provenientes de la cepa BALB/cByJ al incubarlos en presencia de alta glucosa presentan un aumento en este parámetro mientras que los provenientes de la cepa C57Bl/6J no responden de esta manera, el siguiente objetivo fue analizar los mecanismos antioxidantes propios de las células.

Se estudió la capacidad antioxidante total (TAC) debido a la dificultad para determinar cada una de las enzimas y moléculas involucradas en la actividad antioxidante. También se determinaron los niveles de glutatión, el tiol dominante en todas las células eucarióticas y de gran importancia para el sistema inmune.

##### 5.4.1 Determinación de la capacidad antioxidante total

Poblaciones linfocitarias provenientes de ratones BALB/cByJ y C57Bl/6J fueron incubadas con altas concentraciones de glucosa por 24 hs y luego se determinó la TAC. Como se puede observar en la figura 35, las células provenientes de ganglio de ratones BALB/cByJ en presencia de alta glucosa presentaron una disminución en la TAC. Contrariamente, en cuanto a las células provenientes de ratones C57Bl/6J, en condiciones controles las mismas presentaron una menor capacidad antioxidante total que las provenientes de la cepa BALB/cByJ, y la misma se incrementa con la presencia de mayores concentraciones de glucosa (ANOVA de dos vías para muestras no apareadas, células de ganglio: efectos principales: interacción tratamiento x cepa  $F(2, 18)=8,9$ ;  $p=0,0021$ ; análisis efectos simples: particionando por cepa: BALB/cByJ  $F(2, 18)=4,5$ ;  $p=0,026$ ; C57Bl/6J  $F(2, 18)=3,75$ ;  $p=0,043$ . Particionando por tratamiento: control  $F(1, 18)=25,25$ ;  $p<0,0001$ ; glucosa 1  $F(1, 18)=0,25$ ;  $p$  no significativo; glucosa 1,5  $F(1, 18)=0,05$ ;  $p$  no significativo).

Con respecto a las células provenientes de bazo, para las extraídas de ratones BALB/cByJ se encontró un aumento de la TAC, concentración de glucosa dependiente; mientras que las provenientes de ratones C57Bl/6J presentaron un mayor nivel de TAC en condiciones controles, sin encontrarse cambios significativos en presencia de alta glucosa (ANOVA de dos vías para muestras no apareadas, células de bazo: efectos principales: interacción tratamiento x cepa  $F(2, 18)=6,53$ ;  $p=0,0074$ ; análisis efectos simples: particionando por cepa: BALB/cByJ  $F(2, 18)=25,66$ ;  $p<0,0001$ ; C57Bl/6J  $F(2, 18)=3,33$ ;  $p=0,0587$ . Particionando por tratamiento: control  $F(1, 18)=7$ ;  $p=0,0164$ ; glucosa 1  $F(1, 18)=0,33$ ;  $p$  no significativo; glucosa 1,5  $F(1, 18)=5,67$ ;  $p=0,0285$ ).



**Figura 35: Determinación de la capacidad antioxidante total.**

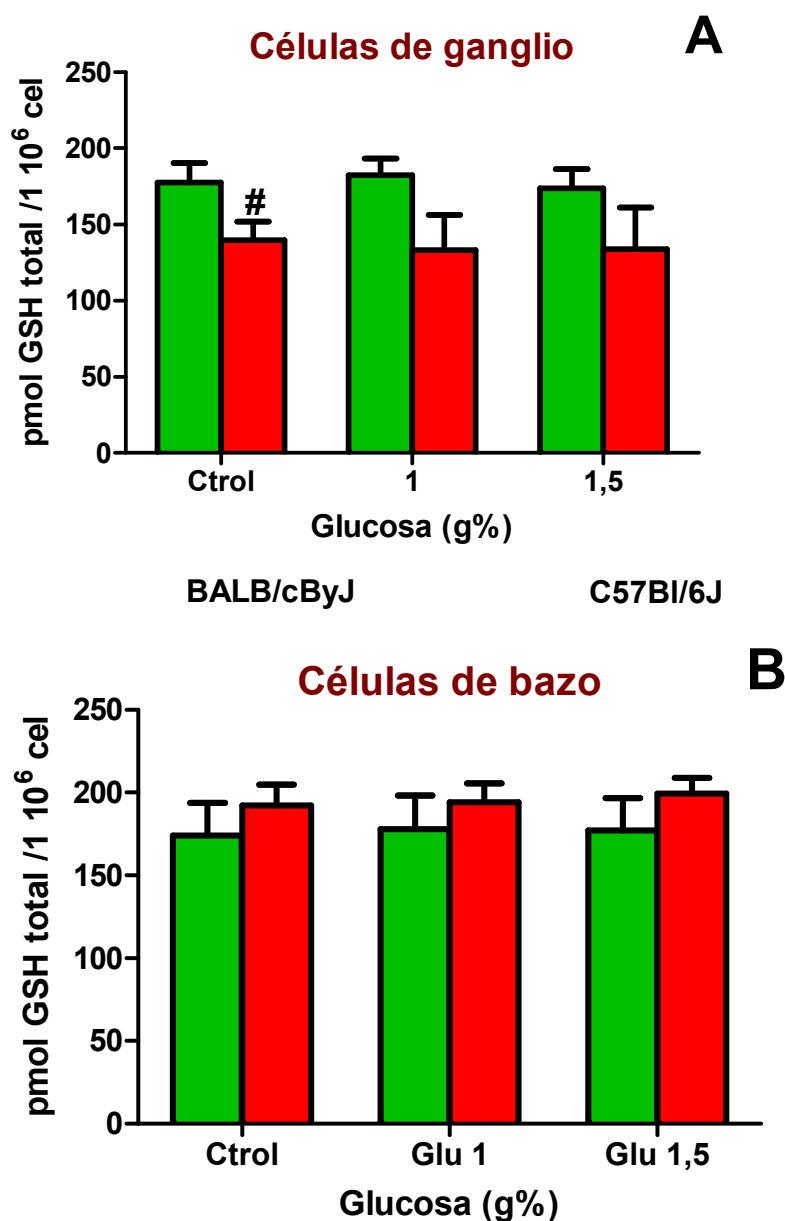
Células provenientes de ganglio (**panel A**) y bazo (**panel B**) de ratones BALB/cByJ o C57Bl/6J fueron incubados durante 24 hs en medio RPMI 1640 sin (control, medio estándar) o con la adición al medio de cultivo de glucosa. Se determinó la capacidad antioxidante total (TAC). Los resultados están expresados como mM de trolox. Los datos son el promedio  $\pm$  ES de 4 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  respecto a su valor control. # $p < 0,05$  y ## $p < 0,01$  respecto al control de la cepa BALB/cByJ.

#### 5.4.2 Determinación de los niveles de glutatión total y reducido

Poblaciones linfocitarias provenientes de ganglio y bazo de ratones BALB/cByJ y C57Bl/6J fueron incubadas con altas concentraciones de glucosa por 24 hs. Finalizado este periodo, se determinaron los niveles de glutatión total y oxidado

(GSSG). Esto permitió calcular los niveles de glutatión reducido (GSH) y la relación GSH/GSSG que determina el estado oxidativo de las células.

En cuanto a los niveles de glutatión total, no se observó un efecto del tratamiento con alta glucosa ni en poblaciones linfocitarias provenientes de ganglio ni de bazo de ratones BALB/cByJ y C57Bl/6J. Asimismo, y de manera similar a lo observado con la TAC, se encontró un efecto de la cepa para las células de ganglio, donde las provenientes de los ratones C57Bl/6J presentaron menores niveles de glutatión (figura 36, ANOVA de dos vías para muestras no apareadas, células de ganglio: efectos principales: cepa:  $F(1, 18)=8,68$ ;  $p=0,0087$ ; tratamiento:  $F(2, 18)=0,04$ ;  $p$  no significativo; interacción tratamiento x cepa  $F(2, 18)=0,06$ ;  $p$  no significativo. ANOVA de dos vías para muestras no apareadas, células de bazo: efectos principales: cepa:  $F(1, 18)=2,01$ ;  $p$  no significativo; tratamiento:  $F(2, 18)=0,05$ ;  $p$  no significativo; interacción tratamiento x cepa  $F(2, 18)=0,02$ ;  $p$  no significativo).

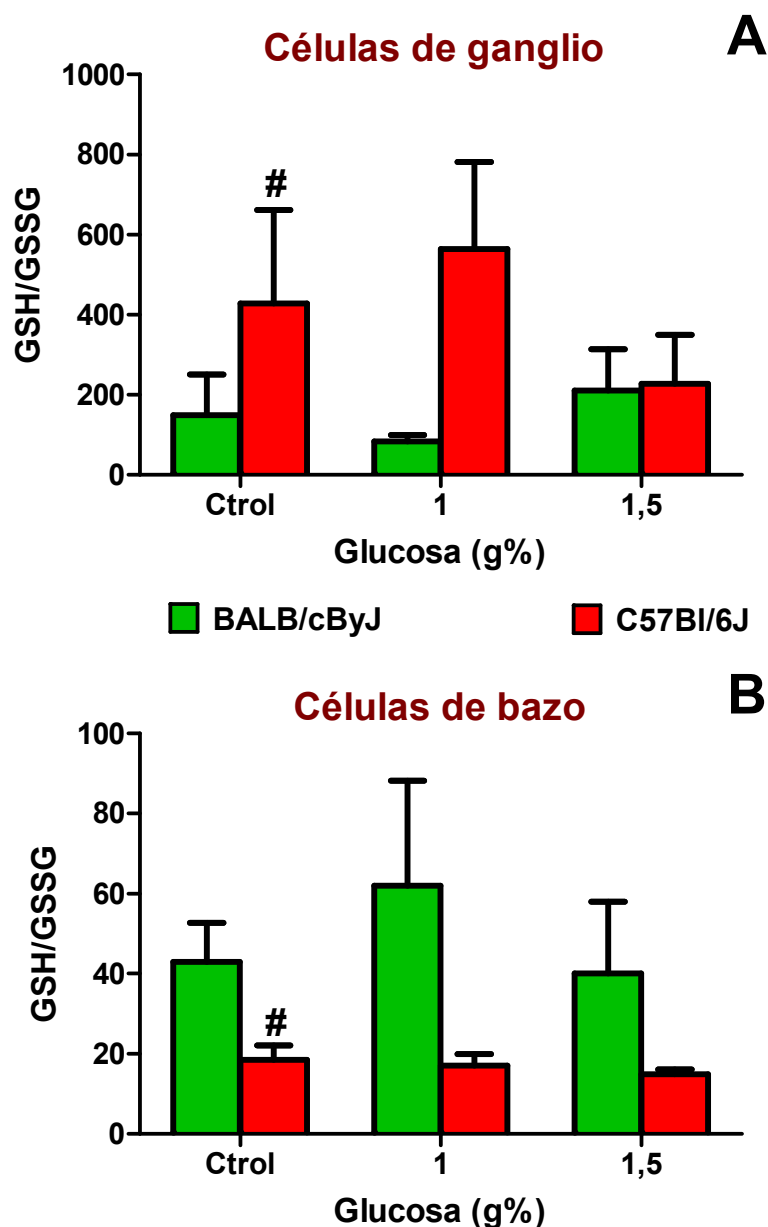


**Figura 36: Determinación de los niveles de glutatión total**

Células provenientes de ganglio (**panel A**) y bazo (**panel B**) de ratones BALB/cByJ o C57Bl/6J fueron incubados durante 24 hs en medio RPMI 1640 sin (control, medio estándar) o con la adición al medio de cultivo de glucosa. Se determinaron los niveles de glutatión total. Los resultados están expresados como pmoles de GSH/10<sup>6</sup> células. Los datos son el promedio  $\pm$  ES de 4 experimentos independientes. # $p < 0,05$  respecto al control de la cepa BALB/cByJ.

En cuanto a la relación GSH/GSSG, los resultados se muestran en la figura 37, donde no se observan diferencias significativas en el efecto de la alta glucosa en ninguno de los grupos estudiados. Sin embargo, para las células provenientes de ganglio de ratones C57Bl/6J se observa una tendencia a aumentar la relación al incubarse con glucosa 1 g% y luego disminuye con glucosa 1,5 g%. De manera similar ocurre con los linfocitos extraídos de bazo de animales BALB/cByJ. Coincidentemente

con lo ya descrito, se encuentra un efecto de la cepa para ambas poblaciones linfocitarias (ANOVA de dos vías para muestras no apareadas, células de ganglio: efectos principales: cepa:  $F(1, 17)=4,74$ ;  $p=0,0439$ ; tratamiento:  $F(2, 17)=0,27$ ;  $p$  no significativo; interacción tratamiento x cepa  $F(2, 17)=1,25$ ;  $p$  no significativo. ANOVA de dos vías para muestras no apareadas, células de bazo: efectos principales: cepa:  $F(1, 17)=12,62$ ;  $p=0,0025$ ; tratamiento:  $F(2, 17)=0,38$ ;  $p$  no significativo; interacción tratamiento x cepa  $F(2, 17)=0,14$ ;  $p$  no significativo).



