



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



“Caracterización del efecto inmunomodulador de nitazoxanida en el proceso inflamatorio de pacientes con DM2”

Tesis

Que para obtener el grado de:

Doctor en Farmacia

Presenta:

M. en F. Mauricio Castillo Salazar

Director de tesis

Dr. Germán Bernal Fernández

Cuernavaca, Morelos

Abril 2022



M.F. MAURICIO CASTILLO SALAZAR
ALUMNO DE DOCTORADO EN FARMACIA

PRESENTE

Por este medio le informo que en la sesión extraordinaria del Consejo Interno de Posgrado (CIP) celebrada el día 15 de diciembre de 2021 se analizó su solicitud para asignación de Comisión Revisora y Jurado revisor para la tesis titulada “**Caracterización del efecto inmunomodulador de nitazoxanida en el proceso inflamatorio de pacientes con DM2**”, y tomando en cuenta su propuesta de posibles sinodales, el CIP designó a los siguientes investigadores como integrantes de la Comisión Revisora:

1.	Dr. Samuel Enoch Estrada Soto	Presidente
2.	Dr. Cairo David Toledano Jaimes	Secretario
3.	Dr. Fausto Sánchez Muñoz	Vocal1
4.	Dra. María de Lourdes Rodríguez Frago	Vocal2
5.	Dr. Julio César Almanza Pérez	Vocal3
6.	Dra. María Rashidi Springall del Villar	Suplente1
7.	Dr. Germán Bernal Fernández	Suplente2

Se le solicita entregar las tesis al jurado revisor y dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos.

Esperando que esta resolución sea en beneficio de su desempeño académico, y sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

Dr. Sergio Alcalá Alcalá
Jefe del Posgrado en Farmacia

ccp:archivo:

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto; Cairo David Toledano Jaimes; Dr. Fausto Sánchez Muñoz; Dra. María de Lourdes Rodríguez Frago; Dr. Julio César Almanza Pérez; Dra. María Rashidi Springall del Villar; Dr. Germán Bernal Fernández



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

SERGIO ALCALA ALCALA|Fecha:2021-12-17 12:13:02|Firmante

eiXFTt5syX8JNu9hzR3ECueKb6Y4RbqBClYggLhqQpwFQT3iFZtPLAVFvW1uRIIN35pQQov4OeX21JonCqKXWShEF924Lj90mYaklHFCJW7lk8+qj65QlJkaRo81ZmUI4trR1JjoFUx//zUypHThrW/yylaz8lhSWu+IKGR8Vc7zYO0fvL4HZVpdI5Mf4Q9pQ5Tz5kyM7/+bgRsi5JIZZtgw7vvk9Heg90LDXVEaktEqel0FSYFhi/cpxFNNFJjUe0hzvZb/kxTrvkVpKyfRgq5/d5nl+gA5/8Ud3++Zm9nGacstnjEHm9Vss6jb94y4ia9i2ijnT5g2poMPcpeqNg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[J7fYp0BdX](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/gxxzSzhvkzXQHvDihCgds2KV6WtGjeJ9>



AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por guiarme, darme la fuerza y sabiduría para seguir adelante, y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder la fé ni desfallecer en el intento. Y por mostrarme día a día que con humildad, paciencia y deseo todo es posible.

A mi madre, por su amor y devoción, por el apoyo incondicional que siempre me ha dado y ser mi gran ejemplo de lo que es ser un buen ser humano. Gracias mamá por estar conmigo en los momentos de felicidad, confusión y tristeza, además de poner tu confianza día a día en mí. Por tanto trabajo, dedicación, preocupaciones, desvelos y demás para que yo lograra esta meta, que es fruto del esfuerzo de ambos, y sé que será una de las muchas satisfacciones que tendremos.

A mi esposa, Gabriela Aguilar, por seguirme siempre en mis aventuras y hacer mis días divertidos y felices. Gracias por siempre estar aquí y amarme como lo haces.

Al doctor Germán Bernal Fernández, por ser más que un tutor, mi amigo. Llegué a su laboratorio con 23 años, con una licenciatura terminada y muchas ilusiones. Me voy con 30 años, una maestría y un doctorado en el bolsillo, pero sobre todo aprendizaje, experiencia y ganas de comerme al mundo con todo lo aprendí durante todo este tiempo, gracias por todo lo que invirtió en mi, por sus consejos, le prometo que voy a poner en alto el nombre de nuestro laboratorio.

A la doctora Rashidi Springall del Villar, porque a pesar de no ser mi asesora durante el doctorado, me recibió como un hijo más; siempre compartió su tiempo y conocimientos conmigo, se preocupó por que llegara bien a mi casa y me compartió todo lo que tenía en su laboratorio: Ra, muchas gracias por todo, tanto en el ámbito profesional como personal eres un ejemplo a seguir para mi.

Al doctor Fausto Sánchez, por aceptarme en su laboratorio y darme la oportunidad de aprender del gran trabajo que realiza. Gracias doc por enseñarme lo que quiero en mi vida, pero sobre todo a siempre hacer lo correcto; el haber venido a la ciudad de México me permitió un nuevo inicio, una nueva oportunidad y eso es en gran parte a usted.

Al doctor Gabriel Navarrete Vázquez, porque desde que llegué a la UAEM estuvo en cada uno de los 12 tutorales y 1 candidatura que me permitieron terminar este ciclo. Gracias por el apoyo, los conocimientos, las enseñanzas, por creer en mí.

Al instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” por recibirme con los brazos abiertos para la realización de una estancia de investigación; que 1 semestre se convirtió en 2 años y contando. Gracias también Dr. Luiz Amezcua por permitirme hacer mi trabajo de investigación en el departamento de Inmunología y poner a mi disposición todo lo habido en el.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACYT) por el apoyo económico brindado como becario No. de registro **665734**; sin dicho apoyo económico recibido, no hubiera sido posible lograr este sueño

A mi comité revisor: Dr. Julio Cesar Almanza Perez, Dr. Cairo Toledano Jaimes, Dr. Samuel Estrada Soto y Dra. María de Lourdes Rodriguez Fragoso, por sus comentarios y aportes para poder hacer más enriquecedor este trabajo de investigación científica.