**Figura 37: Determinación de la relación GSH/GSSG.**

Células provenientes de ganglio (**panel A**) y bazo (**panel B**) de ratones BALB/cByJ o C57Bl/6J fueron incubados durante 24 hs en medio RPMI 1640 sin (control, medio estándar) o con la adición al medio de cultivo de glucosa. Se determinó la relación GSH/GSSG. Los datos son el promedio  $\pm$  ES de 4 experimentos independientes. # $p < 0,05$  respecto al control de la cepa BALB/cByJ.

# **DISCUSIÓN**

---



La diabetes es una patología que se caracteriza por la falta de control en el metabolismo de la glucosa que genera el aumento de su concentración en sangre. El paciente con diabetes sufre comúnmente diversas complicaciones que afectan seriamente su calidad de vida. Aunque los síntomas agudos y a veces letales de la enfermedad pueden ser controlados por medio de la terapia con insulina, las complicaciones tardías de la diabetes reducen significativamente la expectativa de vida de los pacientes. Entre estas últimas se encuentran las micro y macro vasculopatías, las retinopatías, las neuropatías y las nefropatías. Adicionalmente, numerosos estudios sugieren la existencia de una asociación entre esta patología y una elevada predisposición a sufrir infecciones severas, aunque no se conocen los mecanismos que median entre la diabetes y la inmunosupresión (Peleg y *col.*, 2007).

Con el objetivo de estudiar la respuesta inmune en función del tiempo de evolución del estado diabético se desarrolló un modelo murino de diabetes tipo 1 utilizando dos cepas de ratones: BALB/cByJ y C57Bl/6J. En ambas cepas se arribó a un estado diabético caracterizado por una buena supervivencia sin la necesidad de administrar insulina exógena. Los ratones diabéticos C57Bl/6J presentaron glucemias más elevadas que los ratones BALB/cByJ, probablemente a causa de la diferente susceptibilidad de cada cepa al tratamiento con STZ. En numerosos trabajos donde se utilizaron distintos modelos experimentales de diabetes tipo 1, aplicados en diferentes cepas de ratones y ratas, se describió la participación de las citoquinas tipo Th1 y en particular del IFN y en el desarrollo de la diabetes (Huang y *col.*, 1994; Rabinovitch, 1998). Campbell y *col.* (1988), mediante la administración de IFN y junto con el tratamiento con STZ, lograron provocar un aumento mayor en las glucemias en comparación con lo obtenido al suministrar STZ únicamente. En concordancia con estos resultados, Herold y *col.* (1996) lograron una disminución en las glucemias de los ratones y previnieron la aparición de lesiones inflamatorias en el páncreas al administrar anticuerpos anti-IFN y junto con el tratamiento con STZ. En particular, Müller y *col.* (2002), utilizaron ratones de las cepas BALB/cByJ y C57Bl/6J a los que les indujeron la diabetes experimental con la aplicación de múltiples dosis bajas de STZ. Este tratamiento provocó un aumento en las citoquinas Th1, acompañado de una disminución en las citoquinas Th2 en los islotes pancreáticos de los ratones C57Bl/6J, con resultados opuestos para los BALB/cByJ. Teniendo en cuenta la bibliografía descripta, es previsible que los ratones de la cepa C57Bl/6J (con predominio de la respuesta tipo Th1) sean más sensibles al tratamiento con STZ que los ratones BALB/cByJ y por lo tanto, que adquieran glucemias más elevadas.

Al estudiar la presencia de cambios asociados a la producción de anticuerpos, se observó que luego de la inmunización con un antígeno T dependiente (GRc), la producción de anticuerpos tipo IgG (respuesta secundaria) disminuía en los ratones BALB/cByJ luego de transcurrido 1 mes desde la inducción del estado diabético. En tanto, la producción de IgM se vio afectada recién a los 6 meses de establecido el estado diabético. Estos resultados sugieren que la memoria inmunológica sería la principalmente comprometida. En este sentido, diversos estudios describieron la presencia de una alteración en la producción de anticuerpos luego de una inmunización llevada a cabo en individuos diabéticos. Es así que se observó una disminución en la producción de anticuerpos luego de una inmunización con antígenos T-dependientes (antígeno viral de la hepatitis A, toxina diftérica) en estos sujetos, mientras que la respuesta a un antígeno T-independiente (polisacárido del neumococo) fue normal (Eibl y *col.*, 2002). También se halló una depleción de las células CD4+ de memoria en los pacientes con diabetes (Moutschen y *col.*, 1992). Asimismo, se demostró en ratones diabéticos que la menor respuesta primaria y secundaria se debe a una alteración en las células T y en la actividad fagocítica de los macrófagos (Saiki y *col.*, 1980).

La respuesta inmune de los ratones BALB/cByJ, estudiada *in vitro* a través de la proliferación de linfocitos estimulados con mitógenos selectivos, se encontró disminuida luego de seis meses de inducido el estado diabético. De modo similar, una alteración en la respuesta inmune en pacientes con diabetes tipo 2 fue descripta por Chang y Shaio (1995). Las células mononucleares periféricas (linfocitos, monocitos, macrófagos y plasmáticas) presentaron una menor respuesta proliferativa cuando se las estimuló con el mitógeno fitohemoaglutinina con respecto a las células provenientes de pacientes sanos. Plouffe y *col.* (1978) observaron en pacientes diabéticos tipo 1 una menor respuesta de los linfocitos a los mitógenos fitohemoaglutinina y concanavalina A. También se han descripto otras alteraciones en el sistema inmune de pacientes diabéticos, por ejemplo una depresión en la función de los leucocitos polimorfonucleares, especialmente en presencia de acidosis. La adherencia, la quimiotaxis y la fagocitosis de los leucocitos también estaría afectada (Delamaire y *col.*, 1997; Gallacher y *col.*, 1995; Joshi y *col.*, 1999; Valerius y *col.*, 1982). Otton y *col.* (2004) demostraron un aumento en la apoptosis de linfocitos provenientes de ratas y de pacientes con diabetes, los cuales presentaban a su vez, un menor número de linfocitos circulantes.

Sin embargo, al estudiar la producción de anticuerpos en ratones diabéticos de la cepa C57Bl/6J sólo se encontró una reducción en la producción de IgG luego de 6

meses de inducido el estado diabético. En cuanto a la proliferación linfocitaria, no se encontraron cambios en ninguno de los tiempos estudiados.

Por otra parte, en las últimas décadas el estrés se ha incorporado como un factor importante de la vida diaria y se lo puede definir como un estado en donde se altera la homeostasis tanto psicológica como fisiológica. Es así que existen evidencias clínicas que avalan la participación del estrés en el desarrollo de diversas patologías psiquiátricas, en la alteración del sistema neuroendocrino y del sistema inmune e incluso que lo han relacionado al cáncer (Reiche y *col.*, 2004). En particular el estrés ha sido asociado con la instauración y evolución de la patología diabética en humanos. En tal sentido, se han descripto diferentes estudios en humanos, tal como el efectuado en Suecia (The Swedish Childhood Diabetes Study) con niños de entre 0 y 14 años recientemente diagnosticados con diabetes tipo 1. Se les realizó un cuestionario con el fin de conocer los acontecimientos a los que habrían estado expuestos durante el último año. Los resultados no mostraron diferencias en la frecuencia de eventos estresantes entre el grupo diabético y el grupo control, sin embargo la severidad de los mismos fue mayor en los niños que desarrollaron diabetes (Hägglöf y *col.*, 1991). De modo similar, Thernlund y *col.* (1995) realizaron un estudio en niños diabéticos tipo 1 de entre 0 y 14 años e investigaron los eventos a los que fueron expuestos los niños previo al desarrollo de la patología. Los autores encontraron que el grupo con diabetes presentaba una mayor frecuencia de eventos negativos ocurridos dentro de los primeros dos años de vida, como problemas de conducta y también conflictos familiares. Esto sugiere que la exposición a situaciones estresantes podría aumentar el riesgo de desarrollar diabetes tipo 1. En este contexto, resultó de interés estudiar el efecto del estrés sobre la instauración y evolución de la diabetes. Para esto, se eligieron dos modelos de estrés: uno homotrópico, como es el de inmovilización y otro heterotrópico como es el modelo de CMS. Los ratones fueron expuestos a los modelos de estrés previo o posteriormente a la inducción de la diabetes. Cuando los animales fueron expuestos al modelo homotrópico de estrés por inmovilización previo a la instauración de la diabetes, se observó un aumento considerable tanto de las glucemias como de los valores de hemoglobina glicosilada. De modo similar, Carter y *col.* (1987), observaron en ratas BB (modelo experimental que desarrolla espontáneamente diabetes) que el grupo expuesto a estresores tales como la inmovilización y el hacinamiento de forma repetida y alternada, desarrolló más tempranamente la patología que sus controles de igual edad no expuestos a estrés. En los mismos animales, Lehman y *col.* (1991) encontraron una mayor

incidencia de diabetes en el grupo que fue expuesto a diferentes estresores (rotación, vibración e inmovilización) con respecto al control.

Sin embargo, no todos los estudios sugieren los mismos resultados, tal es el caso del que fue realizado en Suecia (Diabetes Incidence Study in Sweden) y que incluyó a pacientes recientemente diagnosticados con diabetes tipo 1 de 15 a 34 años de edad. Los mismos debieron contestar un cuestionario acerca de su medio ambiente social, su nivel educativo, la frecuencia de aparición de diabetes en sus familias y los acontecimientos que hayan experimentado durante los 12 meses anteriores al diagnóstico. En esta oportunidad los resultados sugirieron que los factores psicosociales no estarían involucrados en el desarrollo de la enfermedad dado que los pacientes con diabetes habían experimentado menores conflictos que los controles (Littorin y *col.*, 2001). En este sentido, ensayos realizados en ratones NOD (desarrollan diabetes tipo 1 de manera espontánea) expuestos crónicamente a la inmovilización, el hacinamiento o a la combinación de ambos estresores mostraron una reducción en el desarrollo de la diabetes con respecto a los controles (Durant y *col.*, 1993).

En particular, en nuestro caso, cuando los ratones fueron expuestos al modelo de CMS en forma previa a la inducción del estado diabético no se observaron diferencias entre los animales diabéticos con o sin exposición al estrés. Sin embargo, el resultado fue el opuesto al exponer a los animales al estrés por inmovilización, en cuyo caso y como se describió anteriormente, se registró diferencias en los parámetros evaluados en circulación. Esta diferencia podría deberse a los distintos tipos de estresores utilizados.

Cuando la exposición a estrés fue realizada posteriormente a la inducción de la diabetes, los valores de glucemia y de hemoglobina glicosilada fueron más elevados en los ratones diabéticos expuestos a estrés (utilizando cualquiera de los dos modelos de estrés) en comparación con los ratones diabéticos. Estos resultados indican que el estrés empeora la evolución de la diabetes, lo que concuerda a su vez con diversos estudios clínicos que demostraron la existencia de un correlato positivo entre el estrés, la depresión, y el tratamiento y control de la glucemia en pacientes con diabetes tipo 1 y tipo 2 (Stenstrom y *col.*, 2003; Surwit y *col.*, 2002). En tal sentido, se efectuaron estudios en pacientes diabéticos tipo 1 en los que se empleó la determinación de hemoglobina glicosilada como medida del control glucémico y se les realizó un cuestionario con el fin de identificar eventos positivos (por ejemplo: casamiento, nacimiento de un hijo, cambio a un mejor trabajo, entre otros) y eventos

negativos (como ser conflictos interpersonales, muerte de alguien cercano, entre otros) durante un dado periodo. Los resultados mostraron que aquellos que estuvieron expuestos con mayor frecuencia a eventos negativos presentaron un peor control glucémico, mientras los que estuvieron expuestos a eventos positivos presentaron una mejora en el mismo (Lloyd y *col.*, 1999). Asimismo, Hanson y *col.* (1987) encontraron una relación directa entre el estrés y el control metabólico en adolescentes con diabetes tipo 1. Teniendo en consideración el efecto que produce el estrés en la evolución del estado diabético, no debemos olvidar cuando se trata de pacientes, que cada persona percibe el estrés y responde al mismo de manera diferente. En este sentido, Stabler y *col.* (1987) estudiaron el tipo de respuesta que presentaban niños diabéticos tipo 1 (de entre 8 y 16 años) ante un video juego. Los resultados indicaron que aquellos niños que presentaban una respuesta autonómica aumentada y un aumento en la glucemia luego de jugar, tenían además, los valores más altos de hemoglobina glicosilada, indicando un peor control glucémico en su vida diaria.

Con el fin de estudiar el efecto del estrés sobre la respuesta inmune en el estado diabético y los mecanismos neuroendocrinos implicados, se eligió para trabajar el modelo de CMS (diferentes estresores de sensibilidad media aplicados de manera alternada). Este modelo de estrés se asemeja al tipo de estresores al que se ve expuesto el hombre, que enfrenta diferentes e impredecibles situaciones de estrés diariamente. El esquema de CMS fue aplicado luego de la inducción del estado diabético.

En la cepa BALB/cByJ se observó una disminución en la sobrevida y un aumento en las glucemias de los ratones diabéticos expuestos a CMS, indicando una peor prognosis de la enfermedad. La aplicación del CMS no produjo aumento en las glucemias de los ratones controles, de modo similar a lo reportado por Harizi y *col.* (2007).

En cuanto a la respuesta inmune se observó que la diabetes produjo una disminución en la proliferación linfocitaria luego de 6 meses de su inducción. Sin embargo, aquellos ratones diabéticos expuestos al CMS presentaron una disminución en la proliferación de linfocitos T y B luego de 2 y 5 semanas de CMS respectivamente. Esto sugiere la necesidad de un periodo de interacción entre la alta glucosa y los linfocitos para generar el daño (6 meses de diabetes). No obstante, ante condiciones más extremas (tales como los mayores niveles de glucemia alcanzados por los animales diabéticos expuestos al CMS) los efectos deletéreos sobre el sistema inmune podrían presentarse en un lapso menor. Por otro lado, los ratones CMS

manifestaron una disminución en la proliferación de linfocitos T y un aumento en la proliferación de linfocitos B en concordancia con los resultados previos (Silberman y *col.*, 2002).

En respuesta al estrés, se activa el eje HPA liberando glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona en roedores) y el sistema nervioso simpático (SNS) que provoca la liberación de catecolaminas. Está descrito que estos mediadores regulan al sistema inmune (Genaro y *col.*, 1993; Marchetti y *col.*, 2001). Como estrategia experimental para evaluar estas respuestas se determinaron los niveles de corticosterona en plasma y de catecolaminas en el bazo debido a la importante inervación del SNS sobre este órgano (Hori y *col.*, 1995; Kim y *col.*, 2004). Los resultados mostraron un aumento en los niveles de corticosterona en respuesta al estrés en tiempos tempranos ya sea en los controles como así también en los diabéticos. También se observó un aumento aún mayor en los niveles de corticosterona en los ratones diabéticos no expuestos a CMS. Estos resultados sugieren que la corticosterona no estaría participando en la disminución de la respuesta inmune observada. En cuanto a los niveles de catecolaminas se observó un aumento en los ratones diabéticos expuestos al CMS. El análisis estadístico de estos resultados no mostró correlación significativa entre los niveles de corticosterona, catecolaminas y la disminución de la respuesta inmune. Por lo tanto, restaba investigar en que medida los efectos observados sobre el sistema inmune podían estar relacionados con cambios en los niveles circulantes de glucosa. En efecto, se encontró una correlación negativa entre los niveles de glucemia y la disminución de la proliferación linfocitaria tanto para linfocitos T como B, sugiriendo la participación de la hiperglucemia en los efectos deletéreos sobre la respuesta inmune aquí descriptos.

Todo esto condujo a evaluar los posibles mecanismos involucrados en el aumento de la glucemia observado en los ratones diabéticos expuestos a CMS. Se determinaron los niveles de insulina plasmáticos encontrándose que en los ratones diabéticos estaban reducidos con respecto a los controles, pero el CMS no tuvo efecto sobre los mismos, aún en los animales diabéticos expuestos a CMS. Estos resultados sugieren que esta hormona no estaría participando en el incremento diferencial de la glucemia como consecuencia de la aplicación del CMS. Por otro lado, la capacidad de los mediadores del estrés para elevar los niveles de glucosa disponible ha sido ampliamente documentada (Nonogaki 2000). Los glucocorticoides aumentan la gluconeogénesis y disminuyen la captación celular de la glucosa, mientras que las catecolaminas aumentan la glucogenólisis y la lipólisis. Es así que se evaluó si estos mediadores podían estar implicados. Se halló una correlación positiva entre los niveles

esplénicos de catecolaminas y las glucemias, lo que podría estar señalando al aumento en las catecolaminas (observado en los ratones diabéticos expuestos al CMS) como el responsable de las elevadas glucemias determinadas en este grupo de animales. Estos resultados están en concordancia con lo descrito por Bellush y Rowland (1989), quienes trabajaron con ratas diabéticas y demostraron que esta patología provocó una respuesta exagerada al estrés con aumento de las concentraciones de noradrenalina, tanto antes como luego de la aplicación de shock eléctrico plantal como agente estresor. Los autores demostraron que el aumento en la noradrenalina fue acompañado por un aumento en las glucemias, lo que indicaría un deterioro en el control de las glucemias especialmente en periodos de estrés. Lee y *col.* (1989) describieron un aumento en los niveles de catecolaminas en ratas diabéticas expuestas a estrés agudo.

A continuación, para evaluar el efecto del condicionamiento genético sobre los resultados observados en el efecto del estrés sobre la diabetes, se utilizaron ratones C57Bl/6J los cuales fueron tratados con STZ y luego expuestos al modelo de CMS. La inducción de la diabetes condujo a incrementos en las glucemias que fueron mayores a los registrados para la cepa BALB/cByJ. De modo similar a lo observado con la cepa BALB/cByJ, la exposición a CMS elevó aún más los niveles de glucemia. Sin embargo, y a diferencia de lo señalado anteriormente para la cepa BALB/cByJ, este significativo incremento de las glucemias no parece correlacionarse con la expectativa de vida de los ratones C57Bl/6J. En efecto, no se registraron cambios en la sobrevivencia de los mismos en ninguno de los grupos experimentales estudiados. Según se mencionó anteriormente, las citoquinas tipo Th1 participarían en el desarrollo de la diabetes. Asimismo, se describió que las mismas se encuentran elevadas en animales de la cepa C57Bl/6J expuestos a CMS durante seis semanas (Palumbo y *col.*, 2010). De esta manera, es posible postular que el CMS, a través del aumento de las citoquinas tipo Th1, propicie el agravamiento de la patología diabética.

En cuanto a la respuesta inmune, los ratones C57Bl/6J no presentaron cambios en la respuesta proliferativa linfocitaria en ninguno de los grupos estudiados. Es decir, que ni la diabetes, ni el estrés (ambos en forma independiente), ni el efecto combinado de ambos factores tuvieron efecto alguno en este sentido.

Cuando se evaluaron los mediadores neuroendocrinos del estrés, la concentración de corticosterona circulante y los niveles esplénicos de catecolaminas, los ratones de la cepa C57Bl/6J no mostraron cambios significativos en ninguno de los grupos estudiados. Sin embargo, se observó una tendencia al aumento en los niveles de corticosterona en los ratones diabéticos con respecto a los controles, a los CMS y a

los diabéticos + CMS. Este resultado se repitió de manera significativa en los ratones de la cepa BALB/cByJ. Existen numerosos autores que describieron una alteración del eje HPA en la diabetes, tanto en humanos (Roy y *col.*, 1993) como en modelos animales de esta patología (Chan y *col.*, 2003). Hudson y *col.* (1984) no lograron provocar la reducción del cortisol circulante mediante la administración de dexametasona (agonista de glucocorticoides) en individuos diabéticos, lo que implicaría la existencia de una alteración en la regulación negativa del eje HPA en estos pacientes. Más recientemente, Chan y *col.* (2002) demostraron que ratas diabéticas (tratadas con STZ) presentaban niveles más altos de corticosterona que sus controles, pero si eran expuestas a estrés por inmovilización el resultado se invertía: los controles tenían mayores niveles de corticosterona que los diabéticos. Si administraban CRH o ACTH obtenían el mismo resultado, pero al aplicar dexametasona, el efecto era opuesto, o sea mayores niveles de corticosterona en los diabéticos. Todos estos resultados sugieren que en la diabetes existiría cierto grado de inhibición de la regulación negativa del eje HPA y una atenuación de la respuesta frente al estrés. Chopra y *col.* (1968) y Coiro y *col.* (1995) encontraron resultados similares en humanos: una menor respuesta del paciente con diabetes frente a la administración de CRH y de ACTH respectivamente. Estos resultados, así como también los nuestros, sugieren que la diabetes cursa con hiperactivación basal del eje HPA, pero que frente al estrés presentan una respuesta deteriorada probablemente debido a la pérdida de sensibilidad por parte de la hipófisis y de la glándula adrenal.

Los resultados obtenidos hasta aquí permiten afirmar que la diabetes deteriora la respuesta inmune en la cepa BALB/cByJ, a través de una disminución de la proliferación linfocitaria y que el estrés disminuye el tiempo necesario para que se produzca dicha alteración (6 meses de diabetes y entre 2 y 5 semanas cuando la diabetes se combinó con el estrés). Asimismo, esta disminución de la proliferación linfocitaria estaría asociada al aumento en la glucemia. La hiperglucemia se identificó como el factor principal que, a través de mecanismos directos o indirectos, contribuye a generar las complicaciones asociadas a la diabetes (Nathan y *col.*, 2005; Stratton y *col.*, 2000; The DCCT Group, 1993; UKPDS 33, 1998) e incluso, se asoció a cada incremento en 1 mmol/l de la glucemia con un aumento del 10,6 % en el riesgo de sufrir neumonía, infecciones urinarias o infecciones en la piel (Benfield y *col.*, 2007). Dado que la hiperglucemia ha sido relacionada tan estrechamente con la aparición de diversas infecciones, con la severidad de las mismas y con un mal pronóstico en cuanto a su evolución, resultó de interés estudiar el efecto que ejerce el incremento en



la concentración de glucosa sobre la respuesta inmune. Adicionalmente, si bien numerosos estudios poblacionales (The DCCT Group, 1993; UKPDS 33, 1998) mostraron que aquellos pacientes, que recibieron un tratamiento intensivo con insulina para lograr un adecuado control de la glucemia, podían demorar el desarrollo y la progresión de las complicaciones clásicamente asociadas con la diabetes, los efectos de la alta glucosa sobre las células linfocitarias no fueron estudiados previamente.

Por otro lado, a pesar que en la cepa C57Bl/6J los ratones diabéticos presentaron glucemias más elevadas que los ratones BALB/cByJ, no se observaron diferencias en la proliferación linfocitaria. Estos resultados podrían asociarse con aquellos individuos diabéticos que presentan una evolución normal frente a un proceso infeccioso (Chang y *col.*, 2004; Thomsen y *col.*, 2004), sugiriendo la participación de un condicionamiento genético individual.

Por lo tanto, se estudió el efecto de la hiperglucemia sobre la respuesta inmune mediante el análisis de la acción que ejerce el incremento en la concentración de glucosa presente en el medio de cultivo sobre linfocitos normales provenientes de ratones BALB/cByJ y C57Bl/6J.

Los resultados mostraron que los altos niveles de glucosa en el medio de incubación provocaron la reducción, concentración dependiente, de la viabilidad tanto de linfocitos T como B provenientes de ratones BALB/cByJ. En esta disminución de la viabilidad celular participa un incremento en la inducción de apoptosis. Luego de la incubación en presencia de altas concentraciones de glucosa se observó un incremento de la apoptosis tanto en células provenientes de ganglio como de bazo. Resultados similares fueron observados por otros autores en cuanto a la acción de alta glucosa en células endoteliales (Baumgartner-Parzer y *col.*, 1995; Du y *col.*, 1998; Wu y *col.*, 1999). De manera similar, Zhang y *col.* (2008) observaron una disminución en la proliferación y un aumento en la apoptosis al incubar células progenitoras endoteliales con alta glucosa. La incubación con altas concentraciones de manitol, isómero no reductor de la glucosa, no tuvo ningún efecto sobre la inducción de la apoptosis, demostrando que los efectos proapoptóticos de la glucosa son independientes de la alta osmolaridad. Esto coincide con otros trabajos científicos, donde la inducción de la apoptosis generada por la alta glucosa en células endoteliales tampoco pudo ser reproducida por la exposición a altas concentraciones de manitol (Du y *col.*, 1998; Wu y *col.*, 1999). Además, está descrito que la alta glucosa puede inducir apoptosis en otros tipos celulares como las células de los nervios retinales (Barber, 2003) y de la aorta (Chu y *col.*, 1997).

Por otro lado, a diferencia de lo señalado para la cepa BALB/cByJ, no se observó reducción de la viabilidad en linfocitos provenientes de ratones C57Bl/6 incubados con glucosa 0,5 g% y 1 g%.

Al estudiar la proliferación linfocitaria se observó que la incubación de células de ganglio y de bazo provenientes de ratones normales BALB/cByJ en un medio conteniendo alta glucosa provocó una disminución de la proliferación estimulada por mitógenos selectivos para linfocitos T y B. Este efecto inhibitorio que ejerció la alta glucosa sobre la proliferación celular se incrementó de forma concentración dependiente. Sin embargo, este efecto nocivo de la alta glucosa *in vitro* fue revertido cuando los linfocitos, previamente incubados con altas concentraciones de glucosa, fueron lavados para remover este exceso y su proliferación fue estimulada en un medio estándar. Cuando, como control, se realizó la incubación con manitol no se observó la disminución en la proliferación, descartando la participación del estrés osmótico en las alteraciones observadas. Los efectos inhibitorios de la alta glucosa sobre la proliferación también fueron observados en otros tipos celulares, como en las células endoteliales (Graier y *col.*, 1995; Umeda y *col.*, 1991), en los pericitos del capilar de la retina (Chibber y *col.*, 1994) y en las células mesangiales (Nahman y *col.*, 1992; Trachtman y *col.*, 1994). Contrariamente, la proliferación de linfocitos provenientes de ratones C57Bl/6J no fue afectada por concentraciones de glucosa de 0.5 g% y de 1 g% en el medio de cultivo. Swenne y Andersson (1984) describieron una mayor proliferación en islotes pancreáticos incubados con alta glucosa provenientes ratones de la cepa C57Bl/6J con respecto a aquellos provenientes de ratones C57Bl/KsJ, sugiriendo que la respuesta proliferativa ante la alta glucosa está determinada por el entorno genético.