A mi amiga Miriam Marín, eres la mejor. Gracias por siempre motivarme, por creer en mi cuando yo mismo no lo hacía, pero sobre todo, siempre estar ahí cuando lo necesité. París nos espera.

A las personas que me apoyaron en las diferentes etapas metodológicas de este trabajo: Carlos Mujica, Adrián Hernandez, Dr. Guillermo Vega y Dr. Maravillas, ya que sin su aportación no hubiera sido posible lograrlo.

Agradezco a todos mis profesores, que han influido con sus conocimientos, lecciones y experiencias en formarme como un buen profesionista, con capacidades y aptitudes para afrontar los retos que pone la vida, por enseñarme a no limitarme y que soy capaz de lograr cualquier meta que me proponga, ya que con su ejemplo hace que ame aún más mi carrera, por su apoyo, orientación, motivación y enseñanza pero sobre todo por depositar su confianza en mí no solo para la elaboración de este trabajo, sino en el día a día.

Gracias a esas personas importantes en mi vida, ahora me toca regresar un poco de todo lo inmenso que me han otorgado, pues ni todas las palabras bastarían para agradecer su apoyo, comprensión, tiempo y consejos en los momentos difíciles.

Mauricio Castillo Salazar

INDICE GENERAL

Lista de abreviaturas	I
Lista de figuras	IV
Lista de tablas	V
Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
1.1 Diabetes mellitus	5
1.1.1 Clasificación etiológica de la Diabetes Mellitus	5
1.1.2 Diabetes Mellitus a nivel global	6
1.1.3 Diabetes Mellitus en México	6
1.1.4 Complicaciones de la Diabetes Mellitus	7
1.1.5 Diagnóstico de la Diabetes Mellitus	8
1.1.6 Diabetes Mellitus Tipo 2	8
1.1.7 Fisiopatología de la Diabetes Mellitus tipo 2	9
1.1.8 Control de la Diabetes Mellitus tipo 2	11
1.1.9 Educación del paciente con Diabetes Mellitus tipo 2	12
1.2 Inflamación crónica de bajo grado asociada a Diabetes Mellitus tipo 2	12
1.2.1 Macrófagos	13
1.2.2 Linfocitos	15
1.2.2.1 Linfocitos Th1 y Th2	16
1.2.2.2 Linfocitos Th17	17
1.2.2.3 Linfocitos T reguladores	17
1.2.3 Citocinas	18
1.2.3.1 IL-1 β	18
1.2.3.2 IL-2	19
1.2.3.3 IL-4	19
1.2.3.4 IL-6	19
1.2.3.5 IL-10	20
1.2.3.6 IL-12	20
1.2.4 MicroRNAs	21
1.2.4.1 Biogénesis y función de los miRNAs	21
1.2.4.2 miR-146a	22
1.2.4.3 miR-155	23

1.2.4.4	Regulación y epistasis entre miR-146a y miR-155	24
1.3	Reposicionamiento de fármacos	24
1.4	Nitazoxanida	25
2.	Justificación	27
3.	Hipótesis	29
4.	Objetivo general	30
4.1	Objetivos específicos	31
5.	Materiales y métodos	32
5.1	Aislamiento de nitazoxanida de tabletas comerciales	32
5.2	Descripción de la población de estudio	33
5.3	Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica	34
5.4	Cuantificación de subpoblaciones M1 y M2 de monocitos de sangre periférica	34
5.5	Cultivo celular in-vitro de CMN	34
5.6	Ensayos de proliferación celular	34
5.7	Cuantificación de citocinas en sobrenadantes de cultivos celulares	35
5.8	Aislamiento de ARN de células mononucleares	36
5.9	Determinación de miRNAs por RT-qPCR	36
5.10	Determinación de subpoblaciones de monocitos/macrófagos M1 y M2 posterior al cultivo celular in-vitro por citometría de flujo	36
5.11	Análisis estadístico	37
6.	Resultados	38
6.1	Descripción de la población y sus estilos de vida	38
6.2	El 90% de la población de estudio tiene sobrepeso u obesidad	38
6.3	Dos de tres pacientes no tienen control glucémico adecuado	39
6.4	En pacientes con DM2 existe un incremento de monocitos M1 en sangre periférica	39
6.5	NTZ inhibe la proliferación de células T inducida por anti-CD3 y anti-CD28	40
6.6	Nitazoxanida disminuye las citocinas proinflamatorias en los sobrenadantes de CMN	42
6.7	NTZ regula negativamente la expresión de miR-155-5p en CMN	45
6.8	NTZ reduce la relación M1/M2 en CMN estimuladas con anti-CD3 y anti-CD28	46
7.	Discusión de resultados	50
8.	Conclusiones	57
9.	Perspectivas	58
10.	Bibliografía	59
11.	Anexos	74

Abreviaturas

AACE	Asociación americana de endocrinólogos clínicos
ADA	Asociación Americana de Diabetes
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AG	Ácidos grasos
AGL	Ácidos Grasos Libres
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CMN	Células Mononucleares
CO ₂	Dióxido de Carbono
CPA	Célula Presentadora de Antígenos
CPDF-670	Cell Proliferation Dye eFluor
CTLA-4	Molécula coinhibitoria del antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
EASD	Asociación Europea para el Estudio de la Diabetes
ECV	Enfermedad Cardiovascular
EDTA	Anticoagulante Ácido Etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzimas
eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
FDA	Administración de Drogas y Alimentos de los EE. UU
FID	Federación Internacional de Diabetes
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
PE-Cy7	Ficoeritrina y cianina 7
GLUT 4	Transportador de glucosa 4
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GPA	Glucosa Plasmática en Ayuno
HbA1c	Hemoglobina Glicosilada
ICC	Índice de Cintura-Cadera

IL-1	Interleucina 1
IL-1 α	Interleucina 1 alfa
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IL2	Interleucina 2
IL-23	Interleucina 23
IL-35	Interleucina 35
IL4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-9	Interleucina 9
IMC	Índice de Masa Corporal
IRAK1	Quinasa 1 asociada al receptor de interleucina 1
IRAK2	Quinasa 2 asociada al receptor de interleucina 1
IRF3	Factor regulador de interferón 3
IRS-1	Sustrato del receptor de insulina-1
JNK	Quinasa N-terminal c-Jun
LPS	Lipopolisacáridos
M1	Macrófagos proinflamatorios
M2	Macrófagos antiinflamatorios
ME	Musculo Esquelético
MET	Medida de índice metabólico
MIP	Proteína inflamatoria de macrófagos
MiR/miRNA	microRNA
miR-146a	microRNA 146a
miR-146b	microRNA 146b
miR-155	microRNA 155
Mtb	Mycobacterium tuberculosis
NF- κ B	Factor Nuclear Kappa B
NGSP	Programa Nacional de Estandarización de la glicohemoglobina
NK	Natural Killer

NOM-015	Norma Oficial Mexicana 015
NTZ	Nitazoxanida
OMS	Organización Mundial de la Salud
PE ficoeritrina	Ficoeritrina
PFOR	Piruvato ferredoxina oxidorreductasa
PI3-K	Fosfoinositol 3 cinasa
PPAR-Y	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas gama
RAGE	Receptor para compuestos de glucosilación avanzada
RE	Retículo endoplasmático
RI	Resistencia a la insulina
SARS-COV-2	Enfermedad por coronavirus SARS-COV-2
SHIP 1	Polifosfato <i>de inositol 5-fosfatasa 1</i>
SOCS1	Supresor de la señalización de citocinas 1
STAT1	Transductor de señal y el activador de la transcripción 1
TCR	Receptor de células T
TG	Triglicéridos
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TH1	Subpoblación de linfocitos cooperadores tipo 1
TH17	Subpoblación de linfocitos cooperadores tipo 17
TH2	Subpoblación de linfocitos cooperadores tipo 2
TLR	Receptor tipo toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TNF-β	Factor de necrosis tumoral beta
TRAF6	Factor 6 asociado al receptor de TNF
Treg	Subpoblación de linfocitos T reguladores
TZD	Tizoxanida

Lista de figuras

Figura 1. Estructura química de Nitazoxanida	26
Figura 2. Resumen gráfico de la metodología empleada.	32
Figura 3. En pacientes con DM2 existe un incremento de monocitos M1 y disminución de M2 en sangre periférica.	40
Figura 4. NTZ inhibe la proliferación celular inducida por anti-CD3 y anti-CD28 en CMN.	41
Figura 5. Histogramas de condiciones evaluadas en los ensayos de proliferación celular.	41
Figura 6. Evaluación de la proliferación celular entre pacientes controlados vs pacientes no controlados.	42
Figura 7. NTZ reduce los niveles de citocinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12 en el sobrenadante de CMN	44
Figura 8. NTZ regula la expresión de miR-155-5p sin causar cambios en la expresión de miR-146a-5p en CMN.	45
Figura 9. Expresión de miR-155-5p en CMN de pacientes controlados vs. no controlados.	46
Figura 10. NTZ modifica la relación de monocitos/macrófagos M1 y M2	47
Figura 11. Estrategia para la determinación de monocitos/macrófagos M1 y M2 por citometría de flujo.	47
Figura 12. CMN posterior al estímulo con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28: pacientes controlados vs. no controlados.	48
Figura 13. CMN posterior al estímulo con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28: pacientes controlados vs. no controlados.	49
Figura 14. NTZ ejerce efectos inmunomoduladores sobre las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con diabetes tipo 2.	51

Lista de tablas

Tabla 1. Clasificación de la población de acuerdo con el grupo etario.	38
Tabla 2. Clasificación de la población respecto a su género e IMC.	38
Tabla 3. Clasificación de la población de acuerdo con el ICC.	39
Tabla 4. Clasificación de pacientes controlados y no controlados.	39
Tabla 5. Evaluación de la proliferación celular de linfocitos T entre pacientes controlados y no controlados.	42
Tabla 6. Determinación de subpoblaciones celulares de monocitos/macrófagos M1y M2 posterior al cultivo celular in vitro.	48

Resumen

Antecedentes: La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una afección inflamatoria de bajo grado con anomalías en la respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T y macrófagos. El reposicionamiento de fármacos para moléculas inmunomoduladoras es una propuesta atractiva para el tratamiento de la DM2. La nitazoxanida (NTZ) es un fármaco de amplio espectro con efectos inmunomoduladores prometedores. Por lo tanto, investigamos el efecto inmunomodulador y antiinflamatorio de NTZ en células mononucleares de sangre periférica (CMN) de pacientes con DM2.

Materiales y métodos: Se seleccionaron 50 pacientes con DM2, y se evaluó la respuesta proliferativa de linfocitos T y la relación M1/M2 de macrófagos post cultivo celular por citometría de flujo, además de medir la concentración de citocinas por ELISA y la expresión relativa de microRNAs (miRNAs) relacionados con la respuesta inmune por PCR en tiempo real.

Resultados: NTZ ejerce un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular de linfocitos T estimulados con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 sin modificar la viabilidad celular, y descensos significativos en las concentraciones sobrenadantes de interleucina (IL)-1 β , IL-2, IL-6, IL-10 e IL-12. Además, NTZ regula negativamente la expresión relativa de miR-155-5p sin cambios en miR-146a-5p. La relación M1/M2 de monocitos/macrófagos disminuyó la subpoblación M1 y aumentó la subpoblación M2 por efecto de NTZ.