Muchos mecanismos han sido propuestos para explicar los efectos deletéreos de la alta glucosa. No obstante, está extensamente aceptado que las condiciones de hiperglucemia inducen un aumento en el estrés oxidativo en una gran variedad de tejidos y tipos celulares (Giugliano y *col.*, 1996). Los resultados obtenidos para la cepa BALB/cByJ concuerdan con estas observaciones. La incubación por 24 hs de células provenientes de ganglio y de bazo en presencia de altas concentraciones de glucosa provocó un aumento en el estrés oxidativo, cuantificado por la determinación de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y de la presencia de peroxidación lipídica (formación de MDA). Altas concentraciones de manitol no estimularon el aumento en la producción de ROS como así tampoco en la peroxidación lipídica, indicando que los efectos observados son específicos de la alta glucosa y no son producto de la alta osmolaridad.

La producción de ROS es un mecanismo normal en la célula y en muchos casos las ROS, a bajas concentraciones, pueden actuar como mensajeros intracelulares que responden a citoquinas y factores de crecimiento específicos (Burdon, 1995). Particularmente, se describió que la presencia de ROS es necesaria para la activación y proliferación de linfocitos (Hunt y *col.*, 1991; Schreck y Baeuerle, 1991; Whitacre y *col.*, 1992; Zhang y *col.*, 2002). Sin embargo, mientras que los niveles bajos de ROS pueden ser necesarios para la activación de las células T (Hunt y *col.*, 1991; Novogrodsky y *col.*, 2002; Zhang y *col.*, 2002), el incremento en su concentración induce la supresión de su respuesta proliferativa (Roth y Droge, 1987; Suthanthiram y *col.*, 1990). Por otra parte, varios trabajos demostraron que el estrés oxidativo intracelular inicia procesos apoptóticos en las células T (Buttke y Sandstrom, 1995; Chlichlia y *col.*, 2002). Se sugirió que el estrés oxidativo jugaría un papel importante en el desarrollo de la inmunodeficiencia (Buttke y Sandstrom, 1995) y que podría estar implicado en la apoptosis de células T tanto en los pacientes infectados con HIV (Aukrust y *col.*, 1995 b) como aquellos con otras inmunodeficiencias (Aukrust y *col.*, 1995 a).

Por otro lado, los linfocitos provenientes de ratones normales de la cepa C57Bl/6J incubados con alta glucosa no presentaron aumento en el estrés oxidativo, ni a través de la medición de la producción de ROS ni en la formación de MDA. De esta forma, se encontró que la alta glucosa puede generar un aumento en el estrés oxidativo (dependiendo de la cepa) que puede inducir la apoptosis (Ceriello y *col.*, 1996). En particular, las diferencias observadas entre ambas cepas sugieren que el estrés oxidativo estaría involucrado en las alteraciones inmunológicas vistas en los linfocitos provenientes de ratones BALB/cByJ en presencia de alta glucosa. Para corroborar esta hipótesis, se evaluó el efecto de una droga con acción antioxidante a nivel linfocitario. El NAC impidió la producción de estrés oxidativo, la disminución de la proliferación linfocitaria y el incremento de la muerte celular que ocasiona la presencia de glucosa 1 g% en el medio de cultivo, confirmando que los efectos deletéreos de esa concentración de glucosa están mediados por el aumento del estrés oxidativo. En este sentido, Lamers y *col.* (2011) encontraron una disminución de la migración celular en fibroblastos incubados con alta glucosa. Asimismo, describieron un aumento en la generación de ROS que fue inhibido en presencia de NAC. Además, el NAC revirtió los efectos deletéreos en la migración celular provocados por la alta glucosa. De modo similar, Kim y *col.* (2011), encontraron que otro antioxidante (pycnogenol) fue capaz de revertir los efectos causados por la alta glucosa sobre las células tubulares renales,

entre los cuáles se incluyen cambios morfológicos, disminución de la viabilidad y aumento de la apoptosis.

Con relación a los linfocitos provenientes de los ratones C57Bl/6J, los mismos serían capaces de activar determinados mecanismos antioxidantes, que al impedir el aumento del estrés oxidativo ante la presencia de alta glucosa, evitarían también los efectos deletéreos de la misma. Por este motivo, se analizaron los mecanismos antioxidantes presentes en ambas cepas de ratones. Las altas concentraciones de glucosa en cultivo disminuyeron la capacidad antioxidante total de los linfocitos provenientes de ganglios de ratones BALB/cByJ. Por el contrario, la misma población linfocitaria proveniente de ratones C57Bl/6J, presentó un aumento de la capacidad antioxidante total en presencia de altas concentraciones de glucosa. De esta manera, linfocitos provenientes de la cepa C57Bl/6J fueron capaces de contrarrestar el efecto de la alta glucosa aumentando sus defensas antioxidantes y evitando así, el aumento dañino del estrés oxidativo.

La determinación de cada una de las distintas enzimas y moléculas antioxidantes es una tarea compleja ya que las técnicas existentes son poco sensibles y reproducibles. Aún así, se evaluó el contenido de glutatión. Los resultados obtenidos no mostraron un efecto del tratamiento con alta glucosa sobre los niveles de glutatión total ni tampoco en la relación GSH/GSSG.

De todas formas, resultan llamativas las diferencias observadas entre las células provenientes de ganglios de ambas cepas incubadas en condiciones normales de glucosa (0,2 g%). Las células de la cepa C57Bl/6J presentaron una mayor concentración de ROS, menor capacidad antioxidante total, menores niveles de glutatión total, pero una mayor relación GSH/GSSG es decir, mayor GSH disponible que los de la cepa BALB/cByJ. Esto sugiere que los ratones C57Bl/6J en el estado fisiológico presentarían mayores concentraciones de ROS; no obstante el mayor nivel de GSH disponible permitiría una metabolización más eficiente de distintos compuestos tóxicos. Uno de ellos podría ser el metilglioxal, que se produce naturalmente como un subproducto de diferentes rutas metabólicas, principalmente la glicolisis (Kalapos 1999), aumenta en presencia de hiperglucemia (McLellan y col., 1994) y se considera que estaría implicado en el desarrollo de las complicaciones de la diabetes (Thornalley y col., 1989). El metilglioxal se metaboliza a través del sistema glioxalasa con la participación del glutatión (Racker, 1951). Estos conceptos sugieren que, en nuestro modelo, la alta glucosa podría incrementar la producción de metilglioxal que sería metabolizado más eficientemente en los ratones C57Bl/6J que en los BALB/cByJ dado que los primeros cuentan con mayores niveles de GSH

disponibles. Como consecuencia, los efectos citotóxicos del metilglioxal se manifestarían en los ratones BALB/cByJ y no en los C57Bl/6J. Los resultados obtenidos utilizando el antioxidante NAC avalan esta hipótesis. El NAC es un precursor del glutatión y la incubación con NAC provocó un aumento en los niveles de glutatión (resultados no mostrados) que permitirían la metabolización de este compuesto. Thornalley y *col.* (1996) encontraron en pacientes con diabetes una correlación negativa entre los niveles de GSH y las complicaciones que presentaron los mismos. Es decir que a menores niveles de GSH los pacientes desarrollaron mayores complicaciones como ser retinopatías, neuropatías y nefropatías. A su vez, los menores niveles de GSH aumentaron las concentraciones de metilglioxal, lo que explicaría el mayor daño producido. Además, encontraron una correlación negativa entre la glucemia y el contenido de GSH. Adicionalmente, el metilglioxal tendría un efecto directo sobre el sistema inmune. La incubación de células mononucleares de sangre periférica con metilglioxal provocó la disminución del marcador CD83 (marcador de maduración) en células dendríticas y monocitos y redujo la potencia de las células dendríticas para estimular a los linfocitos T (Price y *col.*, 2004). Posteriormente, los mismos autores encontraron que la disminución en el marcador CD83 fue revertida por la incubación con NAC y que el metilglioxal alteró la expresión de IFN  $\gamma$ , TNF  $\alpha$  e IL-10, disminuyó la expresión del MHC-I y provocó la apoptosis en células mieloides (Price y *col.*, 2010).

Asimismo, está descrito que el metilglioxal puede aumentar la producción de ROS. La formación de metilglioxal puede generar  $H_2O_2$  y radical superóxido como subproductos y su degradación puede producir  $H_2O_2$  y otras especies radicales (Kalapos y *col.*, 2008). Además, el tratamiento de distintos tipos celulares con metilglioxal provoca el aumento de ROS (Kalapos y *col.*, 2008). A su vez, el metilglioxal puede alterar las defensas antioxidantes como el glutatión, la glutatión peroxidasa y SOD, entre otras (Kang, 2003; Di Loreto y *col.*, 2008).

Los resultados obtenidos para células provenientes de bazo no son coincidentes con lo observado para las células de ganglio. Esto podría deberse a la mayor heterogeneidad poblacional presente en el bazo. Entre otras células se encuentran linfocitos B, linfocitos T, NK y macrófagos (Burmester y Pezzutto, 2003).

También, se describe que las altas concentraciones de glucosa podrían activar vías alternativas como ser, la activación de PKC, formación de AGEs y activación de la vía del poliol entre otras, que a su vez podrían estar interrelacionadas entre sí. Por un lado, el diacilglicerol (DAG), un activador de la PKC, puede aumentar como consecuencia del alto metabolismo de la glucosa a través de una síntesis "de novo".

Esto, a su vez, puede estimular la generación de los radicales libres (Ceriello y *col.*, 1996; Evans y *col.*, 2002). Otros trabajos proponen una activación de PKC mediada por el estrés oxidativo (Cosio, 1995; Inoguchi y *col.*, 2000; Inoguchi y *col.*, 2003; Sonta y *col.*, 2004). Además, la activación de la vía del poliol generando fructosa produce la disminución de las reservas de NADPH y GSH, aumentando el estrés oxidativo (Stevens y *col.*, 1993; 2000).

En base a estos antecedentes, no se puede descartar el aporte de alguna de estas otras vías sobre los efectos observados de la alta glucosa, pero es claro que se puede asignar al estrés oxidativo una participación clave sobre la actividad linfocitaria.

En este trabajo resultan evidentes las diferencias encontradas en las cepas estudiadas. De modo similar, Qi y *col.* (2005) caracterizaron la gravedad de la nefropatía diabética en seis cepas de ratones: C57Bl/6J, DBA/2J, FVB/NJ, MRL/MpJ, A/J y KK/HIJ induciendo la diabetes a través de la administración de múltiples dosis de STZ. Sin la administración de insulina, la mayoría de los ratones diabéticos sobrevivieron más de 25 semanas. Luego de este período se observó un aumento de la mortalidad en la mayoría de las cepas estudiadas, sobre todo en las cepas DBA/2J, KK/HIJ y A/J. En contraste, los ratones C57Bl/6J toleraron bien la hiperglucemia persistente e incluso, un grupo de ratones diabéticos de esta cepa sobrevivieron más de 45 semanas a pesar de los altos niveles de glucemia (300-600 mg/dl). Con respecto a la lesión renal, los ratones de las cepas DBA/2J y KK/HIJ desarrollaron mayor daño que los ratones de las cepas C57Bl/6J, MRL/MpJ y A/J. Todo esto pone de manifiesto que se debe tener en cuenta el condicionamiento genético al momento de elegir una cepa para un determinado estudio.

Resumiendo, en este trabajo se demostró que la respuesta inmune de los ratones diabéticos de la cepa BALB/cByJ determinada *in vivo* e *in vitro* resultó afectada, a diferencia de lo ocurrido en los ratones de la cepa C57Bl/6J. A continuación se investigó el efecto del estrés sobre la respuesta inmune en la diabetes encontrando que en los ratones diabéticos de la cepa BALB/cByJ el estrés provocó alteraciones más tempranas sobre la proliferación linfocitaria probablemente mediadas por el aumento en la glucemia. En cuanto al efecto sobre la cepa C57Bl/6J, sólo se encontró un aumento en las glucemias sin estar presente la alteración en el sistema inmune. Luego se analizó el efecto de altas concentraciones de glucosa sobre la actividad linfocitaria normal. Las mismas afectaron directamente la proliferación y condujeron a la muerte celular sobre los linfocitos provenientes de la cepa BALB/cByJ,

mientras que en linfocitos provenientes de la cepa C57Bl/6J la glucosa 1 g% no tuvo efecto. El mecanismo que estaría implicado en los efectos deletéreos de la alta glucosa sería el aumento en el estrés oxidativo.