Conclusiones: Nuestros resultados sugieren que NTZ ejerce efectos inmunomoduladores en CMN de pacientes con DM2, mostrando potenciales beneficios terapéuticos antiinflamatorios que podrían mejorar el estado de la enfermedad; estos hallazgos, junto con el amplio historial de seguridad del fármaco y la actual necesidad de tratamientos coadyuvantes, hacen relevante esta investigación para el futuro reposicionamiento farmacológico de NTZ.

Palabras clave: inmunomodulación; nitazoxanida; inflamación; DM2; miRNA.

Abstract

Background: Type 2 diabetes (T2D) is a low-grade inflammatory condition with abnormalities in the immune response mediated by T lymphocytes and macrophages. Drug repositioning for immunomodulatory molecules is an attractive proposal for treating T2D. Nitazoxanide (NTZ) is a broad-spectrum drug with promising immunomodulatory effects. Thus, we investigated the immunomodulatory and antiinflammatory effect of NTZ on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with T2D.

Methods: Fifty patients with T2D were selected, and the proliferative response of T lymphocytes and the M1/M2 ratio of macrophages post cell culture were evaluated by flow cytometry, as well as measuring the concentration of cytokines by ELISA and the relative expression of microRNAs (miRNAs) related to the immune response by real-time PCR.

Results: NTZ exerts an inhibitory effect on the cell proliferation of T lymphocytes stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies without modifying cell viability, and significant decreases in the supernatant concentrations of interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, and IL-12. Furthermore, NTZ negatively regulates the relative expression of miR-155-5p without changes in miR-146a-5p. The M1/M2 ratio of monocytes/macrophages decreased the M1 and increased the M2 subpopulation by NTZ.

Conclusions: Our results suggest that NTZ exerts immunomodulatory effects on CMN of patients with DM2, showing potential anti-inflammatory therapeutic benefits that could improve the state of the disease; These investigations, together with the long history of safety of the drug and the current need for adjuvant treatments, make this investigation relevant for the future pharmacological repositioning of NTZ.

Keywords: immunomodulation; nitazoxanide; inflammation; T2D; miRNAs

Introducción

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es un trastorno inflamatorio crónico degenerativo caracterizado por disfunción de la insulina e hiperglucemia crónica [1]. En 2021, la Federación Internacional de Diabetes (FID) reportó 463 millones de personas con diabetes en todo el mundo, con una prevalencia superior al 9%, de los cuales 1 de cada 2 casos aún no habían sido diagnosticados, y se proyecta que habrá 700 millones de casos en 2045[2]. La DM2 representa el 90% de todos los casos de diabetes, y su control inadecuado conduce a enfermedades cardiovasculares, insuficiencia renal, neuropatía y amputación de miembros inferiores, lo que resulta en hospitalizaciones frecuentes y muerte prematura [3]. Aunque existen muchas estrategias farmacológicas para tratar la DM2, todavía se necesitan abordar nuevos blancos terapéuticos y alternativas farmacológicas. La inflamación sistémica crónica se reconoce como un factor causante de la patogénia de la DM2[4], produciendo anomalías en la respuesta inmunitaria [5], como la proliferación y activación de linfocitos T y macrófagos; deterioro funcional de los linfocitos B y las células asesinas naturales; y disminución de la quimiotaxis, la fagocitosis y la opsonización [6]. La activación de las células T desempeña un papel en la promoción y el mantenimiento de los procesos inflamatorios [7]. Se ha informado que la hiperglucemia crónica desregula la función de las células T [8], lo que resulta en una pérdida significativa del mecanismo regulador natural mediado por las células T reguladoras (Treg) en la DM2, lo que exacerba aún más la activación y la inflamación de las células T [9]. Además, un aumento de las citocinas proinflamatorias se asocia con un control glucémico deficiente y complicaciones de la enfermedad [10]. Es ampliamente aceptado que la activación de los macrófagos se ve afectada por las células T [11]. Se ha informado que los pacientes con DM2 tienen un aumento significativo de macrófagos proinflamatorios M1 y una disminución de macrófagos antiinflamatorios M2 [12,13]. Los macrófagos M1 inducen un estado inflamatorio y de resistencia a la insulina (RI) a través de la inhibición de la señalización de la insulina, producida indirectamente por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6(IL-6) e interleucina 1 beta (IL-1 β)[14,15], mientras que los macrófagos M2 protegen contra la resistencia a la insulina por un mecanismo dependiente de interleucina 10 (IL-10)[16]. Las citocinas secretadas por las células inmunitarias son los reguladores dominantes de la inflamación patológica en la DM2; por lo tanto, la señalización de macrófagos también afecta la polarización del sistema inmunitario adaptativo para mantener una respuesta crónica de células T [17]. Recientemente, los microRNAs (miRNAs o miR) han sido reconocidos como reguladores clave de la respuesta inmunitaria, es decir, las células del sistema inmunitario expresan más de 1000 miRNAs diferentes [18], que juntos influyen en las vías que controlan el desarrollo celular y la función de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, que regulan las respuestas celulares al dirigirse a múltiples componentes de una vía biológica [19,20]. El microRNA155p (miR-155-5p) y el microRNA 146a-5p(miR-146a-5p) están regulados transcripcionalmente por el factor