Por otro lado, existen evidencias clínicas en las cuales los pacientes con diabetes, al optimizar el control de la glucemia, mejoran la función inmune. Aunque la extrapolación de este trabajo a los pacientes afectados por la patología diabética se debe manejar con precaución, se puede sugerir que la exposición a altas concentraciones de glucosa podría conducir a una disminución en la proliferación linfocitaria y a un aumento en la muerte celular. Por ende podemos señalar a la hiperglucemia como un factor importante que contribuiría al estado de inmunosupresión observado en los pacientes con diabetes. Sin embargo se debe tener en cuenta que la base genética puede condicionar la evolución de los pacientes con diabetes frente a un proceso infeccioso lo que sugiere que es necesaria una medicina más personalizada, más dirigida y adaptada a cada paciente en particular.

# **CONCLUSIONES**

---



En ratones BALB/cByJ:

- La diabetes indujo:
  - Disminución en la producción de anticuerpos de tipo IgG al mes de inducido el estado diabético.
  - Disminución en la producción de anticuerpos de tipo IgM a los seis meses de inducido el estado diabético.
  - Disminución de la respuesta proliferativa a los seis meses de inducido el estado diabético.
  
- La exposición al CMS luego de la inducción de la diabetes indujo:
  - Disminución en la respuesta proliferativa a partir de 2da y 5ta semana de CMS para linfocitos T y B respectivamente.
  - Aumento en catecolaminas.
  - Correlación negativa entre glucemia y proliferación.
  - Correlación positiva entre catecolaminas y glucemia.
  
- La incubación de linfocitos normales con alta glucosa provocó:
  - Disminución en la viabilidad y aumento en la apoptosis.
  - Disminución en la respuesta proliferativa.
  - Aumento en el estrés oxidativo.
  - Disminución en la capacidad antioxidante total.

En ratones C57Bl/6J:

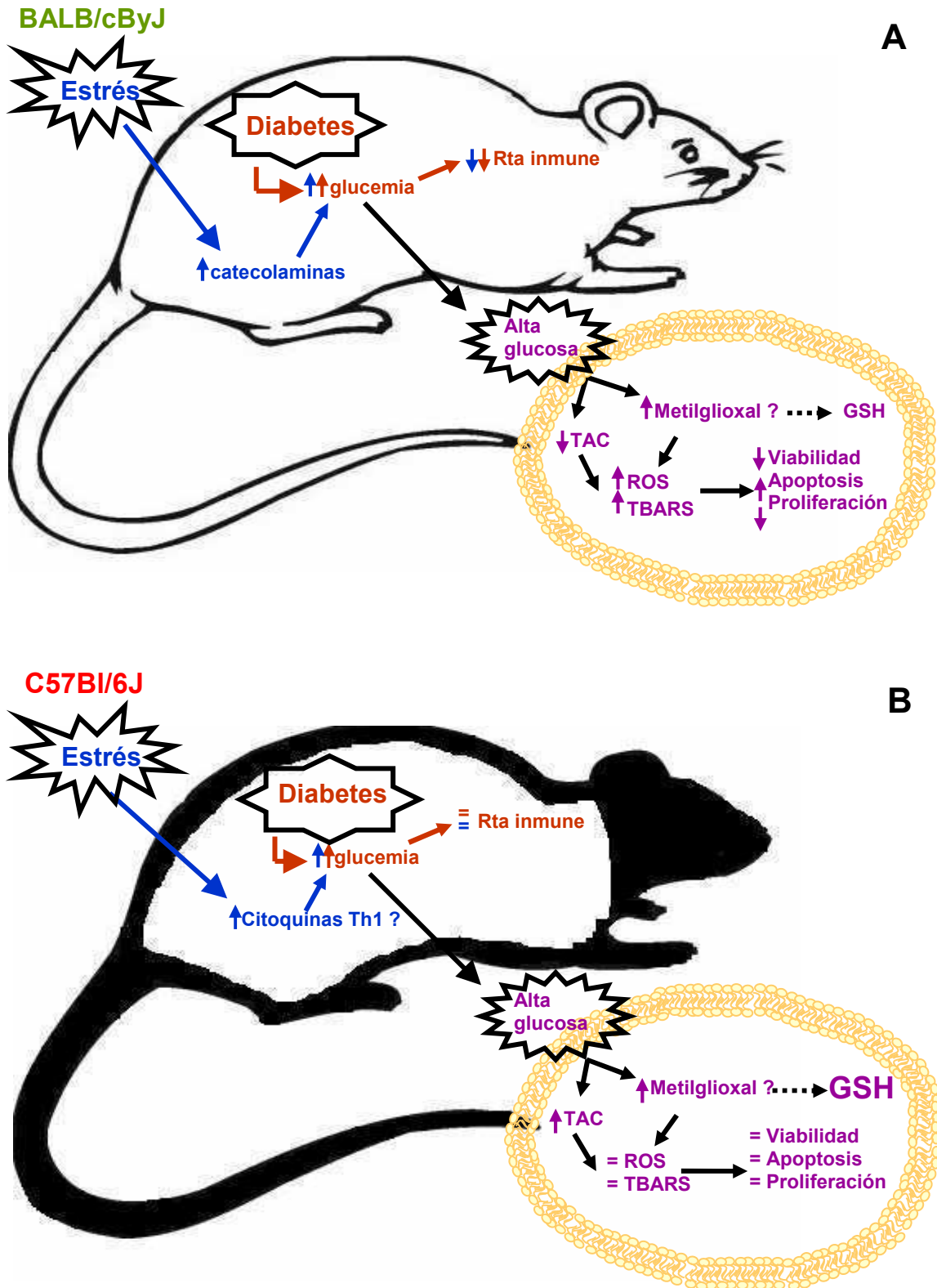
- La diabetes indujo:
  - Disminución en la producción de anticuerpos de tipo IgG a los seis meses de inducido el estado diabético.
  
- La exposición al CMS luego de la inducción de la diabetes **no** indujo:
  - Cambios en la respuesta proliferativa.
  - Cambios en corticosterona y catecolaminas.
  
- La incubación de linfocitos normales con alta glucosa **no** provocó:
  - Cambios en la viabilidad y en la apoptosis.
  - Cambios en la respuesta proliferativa.
  - Cambios en el estrés oxidativo.

Indujo:

- Aumento en la capacidad antioxidante total.

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos concluir que en el ratón BALB/cByJ la diabetes produce un aumento en la glucemia que induce una disminución en la respuesta inmune. Cuando el ratón diabético es expuesto a CMS, se observa un aumento en las catecolaminas que conllevaría a un aumento aún mayor en la glucemia con un deterioro más temprano en la respuesta inmune. Cuando se estudió el efecto de la alta glucosa sobre la actividad linfocitaria normal, encontramos que la misma induce una disminución en la capacidad antioxidante total que genera un aumento en ROS y en TBARS, provocando un aumento en la apoptosis, disminución en la viabilidad y en la proliferación linfocitaria. Asimismo, la alta glucosa podría generar un aumento en los niveles de metilglioxal, el cual no podría ser metabolizado en su totalidad por los niveles de GSH presentes (figura 38, panel A).

En los ratones C57Bl/6J, la diabetes produce un aumento en la glucemia pero sin generar la disminución en la respuesta inmune. Cuando el ratón diabético es expuesto a CMS, se observa un aumento aún mayor en las glucemias que podría estar provocado por un aumento en las citoquinas tipo Th1. Cuando evaluamos el efecto de la alta glucosa sobre la actividad linfocitaria normal, observamos que la misma induce un aumento en la capacidad antioxidante total, evitando el aumento en ROS y en TBARS, evitando los efectos deletéreos sobre los linfocitos. Asimismo, la alta glucosa podría generar mayores niveles de metilglioxal que sería metabolizado por los mayores niveles de GSH (figura 38, panel B).



**Figura 38: Esquema del modelo propuesto.**

**Panel A:** Modelo propuesto para la cepa BALB/cByJ. **Panel B:** Modelo propuesto para la cepa C57Bl/6J. TAC: capacidad antioxidante total; ROS: especies reactivas del oxígeno; TBARS: especies que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico; GSH: glutatión reducido.

Lic. Mara Roxana  
Rubinstein Guichón

Dra. Miriam R. Wald

Dra. Ana M. Genaro

# **BIBLIOGRAFÍA**

---

- 
- Abbas, AK, Lichtman AH. **Cellular and Molecular Immunology**. 5th Edition. 2003, Editorial Saunders.
- Accilli D. **New perspectives in diabetes research and treatment**. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11(9):349-350.
- Achenbach P, Bonifacio E, Koczwara K, Ziegler AG. **Natural history of type 1 diabetes**. *Diabetes* 2005; 54(2):S25-S31.
- Adcock IM, Ito K. **Molecular mechanisms of corticosteroid actions**. *Monaldi Arch Chest Dis* 2000; 55:256-266.
- Akerboom TP, Bilizer MM, Sies H. **The relationship of biliary GSSG efflux and intracellular GSSG content in perfused rat liver**. *J Biol Chem* 1982; 257:4248–4252.
- Alfonso J, Frick LR, Silberman DM, Palumbo ML, Genaro AM, Frasch AC. **Regulation of hippocampal gene expression is conserved in two species subjected to different stressors and antidepressant treatments**. *Biol Psychiatry* 2006; 59(3):244-51.
- American Diabetes Association. **Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus**. *Diabetes Care* 2010; 33(1):S62-S69.
- Antunes F, Cadenas E. **Estimation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gradients across biomembranes**. *FEBS Lett* 2000; 475:121-126.
- Appel SJ, Wadas TM, Rosenthal RS, Ovalle F. **Latent autoimmune diabetes of adulthood (LADA): An often misdiagnosed type of diabetes mellitus**. *J Am Acad Nurse Pract* 2009; 21:156-159.
- Arriza JL, Simerly RB, Swanson LW, Evans RM. **The neuronal mineralocorticoid receptor as a mediator of glucocorticoid response**. *Neuron* 1988; 1(9):887-900.

Atsuta J, Plitt J, Bochner BS, Schleimer RP. **Inhibition of VCAM-1 expression in human bronchial epithelial cells by glucocorticoids.** *Am J Resp Cell Mol Biol* 1999; 20:643-50.

Aukrust P, Svardal AM, Muller F, Lunden B, Berge RK, Froland SS. **Decreased levels of total and reduced glutathione in CD4+ lymphocytes in common variable immunodeficiency are associated with activation of the tumor necrosis factor system: possible immunopathogenic role of oxidative stress.** *Blood* 1995; 86(4):1383-91.

Aukrust P, Svardal AM, Muller F, Lunden B, Berge RK, Ueland PM, Froland SS. **Increased levels of oxidized glutathione in CD4+ lymphocytes associated with disturbed intracellular redox balance in human immunodeficiency virus type 1 infection.** *Blood* 1995; 86(1):258-67.

Autenrieth IB, Beer M, Bohn E, Kaufmann SH, Heesemann J. **Immune responses to Yersinia enterocolitica in susceptible BALB/c and resistant C57BL/6 mice: an essential role for gamma interferon.** *Infect Immun* 1994; 62(6):2590-9.

Bailey C. **Potencial new treatments for type 2 diabetes.** *TIPS* 2000; 21:259-265.

Baker MA, Cerniglia GJ, Zaman A. **Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples.** *Anal Biochem* 1990; 190(2):360-5.

Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. **Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases.** *Biol Chem* 2009; 390(3): 191–214.

Barber AJ. **A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye.** *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003; 27(2):283-90.

Baumgartner-Parzer SM, Wagner L, Pettermann M, Grillari J, Gessl A, Waldhausl W. **High-glucose--triggered apoptosis in cultured endothelial cells.** *Diabetes* 1995; 44(11):1323-7.

- Baynes JW. **Role of oxidative stress in the development of complications in diabetes.** *Diabetes* 1991; 40:405-412.
- Bellush LL, Rowland NE. **Stress and behavior in streptozotocin diabetic rats: Biochemical correlates of passive avoidance learning.** *Behav Neurosci* 1989; 103(1):144–150.
- Benfield T, Jensen JS, Nordestgaard BG. **Influence of diabetes and hyperglycaemia on infectious disease hospitalisation and outcome.** *Diabetologia* 2007; 50(3):549-54.
- Bertoni AG, Saydah S y Brancati FL. **Diabetes and the risk of infection-related mortality in the U.S.** *Diabetes Care* 2001; 24:1044-9.
- Bishop GR, Jaso-Friedmann L, Evans DL. **Activation-induced programmed cell death of nonspecific cytotoxic cells and inhibition by apoptosis regulatory factors.** *Cell Immunol* 2002; 199:126-37.
- Boumpas DT, Chrousos GP, Wilder RL, Cupps TR, Balow JE. **Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates.** *Ann Intern Med* 1993; 119: 1198-1208.
- Boyko EJ, Lipsky BA. **Infection and diabetes**, en Diabetes in America. Harris MI, Cowie CC, Stern MP, Boyko EJ, Reiber GE, Bennet PH, editores. *National Institutes of Health*, Washington, DC, 1995; 485-499.
- Brownlee M. **Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications.** *Nature* 2001; 414:813-820.
- Buege JA, Aust SD. **Microsomal lipid peroxidation.** *Methods in Enzymol* 1979; 52:302-310.
- Burdon RH. **Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation.** *Free Radic Biol Med* 1995; 18:885-794.