nuclear kappa B (NF- κ B) y tienen múltiples funciones. Se ha demostrado que la expresión de miR-155-5p es esencial para el desarrollo y la función de las células T y los macrófagos, mejorando la respuesta inflamatoria, mientras que miR-146a-5p funciona como un regulador antiinflamatorio en varios tipos de células inmunitarias, suprimiendo el proceso inflamatorio. Estos miRNAs forman una red reguladora única para garantizar respuestas inflamatorias precisas al regular la actividad de NF- κ B, esencial para controlar el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular, así como la síntesis de citocinas, mientras que su desregulación conduce al desarrollo de inflamación crónica. en DM2 [21,22]. Debido a las altas tasas de falla, los costos elevados y la lentitud en el descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos, el reposicionamiento de los medicamentos existentes es una propuesta atractiva que implica el uso de compuestos libres de riesgo, con menores costos generales de desarrollo y plazos de entrega más cortos para el tratamiento de diversos tipos de enfermedades[23]. La nitazoxanida (NTZ) es un fármaco de tipo tiazolida sintetizado por amidación a partir del ácido cloruro acetilsalicílico y 2-amino-5-nitrotiazol con un amplio espectro de efectos antiinfecciosos que modulan notablemente la supervivencia, el crecimiento y la proliferación de una variedad de bacterias extracelulares y protozoos intracelulares, helmintos, bacterias anaeróbicas y microaerófilas, así como virus [24–26]. La NTZ es hidrolizada rápidamente por las esterasas presentes en el plasma a un metabolito activo, es decir, tizoxanida a través de la desacetilación. La tizoxanida (TZD) es una molécula muy polar con baja permeabilidad celular, razón por la cual se administra NTZ como profármaco [27]. Además, algunos estudios han informado que NTZ tiene funciones inmunomoduladoras prominentes, ejerciendo efectos inhibitorios en la producción de IL-6 por células RAW264.7 y macrófagos peritoneales estimulados por lipopolisacáridos (LPS) , lo que indica su papel regulador a nivel transcripcional [28]. Anteriormente, NTZ se propuso como un agonista de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas gamma (PPAR- γ)[29], así como un inhibidor de citocinas, enfatizando su papel potencial contra la "tormenta de citocinas" en la enfermedad por coronavirus SARS-COV-2 (COVID-19)[30]. Por lo tanto, se deben desarrollar nuevos enfoques para el tratamiento de la DM2 que investiguen mecanismos alternativos para regular funciones inmunitarias importantes. NTZ es un candidato a fármaco interesante para el tratamiento de la metainflamación que caracteriza a la DM2.

Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) fue documentada por primera vez hace 3000 años por los egipcios, quienes describieron como sus efectos la pérdida de peso y poliuria. El término "diabetes" fue acuñado por primera vez por Araetus de Cappodocia (81-133 A.C.). Posteriormente, la palabra mellitus (dulce de miel) fue añadida por Thomas Willis (Gran Bretaña) en 1675 después de redescubrir la dulzura en la orina y sangre de los pacientes (observada por primera vez por los antiguos indios). Fue solo en 1776 que Dobson (Gran Bretaña) confirmó por primera vez la presencia de exceso de azúcar en la orina y la sangre como causa de su dulzura [31]. Actualmente, la diabetes es una causa importante de mortalidad prematura con casi 1 muerte cada 10 segundos[2].

La DM es una alteración metabólica caracterizada por la presencia de hiperglucemia crónica y alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono, de las proteínas y de los lípidos. El origen y la etiología de la DM pueden ser muy diversos, pero conllevan inexorablemente la existencia de alteraciones en la secreción de insulina, de la sensibilidad a la acción de la hormona, o de ambas en algún momento de su historia natural [32]. Quienes viven con DM están en riesgo de desarrollar un conjunto de complicaciones graves y potencialmente mortales, que conllevan una creciente necesidad de atención médica y una reducida calidad de vida, ya que son propensos a complicaciones y a muerte prematura[2,33].

Los principales síntomas de la enfermedad son: sed, poliuria, polifagia, visión borrosa y pérdida de peso, los cuales no se aprecian oportunamente, provocando que el diagnóstico sea tardío. El inicio de la enfermedad, la velocidad de progresión y la naturaleza de los factores precipitantes externos y genéticos, varían en los diferentes tipos de diabetes[34].

Clasificación etiológica de la DM

El Comité de Expertos de la Asociación Americana de Diabetes (ADA) y la Federación Internacional de Diabetes (FID) han propuesto la siguiente clasificación:

I. Diabetes mellitus tipo 1 (DM1): Es ocasionada por la destrucción de las células β pancreáticas, lo que produce deficiencia absoluta de insulina. Esta se produce por dos mecanismos: inmunológicos e idiopáticos.

II. Diabetes mellitus tipo 2 (DM2): Representa el 90% de los casos de diabetes. Se caracteriza por RI, producida por las células β pancreáticas, derivada de una falla en la síntesis y/o efecto de esta hormona. Estos dos trastornos suceden simultáneamente y se manifiestan de manera variable en cada persona que la padece.

III. Diabetes mellitus gestacional: Consiste en la intolerancia a la glucosa que se manifiesta en el tercer trimestre del embarazo; es ocasionada por la acción de las hormonas contra-reguladoras que produce la placenta, y por la RI que ocurre en condiciones normales durante el embarazo.

IV. Otros tipos específicos de diabetes: Son el 1% de los casos y son originados por otras causas como: defectos genéticos en la acción de la insulina, en la función de las células β , enfermedades del páncreas exocrino, endocrinopatías, inducida por medicamentos o químicos, inducida por infecciones, formas no comunes de diabetes mediada por inmunidad y otros síndromes genéticos [35].

Diabetes Mellitus a nivel global

En 2021, la FID estimó que 537 millones de personas tenían diabetes (10.5% de prevalencia en adultos), y se proyecta que llegue a 643 millones para 2030 (incremento del 19.7% respecto a 2021), y 783 millones para 2045 (incremento del 37% respecto a 2021). También, se estimó que más de 6.7 millones de personas de edad entre 20 y 79 morirán por causas relacionadas con la diabetes en 2021. Estas cifras incluyen DM1 y DM2, así como diabetes diagnosticada y no diagnosticada. Además, las proyecciones muestran un crecimiento del 16% en la prevalencia esperada de diabetes debido al envejecimiento de la población; se estima que el mayor aumento porcentual de 2021 a 2045 en la prevalencia comparativa se producirá en los países de ingresos medios debido al envejecimiento de sus poblaciones. Casi uno de cada dos adultos con diabetes no sabe que tiene la afección (44.6%); 240 millones de personas viven con diabetes no diagnosticada, por lo que existe una clara necesidad de detectar la diabetes de manera temprana e iniciar acciones para prevenir complicaciones[2].

La variabilidad en casos de diabetes diagnosticada entre países a menudo está relacionada con varios factores, que incluyen la genética, las condiciones sociales y económicas, el desempeño del sistema de salud local y la conciencia general sobre la diabetes entre el público y los profesionales de la salud [36]. La DM2 representa el 90% de todos los casos de diabetes, y su control inadecuado conduce a enfermedades cardiovasculares, insuficiencia renal, neuropatía y amputación de miembros inferiores, lo que resulta en hospitalizaciones frecuentes y muerte prematura [37].

Diabetes Mellitus en México

De acuerdo con la FID, México ocupa el séptimo lugar mundial en incidencia de DM2; su prevalencia es de 14.1 millones de casos entre edades de 18 a 65 años. Para el 2045 se ubicará en el octavo sitio pero con 21.2 millones de casos[2], un incremento del 50% respecto al año 2021.

Según datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2018-2019, el 10.36% de los mexicanos registrados sabía que vivía con diabetes, siendo el 11.4% mujeres y el 9.1% hombres. Por otro lado, entre las personas con DM, solamente 85.5% mencionó haber recibido tratamiento médico, 72.4% recibió tratamiento farmacológico oral y 13% terapia con insulina. En México, durante 2018 había 82 767 605 personas de 20 años y más en el país, de las cuales 10.32% reportaron (8 542 718) contar con un diagnóstico médico previo de diabetes mellitus. Por género, 13.22% (5.1 millones) de las mujeres disponían de este diagnóstico y 7.75% (3.4 millones) en hombres. A nivel nacional poco más de una cuarta parte de la población de 60 a 69 años (25.8%) declaró contar con un diagnóstico previo de diabetes que representan 2.3 millones de personas. En el caso de las mujeres en este grupo de edad se presenta la prevalencia más alta con 35.6% (1.4 millones); es en los hombres del grupo de 70 y más años donde se concentra la prevalencia más alta con 18.4% de casos de diagnósticos previos de diabetes. Se encontró, además, que existe un inadecuado manejo médico para el tratamiento de la enfermedad y una falta de adherencia a un estilo de vida saludable. De resaltar fue que solamente 26.8% de las personas con diabetes mencionó que estaba llevando un plan de alimentación adecuado y solo 10.3% manifestó que realizaba actividad física como parte del manejo de su enfermedad. Estos dos últimos componentes son esenciales para el buen manejo de la diabetes [38].

En México, de acuerdo con los datos de mortalidad para 2020 de la Secretaría de Salud, se reportaron 1 086 743 fallecimientos, de los cuales 14% (151,019) correspondieron a defunciones por diabetes mellitus; 11.95 personas por cada 10 mil habitantes, la cifra más alta en los últimos 10 años. De estas, 52% (78,922) ocurrieron en hombres y 48% (72,094) en mujeres. Del total de fallecimientos, 98% (144,513) fueron por DM2 y de otro tipo y 2% (3,506) por DM1 [38].

La diabetes aumenta conforme aumenta la edad, el nivel socioeconómico y el índice de masa corporal (IMC). Se sabe que el sobrepeso y la obesidad aumentan la probabilidad de padecer DM2; de hecho, esta es considerada como la principal causa de diabetes. Tanto la diabetes como la obesidad han sido consideradas como epidemias en nuestro país[39].

Complicaciones de la Diabetes Mellitus

La hiperglucemia persistente en la DM no controlada puede causar varias complicaciones, tanto agudas como crónicas. La diabetes mellitus es una de las principales causas de enfermedad cardiovascular (ECV), ceguera, insuficiencia renal y amputación de miembros inferiores. Las complicaciones agudas incluyen hipoglucemia, cetoacidosis diabética, estado hiperosmolar hiperglucémico y coma diabético hiperglucémico. Las complicaciones microvasculares crónicas son la

nefropatía, la neuropatía y la retinopatía, mientras que las complicaciones macrovasculares crónicas son la arteriopatía coronaria, la arteriopatía periférica y la enfermedad cerebrovascular. Se estima que cada año entre el 1.4 y el 4.7 % de las personas de mediana edad con diabetes tienen ECV [40].

Diagnóstico de Diabetes Mellitus

De acuerdo con la ADA y la FID, para diagnosticar la DM, se debe cumplir con alguno de estos criterios, el cual deberá confirmarse para asegurar el correcto diagnóstico:

-Glucosa plasmática en ayuno (GPA). Mide el nivel de glucosa en la sangre en ayuno (el ayuno se define como la ausencia de ingesta calórica durante al menos 8 horas). Se diagnostica diabetes cuando la GPA es ≥ 126 mg/dL.

-Prueba aleatoria o casual de glucosa plasmática. Se puede realizar en cualquier momento del día. Se diagnostica diabetes cuando la concentración de glucosa en sangre es ≥ 200 mg/dL

-Prueba de tolerancia a la glucosa oral. Mide la concentración de glucosa en la sangre antes de tomar una carga de glucosa que contenga el equivalente a 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua, y también a los 30, 60 90 y 120 minutos después de ingerirla. Se diagnostica diabetes cuando la glucemia después de 2 horas de haber ingerido la bebida glucosada es ≥ 200 mg/dL

-Hemoglobina glicosilada (HbA1c). La prueba mide el nivel promedio de glucosa promedio en la sangre durante los últimos 3 meses. Se diagnostica diabetes cuando la HbA1c es $\geq 6.5\%$. La prueba debe realizarse en un laboratorio utilizando un método certificado por el Programa Nacional de Estandarización de la Glicohemoglobina (NGSP) y estandarizado para el ensayo [2,35].