- Burmester G, Pezzutto A (Eds). **Fundamental Principles-Organs of the lymphatic system-Peripheral organs en Color Atlas of Immunology**, N. York-USA. Thieme, 2003, p8-19.
- Butler SO, Btaiche IF, Alaniz C. **Relationship between hyperglycemia and infection in critically ill patients**. *Pharmacotherapy* 2005; 25(7):963-76.
- Buttke TM, Sandstrom PA. **Redox regulation of programmed cell death in lymphocytes**. *Free Radic Res* 1995; 22(5):389-97.
- Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, y col. **International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors**. *Pharmacol Rev* 1994; 46:121-36.
- Campbell IL, Oxbrow L, Koulmanda M, Harrison LC. **IFN- $\gamma$  Induces Islet Cell MHC Antigens and Enhances Autoimmune, Streptozotocin-Induced Diabetes in the Mouse**. *J Immunol* 1988; 140(4):1111-1116.
- Carter WR, Herrman J, Stokes K, Cox DJ. **Promotion of diabetes onset by stress in the BB rat**. *Diabetologia* 1987; 30(8):674-5.
- Cazaux CA, Sterin-Borda L, Gorelik G, Cremaschi GA. **Down-regulation of beta-adrenergic receptors induced by mitogen activation of intracellular signaling events in lymphocytes**. *FEBS lett* 1995; 364(2):120-4.
- Ceriello A, dello Russo P, Amstad P, Cerutti P. **High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture. Evidence linking hyperglycemia and oxidative stress**. *Diabetes* 1996; 45(4):471-7.
- Chan O, Inouye K, Riddell MC, Vranic M, Matthews SG. **Diabetes and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis**. *Minerva Endocrinol* 2003; 28:87-102.
- Chan O, Inouye K, Vranic M, Matthews SG. **Hyperactivation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in streptozotocin-diabetes is associated with**

- reduced stress responsiveness and decreased pituitary and adrenal sensitivity.** *Endocrinology* 2002; 143:1761–1768.
- Chang CF, Kuo BI, Chen TL, Yang WC, Lee SD, Lin CC. **Infective endocarditis in maintenance hemodialysis patients: fifteen years' experience in one medical center.** *J Nephrol* 2004; 17(2):228-35.
- Chang FY, Shaio MF. **Decreased cell-mediated immunity in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus.** *Diabetes Res Clin Pract* 1995; 28:137-146.
- Chelikani P, Fita I, Loewen PC. **Diversity of structures and properties among catalases.** *Cell Mol Life Sci* 2004; 61:192-208.
- Chibber R, Molinatti PA, Wong JS, Mirlees D, Kohner EM. **The effect of aminoguanidine and tolrestat on glucose toxicity in bovine retinal capillary pericytes.** *Diabetes* 1994; 43(6):758-63.
- Chlichlia K, Los M, Schulze-Osthoff K, Gazzolo L, Schirmacher V, Khazaie K. **Redox events in HTLV-1 Tax-induced apoptotic T-cell death.** *Antioxid Redox Signal* 2002; 4(3):471-7.
- Chopra IJ, Ahuja MM, Shankar PU. **Assessment of pituitary-adrenal function in young diabetics in relation to ketosis.** *Indian J Med Res* 1968; 56:45–56.
- Christiansen C, Toft P, Jorgensen HS, Andersen SK, Tonnesen E. **Hyperglycaemia and mortality in critically ill patients. A prospective study.** *Intensive Care Medicine* 2004; 30:1685-1688.
- Chu Y, Faraci FM, Ooboshi H, Heistad DD. **Increase in TUNEL positive cells in aorta from diabetic rats.** *Endothelium* 1997; 5(4):241-50.
- Coiro V, Volpi R, Capretti L, Speroni G, Caffarra P, Scaglioni A, Malvezzi L, Castelli A, Caffarri G, Rossi G, Chiodera P. **Low-dose corticotrophinreleasing hormone stimulation test in diabetes mellitus with or without neuropathy.** *Metabolism* 1995; 44:538–542.

- Cosio FG. **Effects of high glucosa concentrations on human mesangial cell proliferation.** *J Am Soc Nephrol* 1995; 5:1600-1609.
- de Kloet ER, Joëls M, Holsboer F. **Stress and the brain: from adaptation to disease.** *Nat Rev Neurosci* 2005; 6(6):463-75.
- DeFronzo RA. **Patogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes.** *Diabetes Rev* 1997; 5:177-269.
- Delamaire M, Maugendre D, Moreno M, Le Goff MC, Allannic H, Genetet B. **Impaired leucocyte functions in diabetic patients.** *Diabet Med* 1997; 14:29-34.
- Diaz Vivancos P, Wolff T, Markovic J, Pallardó FV, Foyer CH. **A nuclear glutathione cycle within the cell cycle.** *Biochem J* 2010; 431:169–178.
- Di Loreto S, Zimmitti V, Sebastiani P, Cervelli C, Falone S, Amicarelli F. **Methylglyoxal causes strong weakening of detoxifying capacity and apoptotic cell death in rat hippocampal neurons.** *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40(2):245-57.
- DiNardo MM, Korytkowski MT, Siminerio LS. **The importance of normoglycemia in critically ill patients.** *Crit Care Nurs Q* 2004; 27(2):126-34.
- Drabhar FS, McEwen BJ. **Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:1059- 64.
- Driige W, Pottmeyer-Greber C, Schmidt H, Nick S. **Glutathione augments the activation of cytotoxic T lymphocytes in vivo.** *Immunobiology* 1986; 172(1-2):151-6.
- Du XL, Sui GZ, Stockklauser-Farber K, Weiss J, Zink S, Schwippert B, Wu QX, Tschöpe D, Rosen P. **Introduction of apoptosis by high proinsulin and glucose in cultured human umbilical vein endothelial cells is mediated by reactive oxygen species.** *Diabetologia* 1998; 41:249–256.

- Durant S, Coulaud J, Amrani A, el Hasnaoui A, Dardenne M, Homo-Delarche F. **Effects of various environmental stress paradigms and adrenalectomy on the expression of autoimmune type 1 diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse.** *J Autoimmun* 1993; 6(6):735-51.
- Eibl N, Spatz M, Fischer GF, Mayr WR, Samstag A, Wolf HM, Scherthaner G, Eibl MM. **Impaired primary immune response in type-1 diabetes: results from a controlled vaccination study.** *Clin Immunol* 2002; 103:249–59.
- Elenkov IJ. **Glucocorticoids and the Th1/Th2 Balance.** *Ann NY Acad Sci* 2004; 1024:138-146.
- Erel O. **A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation.** *Clin Biochem* 2004; 37(4):277-85.
- Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, Quagliari L, Ceriello A, Giugliano D. **Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress.** *Circulation* 2002; 106(16):2067-2072.
- Evans E, Goldfine I, Maddux B, Grodsky G. **Oxidative Stress and stress. Activated Signaling Pathways: A Unifying Hipótesis of Type 2 Diabetes.** *Endocrine Rev* 2002; 23(5):599-622.
- Fainboim L, Geffner J. **Introducción a la Inmunología Humana.** 5° Edición. 2005, Editorial Médica Panamericana.
- Forman HJ, Zhang H, Rinna A. **Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis.** *Mol Aspects Med* 2009; 30(1-2):1–12.
- Franco R, Cidlowski JA. **Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant.** *Cell Death and Differentiation* 2009; 16:1303–1314.

- Franco R, Panayiotidis MI, Cidlowski JA. **Glutathione depletion is necessary for apoptosis in lymphoid cells independent of reactive oxygen species formation.** *J Biol Chem.* 2007; 282(42):30452-65.
- Frick LR, Arcos ML, Rapanelli M, Zappia MP, Brocco M, Mongini C, Genaro AM, Cremaschi GA. **Chronic restraint stress impairs T-cell immunity and promotes tumor progression in mice.** *Stress* 2009; 12(2):134-43.
- Fünfstück R, Nicolle LE, Hanefeld M, Naber KG. **Urinary tract infection in patients with diabetes mellitus.** *Clin Nephrol* 2012; 77(1):40-8.
- Furnary AP, Zerr KJ, Grunkemeier GL, Starr A. **Continuous intravenous insulin infusion reduces the incidence of deep sternal wound infection in diabetic patients after cardiac surgical procedures.** *Ann Thorac Surg* 1999; 67(2):352-60.
- Gallacher SJ, Thomson G, Fraser WD, Fisher BM, Gemmell CG, Mac-Cuiah AC. **Neutrophil bactericidal function in diabetes mellitus: evidence for association with blood glucose control.** *Diabet Med* 1995; 12:916-20.
- Genaro AM, Cremaschi GA, Borda E. **Muscarinic cholinergic receptors on murine lymphocyte subpopulations.** *Immunopharmacology* 1993; 26: 21-29.
- Genaro AM, Sterin-Borda L, Borda E. **Beta adrenoreceptors in murine lymphocyte subpopulations. Differential responsiveness to isoprenaline stimulation.** *Mol Neuropharmacol* 1993; 3:101-107.
- Gesing A, Bilanz-Bleuel A, Droste SK, Linthorst AC, Holsboer F, Reul JM. **Psychological stress increases hippocampal mineralocorticoid receptor levels: involvement of corticotropin-releasing hormone.** *J Neurosci* 2001; 21(13):4822-9.
- Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. **Oxidative stress and diabetic vascular complications.** *Diabetes Care* 1996; 19(3):257-67.

- Golay A, Ybarra J. **Link between obesity and type 2 diabetes.** *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005; 19(4):649–663.
- Graier WF, Grubenthal I, Dittrich P, Wascher TC, Kostner GM. **Intracellular mechanism of high D-glucose-induced modulation of vascular cell proliferation.** *Eur J Pharmacol* 1995; 294(1):221-9.
- Greene DA, Sima AA, Stevens MJ, Feldman EL, Lattimer SA. **Complications: neuropathy, pathogenic considerations.** *Diabetes Care* 1992; 15:1902-1925.
- Groeneweg FL, Karst H, de Kloet ER, Joëls M. **Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response.** *J Endocrinol* 2011; 209(2):153-67.
- Gu K, Cowie CC y Harris MI. **Mortality in adults with and without diabetes in a national cohort of the U.S. population, 1971-1993.** *Diabetes Care* 1998; 21:1138-45.
- Guiñazu N, Pellegrini A, Giordanengo L, Aoki MP, Rivarola HW, Cano R, Rodrigues MM, Gea S. **Immune response to a major Trypanosoma cruzi antigen, cruzipain, is differentially modulated in C57BL/6 and BALB/c mice.** *Microbes Infect* 2004; 6:1250-1258.
- Hägglöf B, Blom L, Dahlquist G, Lönnberg G, Sahlin B. **The Swedish childhood diabetes study: indications of severe psychological stress as a risk factor for type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in childhood.** *Diabetologia* 1991; 34(8):579-83.
- Halliwell B. **Antioxidant characterization. Methodology and mechanism.** *Biochem Pharmacol* 1995; 49:1341-1348.
- Hamilos DL, Wedner W. **The role of glutathione in lymphocyte activation. I. Comparison of inhibitory effects of buthionine sulfoximine and 2-cyclohexene-1-one by nuclear size transformation.** *J Immunol* 1985; 135(4):2740-7.

- Hansen RO. **Bacteriuria in diabetic and non-diabetic out patients.** *Acta Med Scand* 1964; 176:721-30.
- Hanson CL, Henggeler SW, Burghen GA. **Model of associations between psychosocial variables and health-outcome measures of adolescents with IDDM.** *Diabetes Care* 1987; 10(6):752-8.
- Harizi H, Homo-Delarche F, Amrani A, Coulaud J, Morme`de P. **Marked genetic differences in the regulation of blood glucose under immune and restraint stress in mice reveals a wide range of corticosenstivity.** *J Neuroimmunol* 2007; 189:59–68.
- Hauge-Evans AC, King AJ, Carmignac D, Richardson CC, Robinson I, Low MJ, Christie MR, Persaud SJ, Jones PM. **Somatostatin Secreted by Islet  $\delta$ -Cells Fulfills Multiple Roles as a Paracrine Regulator of Islet Function.** *Diabetes* 2009; 58:403–411.
- Herold KC, Vezys V, Sun Q, Viktora D, Seung E, Reiner S, Brown DR. **Regulation of Cytokine Production During Development of Autoimmune Diabetes Induced with Multiple low Doses of Streptozotocin.** *J Immunol* 1996; 156:3521-3527.
- Hori T, Katafuchi T, Take S, Shimizu N, Nijijima A. **The autonomic nervous system as a communication channel between the brain and the immune system.** *Neuroimmunomodulation* 1995; 2(4):203–215.
- Huang X, Hultgren B, Dybdal N, Stewart TA. **Islet expression of interferon-alpha precedes diabetes in both the BB rat and streptozotocin-treated mice.** *Immunity* 1994; 1(6):469-78.
- Hudson JI, Hudson MS, Rothschild AJ, Vignati L, Schatzberg AF, Melby JC. **Abnormal results of dexamethasone suppression tests in non-depressed patients with diabetes mellitus.** *Arch Gen Psychiatry* 1984; 41:1086–1089.

- Hunt NH, Cook EP, Fragonas JC. **Interference with oxidative processes inhibits proliferation of human peripheral blood lymphocytes and murine B-lymphocytes.** *Int J Immunopharmacol* 1991; 13(7):1019-26.
- Hwang C, Sinsky AJ, Lodish HF. **Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum.** *Science* 1992; 257:1496–1502.
- Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. **High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells.** *Diabetes* 2000; 49:1939-1945.
- Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, Etoh T, Kakimoto M, Sonoda N, Sato N, Sekiguchi N, Kobayashi K, Sumimoto H, Utsumi H, Nawata H. **Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase.** *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:227-232.
- Itoi K, Helmreich DL, Lopez-Figueroa MO, Watson SJ. **Differential regulation of corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene transcription in the hypothalamus by norepinephrine.** *J Neurosci* 1999; 19:5464–5472.
- Itoi K, Sugimoto N. **The Brainstem Noradrenergic Systems in Stress, Anxiety and Depression.** *J Neuroendocrinology* 2010; 22:355–361.
- Jiang XY, Lu DB, Chen B. **Progress in stem cell therapy for the diabetic foot.** *Diabetes Res Clin Pract* 2012;  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2011.03.031>
- Joels M, Baram TZ. **The neuro-symphony of stress.** *Nat Rev Neurosci* 2009; 10:459-66.
- Joëls M, Karst H, DeRijk R, de Kloet ER. **The coming out of the brain mineralocorticoid receptor.** *Trends Neurosci* 2008; 31(1):1-7.



- Joshi N, Caputo G.M., Weitekamp M.R. and Karchmer A.W. **Infections in patients with diabetes mellitus.** *N Engl J Med* 1999; 341(25):1906 - 1912.
- Kado S, Nagase T, Nagata N. **Circulating levels of interleukin-6, its soluble receptor and interleukin-6/interleukin-6 receptor complexes in patients with type 2 diabetes mellitus.** *Acta Diabetol* 1999; 36:67–72.
- Kalapos MP. **Methylglyoxal in living organisms: chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications.** *Toxicol Lett* 1999; 110(3):145-75.
- Kalapos MP. **The tandem of free radicals and methylglyoxal.** *Chem Biol Interact* 2008; 171(3):251-71.
- Kang JH. **Modification and inactivation of human Cu,Zn-superoxide dismutase by methylglyoxal.** *Mol Cells* 2003; 15(2):194-9.
- Kass EH. **Bacteriuria and diagnosis of infections of urinary tract: with observations on the use of methionine as a urinary antiseptic.** *Arch Intern Med* 1957; 100:709-14.
- Khodr B, Khalil Z. **Modulation of inflammation by reactive oxygen species: implications for aging and tissue repair.** *Free Radic Biol Med* 2001; 30:1-8.
- Kim D, Seegal RF, Lawrence DA. **Splenic norepinephrine and serum corticosterone level fluctuations associated with bacteria-induced stress.** *Neuroimmunomodulation* 2004; 11(5):323–331.
- Kim YJ, Kim YA, Yokozawa T. **Pycnogenol modulates apoptosis by suppressing oxidative stress and inflammation in high glucose-treated renal tubular cells.** *Food Chem Toxicol* 2011; 49(9):2196-201.
- Koya D, King GL. **Protein kinase C activation and the development of diabetic complications.** *Diabetes* 1998; 47(6):859-66.
- Koziel H, Koziel MJ. **Pulmonary complications of diabetes mellitus: pneumonia.** *Infect. Dis. Clin. North Am* 1995; 9:65-96.

- Lamers ML, Almeida ME, Vicente-Manzanares M, Horwitz AF, Santos MF. **High glucose-mediated oxidative stress impairs cell migration.** *PLoS One* 2011; 6(8):e22865.
- Latham R, Lancaster AD, Covington JF, Pirolo JS, Thomas CS. **The association of diabetes and glucose control with surgical-site infections among cardiothoracic surgery patients.** *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001; 22(10):607-12.
- Lavery R, Taylor KM. **The fluorometric assay of catecholamines and related compounds: improvements and extensions to the hydroxyindole technique.** *Anal Biochem* 1968; 22:269-279.
- Lee HB, Yu MR, Yang Y, Jiang Z, Ha H. **Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy.** *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(8 Suppl 3):S241-5.
- Lee JH, Konorska M, McCarty R. **Physiological responses to acute stress in alloxan and streptozotocin diabetic rats.** *Physiol Behav* 1989; 45:483–489.
- Lee MH, Hyun DH, Jenner P, Halliwell B. **Effect of proteasome inhibition on cellular oxidative damage, antioxidant defences and nitric oxide production.** *J Neurochem* 2001; 78:32-41.
- Lehman CD, Rodin J, McEwen B, Brinton R. **Impact of environmental stress on the expression of insulin-dependent diabetes mellitus.** *Behav Neurosci* 1991; 105(2):241-5.
- Lepicard EM, Joubert C, Hagneau I, Perez-Diaz F, Chapouthier G. **Differences in anxiety-related behavior and response to diazepam in BALB/cByJ and C57BL/6J strains of mice.** *Pharmacol Biochem Behav* 2000; 67:739-748.
- Like AA, Rossini AA. **Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus.** *Science* 1976; 193:415–17.

- Lin Y, Sun Z. **Current views on type 2 diabetes.** *J Endocrinol* 2010; 204(1):1-11.
- Littorin B, Sundkvist G, Nyström L, Carlson A, Landin-Olsson M, Ostman J, Arnqvist HJ, Björk E, Blohmé G, Bolinder J, Eriksson JW, Scherstén B, Wibell L; Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS). **Family characteristics and life events before the onset of autoimmune type 1 diabetes in young adults: a nationwide study.** *Diabetes Care* 2001; 24(6):1033-7.
- Lloyd CE, Dyer PH, Lancashire RJ, Harris T, Daniels JE, Barnett AH. **Association between stress and glycemic control in adults with type 1 (insulin-dependent) diabetes.** *Diabetes Care* 1999; 22(8):1278-83.
- Lyons AB, Parish CR. **Determination of lymphocyte division by flow cytometry.** *J Immunol Methods*. 1994; 171(1):131-7.
- Marchetti B, Morale MC, Testa N, Tirolo C, Caniglia S, Amor S, Dijkstra CD, Barden N. **Stress, the immune system and vulnerability to degenerative disorders of the central nervous system in transgenic mice expressing glucocorticoid receptor antisense RNA.** *Brain Res Rev* 2001; 37:259-272.
- Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A, Besnard S, Lesèche G, Chvatchko Y, Tedgui A. **Expression of interleukin-18 in human atherosclerotic plaques and relation to plaque instability.** *Circulation* 2001; 104:1598–1603.
- Marble A, White HJ, Fernald AT. **The nature of the lowered resistance to infection in diabetes mellitus.** *J Clin Invest*. 1938; 17(4):423-30.
- McCord JM, Fridovich I. **Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein).** *J Biol Chem*. 1969; 244(22):6049-55.
- McEwen BS. **Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders.** *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1032:1-7.
- McEwen BS, Gianaros PJ. **Stress- and Allostasis-Induced Brain Plasticity.** *Annu Rev Med* 2011; 62:431-45.

- McLellan AC, Thornalley PJ, Benn J, Sonksen PH. **Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications.** *Clin Sci (Lond)* 1994; 87(1):21-9.
- Mealey BL. **Diabetes and periodontal disease: two sides of a coin.** *Compend Contin Educ Dent* 2000; 21:493-6, 948, 950.
- Meredith MJ, Reed DJ. **Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte.** *J BiolChem* 1982; 257:3747–3753.
- Miao L, Clair DK. **Regulation of Superoxide Dismutase Genes: Implications in Diseases.** *Free Radic Biol Med* 2009; 47(4):344–356.
- Milad MA, Ludwig EA, Anne S, Middleton E Jr, Jusko WJ. **Pharmacodynamic model for joint exogenous and endogenous corticosteroid suppression of lymphocyte trafficking.** *J Pharmacokinet Biopharm* 1994; 22:469-80.
- Miller AC, Subramanian RA, Safi F, Sinert R, Zehtabchi S, Elamin EM. **Influenza A 2009 (H1N1) Virus in Admitted and Critically Ill Patients.** *J Intensive Care Med* 2011; <http://dx.doi.org/10.1177/0885066610393626>
- Moghadami M, Honarvar B, Sabaeian B, Zamiri N, Pourshahid O, Rismanchi M, Lankarani KB. **H1N1 Influenza Infection Complicated with Diabetic Ketoacidosis.** *Arch Iran Med* 2012; 15(1):55-8.
- Monleon S, Aquila P, Parra A, Simon VM, Brain PF, Willner P. **Attenuation of sucrose consumption in mice by chronic mild stress and its restoration by imipramine.** *Psychopharmacology* 1995; 117:453-457.
- Moreau JL. **Validation of an animal model of anhedonia, a major symptom of depression.** *Encephale* 1997; 23:280-289.
- Moutschen MP, Scheen AJ, Lefebvre PJ. **Impaired immune responses in diabetes mellitus: analysis of the factors and mechanisms involved. Relevance to the increased susceptibility of diabetic patients to specific infections.** *Diabetes Metab* 1992; 18:187–201.

- Müller A, Schott-Ohly P, Dohle C, Gleichmann H. **Differential regulation of Th1-type and Th2-type cytokine profiles in pancreatic islets of C57BL/6 and BALB/c mice by multiple low doses of streptozotocin.** *Immunobiology* 2002; 205(1):35-50.
- Muoio DM, Newgard CB. **Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9:193–205.
- Nakagawa M, Bondy GP, Waisman D, Minshall D, Hogg JC, van Eeden SF. **The effect of glucocorticoids on the expression of L-selectin on polymorphonuclear leukocyte.** *Blood* 1999; 93:2730-37
- Nahman NS Jr, Leonhart KL, Cosio FG, Hebert CL. **Effects of high glucose on cellular proliferation and fibronectin production by cultured human mesangial cells.** *Kidney Int* 1992; 41(2):396-402.
- Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, Raskin P, Zinman B. **Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes.** *N Engl J Med* 2005; 353(25):2643-2653.
- Nicolletti I, Migliorati G, Pagliacci M.C, Grignani F and Riccardi C. **A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry.** *Journal Immunol Methods* 1991; 139(2):271-279.
- Nishikawa S, Yasoshima A, Doi K, Nakayama H, Uetsuka K. **Involvement of sex, strain and age factors in high fat diet-induced obesity in C57BL/6J and BALB/cA mice.** *Exp Anim* 2007; 56(4):263-72.
- Nonogaki K. **New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism.** *Diabetologia* 2000; 43:533–549.
- Novogrodsky A, Ravid A, Rubin AL, Stenzel KH. **Hydroxyl radical scavengers inhibit lymphocyte mitogenesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79(4):1171-4.

- Oitzl MS, Champagne DL, van der Veen R, de Kloet ER. **Brain development under stress: hypotheses of glucocorticoid actions revisited.** *Neurosci Biobehav Rev* 2010; 34(6):853-66.
- Otton R, Soriano FG, Verlengia R, Curi R. **Diabetes induces apoptosis in lymphocytes.** *J Endocrinol* 2004; 182(1):145-56.
- Palumbo ML, Canzobre MC, Pascuan CG, Ríos H, Wald M, Genaro AM. **Stress induced cognitive deficit is differentially modulated in BALB/c and C57Bl/6 mice: correlation with Th1/Th2 balance after stress exposure.** *J Neuroimmunol* 2010; 218(1-2):12-20.
- Palumbo ML, Zorrilla-Zubilete MA, Cremaschi GA, Genaro AM. **Different effect of chronic stress on learning and memory in BALB/c and C57BL/6 inbred mice: Involvement of hippocampal NO production and PKC activity.** *Stress* 2009; 4:350-361.
- Parkin J, Cohen B. **An overview of the immune system** *Lancet* 2001; 357:1777–89.
- Peleg AY, Weeraratna T, McCarthy JS, Davis TM. **Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control.** *Diabetes Metab Res Rev* 2007; 23(1):3-13.
- Pieper GM, Langenstroer P, Gross GJ. **Hydroxyl radicals mediate injury to endothelium-dependent relaxation in diabetic rat.** *Mol Cell Biochem* 1993; 122:139-145.
- Plouffe JF, Silva J, Fekety R, Allen JL. **Cell-mediated immunity in diabetes mellitus.** *Infect Immun* 1978; 21(2):425-429.
- Porte D, Schwartz M. **Diabetes complications: why is glucose potentially toxic?** *Science* 1996; 272:699-700.