Diabetes mellitus tipo 2

Las causas de la DM2 son multifactoriales e incluyen elementos tanto genéticos como ambientales que afectan la función de las células β y la sensibilidad a la insulina de los tejidos (músculo, hígado, tejido adiposo, páncreas), caracterizados por grados variables de RI, trastorno de la secreción de ésta y aumento de la producción de glucosa. La hiperglucemia resulta de la incapacidad de las células del cuerpo para responder totalmente a la insulina, lo que se conoce como RI. Durante el estado de RI, la hormona no es eficaz, lo que deriva en un aumento de la producción de insulina, que con el pasar del tiempo, se puede llegar a una producción de insulina inadecuada porque las células β pancreáticas no cumplen con la demanda[41].

La DM2 se ve con más frecuencia en adultos mayores, pero se evidencia cada vez más en niños y adultos jóvenes [2] como consecuencia del advenimiento de la industrialización en todo el mundo y el asombroso aumento de la obesidad, manifestándose como una epidemia mundial. El cambio en los estilos de vida es uno de los principales responsables del asombroso aumento en su

incidencia, y es una de las primeras causas de morbilidad y mortalidad y constituye un grave problema de salud pública, por ser la enfermedad metabólica y crónica degenerativa más común [42].

Las personas con DM2 tienen un alto riesgo de complicaciones microvasculares (incluidas la retinopatía, la nefropatía y la neuropatía) y macrovasculares (como las comorbilidades cardiovasculares), debido a la hiperglucemia y los componentes individuales del síndrome de RI. Los factores ambientales (la obesidad, una dieta hipercalórica y la inactividad física) y los factores genéticos contribuyen a las múltiples alteraciones fisiopatológicas que son responsables del deterioro de la homeostasis de la glucosa en la DM2, sin embargo, se requiere adicionalmente deterioro de la función de las células β pancreáticas. La RI y la alteración de la secreción de insulina siguen siendo los defectos centrales de la DM2, pero existen otras anormalidades fisiopatológicas, como el estrés oxidativo y la inflamación crónica de bajo grado, que contribuyen a la desregulación del metabolismo de la glucosa. Las múltiples alteraciones patogénicas presentes en la DM2 dictan que se requerirán terapias no farmacológicas y farmacológicas combinadas para mantener la normoglucemia; el tratamiento no solo debe ser eficaz y seguro, sino también mejorar la calidad de vida [43].

Fisiopatología de la Diabetes Mellitus tipo 2

La obesidad, el envejecimiento, la disfunción de las células β , la acumulación de lípidos en los tejidos, el estrés oxidativo, el estrés del retículo endoplásmico en las células β pancreáticas, la inflamación de los tejidos, el sobrepeso/obesidad y la inactividad física son los factores más comúnmente conocidos relacionados con la RI que progresan en la DM2. Además de estos determinantes, también se ha considerado que los participantes inmunológicos que causan inflamación desempeñan un papel en la RI al afectar las células β de los islotes pancreáticos[44].

En condiciones de ayuno, la producción hepática de la glucosa mantiene concentraciones normales de glucosa en la sangre. El hígado produce glucosa a través de la glucogenólisis y la gluconeogénesis. Posterior a una ingesta calórica, el intestino se convierte en la fuente principal de glucosa, aumentando la disponibilidad de la glucosa en el páncreas y estimulando al páncreas para secretar insulina. Esta hormona regula el transporte de glucosa y el metabolismo en tejidos blanco: el hígado, músculo esquelético y tejido adiposo para mantener en última instancia, la normoglucemia. Específicamente, la insulina suprime la producción hepática de glucosa a través de la inhibición de la gluconeogénesis y glucogenólisis; y aumenta la síntesis de glucógeno hepático. La insulina secretada en respuesta al nivel de glucosa en sangre también participa en la regulación del metabolismo, el crecimiento celular y la diferenciación al actuar sobre los receptores de la superficie celular [45,46]. Además, los principales efectos de la insulina en el músculo esquelético son aumentar la captación

de glucosa y su utilización. Por último, la insulina inhibe la lipólisis y la lipogénesis en el tejido adiposo. Por lo tanto, un estado de RI se caracteriza por alteraciones en la supresión mediada por insulina de la producción hepática de glucosa, eliminación de glucosa en el músculo esquelético y la inhibición de la lipólisis. Esto conduce a la hiperglucemia relativa y posteriormente DM2 [47].

Paracompensar la RI, las células β inician un proceso que termina en el aumento de su tamaño, produciendo mayor cantidad de insulina (hiperinsulinemia), que inicialmente logra compensar la RI y mantener los niveles de glucemia normales. Sin embargo, con el tiempo las células β pierden su capacidad para mantener la hiperinsulinemia compensatoria, produciéndose un déficit relativo de insulina, lo que provoca altos niveles de glucosa en circulación. Esta hiperglucemia aparece en los estados post-prandiales y luego en ayuno, a partir de lo cual se establece el diagnóstico de DM2[48].