- Poskus E, Ermácora M. **Los avances en diabetes mellitus impulsados por los inmunobiológicos recombinantes.** *Rev Asoc Bioquim Argent* 1998; 62(1):18-31.
- Pozzilli P, Buzzetti R. **A new expression of diabetes: double diabetes.** *Trends Endocrinol Metab* 2007; 18(2):52-7.
- Price CL, Hassi HO, English NR, Blakemore AI, Stagg AJ, Knight SC. **Methylglyoxal modulates immune responses: relevance to diabetes.** *J Cell Mol Med* 2010; 14(6B):1806-15.
- Price CL, Sharp PS, North ME, Rainbow SJ, Knight SC. **Advanced glycation end products modulate the maturation and function of peripheral blood dendritic cells.** *Diabetes* 2004; 53(6):1452-8.
- Qi Z, Fujita H, Jin J, Davis LS, Wang Y, Fogo AB, Breyer MD. **Characterization of susceptibility of inbred mouse strains to diabetic nephropathy.** *Diabetes* 2005; 54(9):2628-37.
- Rabinovitch A. **An Update on Cytokines in the Pathogenesis of Insulin-dependent Diabetes Mellitus.** *Diabetes Metab Rev* 1998; 14, 129–151.
- Racker E. **The mechanism of action of glyoxalase.** *J Biol Chem* 1951; 190(2):685-96.
- Randall D, Burggren W, French K. Eckert. **Fisiología animal. Mecanismos y adaptaciones.** 1998. *McGRAW-HILL/Interamericana de españa, S.A.U.*
- Reiche EM, Nunes SO, Morimoto HK. **Stress, depression, the immune system, and cancer.** *Lancet Oncol* 2004; 5:617-625.
- Reul JM, de Kloet ER. **Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation.** *Endocrinology* 1985; 117(6):2505-11.

- Roggero E, Pérez AR, Bottasso OA, Besedovsky HO, Del Rey A. **Neuroendocrine-immunology of experimental Chagas' disease.** *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1153:264-71.
- Roitt IM, Delves PJ. **Inmunología fundamentos.** Décima edición. 2003, *Editorial Médica Panamericana.*
- Rosen P, Nawroth PP, King G, Moller W, Tritschler HJ, Packer L. **The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society.** *Diabetes Metab Res Rev* 2001; 17(3):189-212.
- Roth S, Droge W. **Regulation of T-cell activation and T-cell growth factor (TCGF) production by hydrogen peroxide.** *Cell Immunol* 1987; 108(2):417-24.
- Roy MS, Roy A, Gallucci WT, Collier B, Young K, Kamilaris TC, Chrousos GP. **The ovine corticotropin-releasing hormone stimulation test in type I diabetic patients and controls: suggestion of mild chronic hypercortisolism.** *Metabolism* 1993; 42:696–700.
- Saiki O, Negoro S, Tsuyuguchi I, Yamamura Y. **Depressed immunological defence mechanisms in mice with experimentally induced diabetes.** *Infect Immun* 1980; 28:127–31.
- Schmidt AM, Stern D. **A radical approach to the pathogenesis of diabetic complications.** *TIPS* 2000; 21:367-369.
- Schreck R, Baeuerle PA. **A role for oxygen radicals as second messengers.** *Trends Cell Biol* 1991; 1(2-3):39-42.
- Shelly C. **Regulation of glutathione synthesis.** *Mol Aspects Med* 2009; 30(1-2):42–59.



- Shikano M, Sobajima H, Yoshikawa H, Toba T, Kushimoto H, Katsumata H, Tomita M, Kawashima S. **Usefulness of a highly sensitive urinary and serum IL-6 assay in patients with diabetic nephropathy.** *Nephron* 2000; 85:81–85.
- Silberman DM, Wald MR, Genaro AM. **Acute and chronic stress opposite effects on isotype switching associated with changes in stress hormone regulation of T lymphocyte reactivity.** *Journal of Neuroimmunol* 2003; 144(1-2):53-60.
- Silberman DM, Wald M, Genaro AM. **Effects of chronic mild stress on lymphocyte proliferative response. Participation of serum thyroid hormones and corticosterona.** *Int Immunopharmacol* 2002; 2:487–497.
- Sitio de Internet Organización Mundial de la Salud. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html>
- Slattery WH, Brackman DE. **Skull base osteomyelitis: malignant external otitis.** *Otolaryngol Clin North Am* 1996; 29:795-806.
- Sonta T, Inoguchi T, Tsubouchi H, Sekiguchi N, Kobayashi K, Matsumoto S, Utsumi H, Nawata H. **Evolution of oxidative stress in diabetic animals by in vivo electron spin resonance measurement-role of protein kinase C.** *Diabetes Res Clin Pract* 2004; 66(1):109-113.
- Stabler B, Surwit RS, Lane JD, Morris MA, Litton J, Feinglos MN. **Type A behavior pattern and blood glucose control in diabetic children.** *Psychosom Med* 1987; 49(3):313-6.
- Steiner DF, Chan SJ, Welsh JM, Kwok SC. **Structure and evolution of the insulin gene.** *Annu Rev Genet* 1985; 19:463-84.
- Stenström U, Göth A, Carlsson C, Andersson PO. **Stress management training as related to glycemc control and mood in adults with Type 1 diabetes mellitus.** *Diab Res Clin Pract* 2003; 60:147-152.

- Stevens MJ, Lattimer SA, Kamijo M, VanHuysen C, Sima AAF, Greene DA. **Osmotically-induced nerve taurine depletion and the compatible osmolyte hipótesis in experimental diabetic neuropathy in the rat.** *Diabetologia* 1993; 36:608-614.
- Stevens MJ, Obrosova I, Feldman EL, Greene DA. **The sorbitol-osmotic and sorbitol-redox hipótesis.** en LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM, editores. *Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text.* Philadelphia: *Lippicott Williams & Wilkins* 2000; 972-983.
- Stocks J, Gutteride JM, Sharp RJ, Dormandy TL. **The inhibition of lipid autoxidation by human serum and its relation to serum proteins and  $\alpha$ -tocopherol.** *Clin Sci Mol Med* 1974; 47:223-233.
- Stratton IM, Adler AI, Neil H, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, Hadden D, Turner RE, Holman RR. **On behalf of the UK prospective diabetes study group. Association of glycaemia with macromolecular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study.** *BMJ* 2000; 321:405-419.
- Strowski MZ, Cashen DE, Birzin ET, Yang L, Singh V, Jacks TM, Nowak KW, Rohrer SP, Patchett AA, Smith RG, Schaeffer JM. **Antidiabetic activity of a highly potent and selective nonpeptide somatostatin receptor subtype-2 agonist.** *Endocrinol* 2006; 147(10):4664-73.
- Surwit RS, van Tilburg MA, Zucker N, McCaskill CC, Parekh P, Feinglos MN, Edwards CL, Williams P, Lane JD. **Stress management improves long-term glycemic control in type 2 diabetes.** *Diabetes Care* 2002; 25:30-34.
- Suthanthiran M, Anderson ME, Sharma VK, Meister A. **Glutathione regulates activation-dependent DNA synthesis in highly purified normal human T lymphocytes stimulated via CD2 and CD3 antigen.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87(9):3343-7.
- Swenne I, Andersson A. **Effect of genetic background on the capacity for islet cell replication in mice.** *Diabetologia* 1984; 27(4):464-7.

- Tannenbaum B, Anisman H. **Impact of chronic intermittent challenges in stressor-susceptible and resilient strains of mice.** *Biol Psychiatry* 2003; 53:292-303.
- The Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group. **Effects of Intensive Glucose Lowering in Type 2 Diabetes.** *N Engl J Med* 2008; 358(24):2545-2559.
- The ADVANCE Collaborative Group. **Intensive Blood Glucose Control and Vascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes.** *N Engl J Med* 2008; 358(24):2560-2572.
- The diabetes control and complications trial research group. **The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus.** *N Engl J Med* 1993; 329:977-986.
- Thernlund GM, Dahlquist G, Hansson K, Ivarsson SA, Ludvigsson J, Sjöblad S, Hägglöf B. **Psychological stress and the onset of IDDM in children.** *Diabetes Care* 1995; 18(10):1323-9.
- Thomsen RW, Hundborg HH, Lervang HH, Johnsen SP, Sørensen HT, Schönheyder HC. **Diabetes and outcome of community-acquired pneumococcal bacteremia: a 10-year population-based cohort study.** *Diabetes Care* 2004; 27(1):70-6.
- Thornalley PJ, Hooper NI, Jennings PE, Florkowski CM, Jones AF, Lunec J, Barnett AH. **The human red blood cell glyoxalase system in diabetes mellitus.** *Diabetes Res Clin Pract* 1989; 7(2):115-20.
- Thornalley PJ, McLellan AC, Lo TW, Benn J, Sönksen PH. **Negative association between erythrocyte reduced glutathione concentration and diabetic complications.** *Clin Sci (Lond)* 1996; 91(5):575-82.

- Thornalley PJ. **Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems--role in ageing and disease.** *Drug Metabol Drug Interact* 2008; 23(1-2):125-50.
- Tietze F. **Enzymic Method for Quantitative Determination of Nanogram Amounts of total and Oxidized Glutathione.** *Anal Biochem* 1968; 27:502-522.
- Trachtman H, Futterweit S, Prenner J, Hanon S. **Antioxidants reverse the antiproliferative effect of high glucose and advanced glycosylation end products in cultured rat mesangial cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199(1):346-52.
- Turner RC, Colman RR, Stratton IM, Cull CA, Mathews Dr, Manley SE, Frighi V, Wright D, Kohner E, McElroy H, Fox C, Hadden D. **Effect of intensive blood-glucose control with type 2 diabetes (UKPDS 34).** *Lancet* 1998; 352(9131):854-865.
- Uemura S, Matsushita H, Li W, Glassford AJ, Asagami T, Lee KH, Harrison DG, Tsao PS. **Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress.** *Circ Res* 2001; 88:1291-1298.
- UK Prospective Diabetes Study Group. **Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33).** *Lancet* 1998; 352(9131):837-53.
- Ulett GC, Ketheesan N, Hirst RG. **Cytokine Gene Expression in Innately Susceptible BALB/c Mice and Relatively Resistant C57BL/6 Mice during Infection with Virulent Burkholderia pseudomalle.** *Infect Immun* 2000; 68(4):2034-42.
- Umeda F, Yamauchi T, Nakashima N, Ono H, Nawata H, Masuko M, Nakayama K, Tatematsu A. **Glucose reduces PDGF production and cell proliferation of cultured vascular endothelial cells.** *Horm Metab Res* 1991; 23(6):274-7.

Valerius NH, Eff C, Hansen NE, Karle H, Nerup J, Soeberg B, Sorensen SF. **Neutrophil and lymphocyte function in patients with diabetes mellitus.** *Acta Med Scand* 1982; 2211:463-7.

Vejlsgaard R. **Studies on urinary tract infection in diabetes. I. Bacteriuria in patients with diabetes mellitus and in control subjects.** *Acta Med Scand* 1966; 179:173-82.

Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. **Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy.** *Endocrinol Rev* 2004; 25(4):612-28.

Vlassara H, Palace MR. **Glycoxidation: The menace of diabetes and aging.** *Mt Sinai J Med* 2003; 70(4):232-240.

Walsh GM, Dewsonb G, Wardlawb AJ, Levi-Schafferc F, Moqbeld R. **A comparative study of different methods for the assessment of apoptosis and necrosis in human eosinophils.** *J Immunol Methods* 1998; 217(1-2):153-163.

Watanabe H, Numata K, Ito T, Takagi K, Matsukawa A. **Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains.** *Shock* 2004; 22:460-466.

Wheat LJ. **Infection and diabetes mellitus.** *Diabetes Care* 1980; 3(1):187-197.

Whitacre CM, Cathcart MK. **Oxygen free radical generation and regulation of proliferative activity of human mononuclear cells responding to different mitogens.** *Cell Immunol* 1992; 144(2):287-95.

Wilckens T, De Rijk R. **Glucocorticoids and immune function: unknown dimensions and new frontiers.** *Immunol Today* 1997; 18:418-424.

Willner P, Mitchell PJ. **The validity of animal models of predisposition to depression.** *Behav Pharmacol* 2002; 13(3):169-88.

Willner P, Muscat R, Papp M. **Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression.** *Neurosci Biobehav Rev* 1992; 16:525-34.

Wisniewska M, Pyrzynska B, Kaminska B. **Impaired AP-1 dimers and NFAT complex formation in immature thymocytes during in vivo glucocorticoid-induced apoptosis.** *Cell Biol Int* 2004; 28:773-80.

Wu QD, Wang JH, Fennessy F, Redmond HP, and Bouchier-Hayes D. **Taurine prevents high-glucose-induced human vascular endothelial cell apoptosis.** *Am J Physiol Cell Physiol* 1999; 277: C1229-C1238.

Yamauchi A, Bloom ET. **Requirement of thiol compounds as reducing agents for IL-2-mediated induction of LAK activity and proliferation of human NK cells.** *J Immunol* 1993; 151(10):5535-44.

Zamai L, Falcieri E, Zauli G, Cataldi A, Vitale M. **Optimal detection of apoptosis by flow cytometry dependes on cell morphology.** *Cytometry* 1993; 14:891-897.

Zhang Q, Zeng X, Guo J, Xian W. **Oxidant stress mechanism of homocysteine potentiating Con A-induced proliferation in murine splenic T lymphocytes.** *Cardiovasc Res* 2002; 53:1035-1042.

Zhang W, Wang X, Jin H, Qian R, Zhang G, Chen S, Hu R. **Effects of high glucose plus high insulin on proliferation and apoptosis of mouse endothelial progenitor cells.** *Inflamm Res* 2008; 57(12):571-6.