El ME es el principal órgano blanco de la insulina, ya que allí se deposita, por efecto de la insulina, el 80% de la glucosa circulante. La llegada de los ácidos grasos (AG), provocada previamente por la hipertrofia e hiperplasia en el tejido adiposo, bloquea las señales de la insulina, lo que lleva a RI en tejido muscular esquelético. La unión de la insulina a su receptor fosforila el sustrato del receptor de insulina-1 (IRS-1) en tirosina, activando la vía de la fosfoinositol 3 cinasa (PI3-K), lo que provoca la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT-4), desde el citoplasma hasta la membrana celular, donde genera poros que permiten la entrada de la glucosa a la célula. Con la llegada de los ácidos grasos libres (AGL) se activa el diacilglicerol (DAG) y posteriormente la proteína cinasa C; que a su vez fosforila el IRS-1 pero ya no en tirosina sino en serina, y como consecuencia, el IRS-1 ya no queda disponible para la insulina, ocasionando la RI y el posterior desarrollo de DM2[49].

El daño de las células β pancreáticas tiene relación con la producción de estrés oxidativo, derivado de la oxidación de la glucosa (glucólisis) y de la oxidación de los AGL (beta oxidación). Es muy probable que el daño inicial sea más un efecto de glucolipototoxicidad, propia de la liberación de los AGL desde adipocitos resistentes a la insulina[50,51]. La glucolipototoxicidad es un término común usado en combinación para la glucotoxicidad y la lipotoxicidad, ya que se sabe que ambas progresan simultáneamente [49,52]. Esta glucolipototoxicidad, a su vez, causa estrés en el retículo endoplasmático (RE) dentro de los islotes pancreáticos. El RE sintetiza la mayoría de las proteínas, incluida la proinsulina en las células β pancreáticas, que se produce en exceso durante el nivel de glucosa crónicamente elevado ejerciendo un estrés adicional en el RE. Si no se recupera la homeostasis del RE para la producción de proteínas, el estrés podría terminar en apoptosis celular[53]. Además, en la DM2, se ha informado que las mitocondrias son el origen principal del estrés oxidativo que se

desarrolla y progresa en la DM2, ya que la hiperglucemia crónica altera la actividad de la cadena de transferencia de electrones mitocondrial (que involucra el complejo I-IV) [54]. Este estrés oxidativo da como resultado la producción y liberación de mediadores proinflamatorios (citocinas y quimiocinas)[55], que participan en la disfunción de las células β que conduce a RI e inflamación que se atribuye aDM2 [46]. Aunque, como se mencionó anteriormente, hay muchos factores patogénicos involucrados en la DM2, por lo que es bastante difícil estimar qué tipo de mecanismo está involucrado en diferentes tejidos, sin embargo, se considera que todos estos mecanismos de estrés celular se superponen entre sí y provocan la inflamación en los tejidos pancreáticos y otros órganos diana de la insulina[56,57].

La modulación de la vía de señalización de la insulina se ha asociado con varios factores que pueden desempeñar un papel potencial en la etiología de la resistencia a la insulina y la DM2. Las citocinas se incluyen en este grupo de factores y algunas, especialmente TNF- α , IL-1 β e IL-6, están intrínsecamente relacionadas con la regulación del metabolismo de los lípidos y la adipogénesis[46]. Una vez que se desarrolla la DM2, tiene consecuencias a largo plazo que pueden incluir aterosclerosis, neuropatía, retinopatía y nefropatía. En la actualidad, las diferentes teorías sobre los mecanismos implicados en el desarrollo de enfermedades metabólicas (entre ellas la DM2) y sus complicaciones confluyen en la existencia de un estado proinflamatorio crónico, en el cual las alteraciones metabólicas son elementos que interactúan con el sistema inmunológico y alteran diferentes vías antiinflamatorias[15].

Control de la Diabetes Mellitus tipo 2

La intervención terapéutica reduce las complicaciones de la enfermedad, por lo que es necesario detectar la DM2 al inicio de su evolución. El tratamiento de la diabetes tiene como propósito aliviar los síntomas, mantener el control metabólico, prevenir las complicaciones agudas y crónicas, mejorar la calidad de vida y reducir la mortalidad debido a la enfermedad o a sus complicaciones [58].El tratamiento de la hiperglucemia debe contemplarse como parte de un abordaje integral del conjunto de factores de riesgo que presentan estos pacientes (hipertensión arterial, dislipemia, obesidad, tabaquismo, alcoholismo) [59,60].

Un paciente con control glucémico adecuado debe tener una GPA entre 90-130 mg/dL para la ADA y entre 70-110 mg/dL para la Asociación Americana de Endocrinólogos Clínicos (AACE); respecto a la HbA1c, un paciente controlado debe tener valores debajo de 7.0% [37].Anivel nacional, la Norma Oficial Mexicana 015 (NOM-015-SSA2-2010) inciso 3.10, los pacientes controlados presentan de manera regular una glicemia plasmática en ayuno entre 70 y 130 mg/dL y HbA1c por debajo de 7% [61].

La piedra angular de la terapia es la dieta y el ejercicio, se debe fomentar una dieta baja en grasas saturadas, carbohidratos refinados, jarabe de maíz con alto contenido de fructosa y alta en fibra y grasas monoinsaturadas. El ejercicio aeróbico durante una duración de 90 a 150 minutos por semana también es beneficioso [62]. El objetivo principal en pacientes con DM2, que son obesos, es la pérdida de peso. Si no se puede lograr una glucemia adecuada, la terapia farmacológica es el siguiente paso [63]. Más allá del concepto de conseguir un buen objetivo glucémico, criterio que durante años ha primado, hoy las evidencias indican que el buen control de la DM2 se obtiene con un abordaje multifactorial, para reducir el riesgo y los eventos microvasculares. Los últimos consensos de la ADA y la Asociación Europea para el Estudio de la Diabetes (EASD) han señalado la necesidad de individualización del control, el uso de terapia combinada (en ciertos casos) y del cuidado de los factores de riesgo, debido a que en cada persona hay que ajustar las cifras de control que mejor se adapten [64,65]. El tratamiento farmacológico se relaciona con el retardo en la aparición y progresión de las complicaciones crónicas de la enfermedad [66,67].

Educación del paciente con Diabetes Mellitus tipo 2

Los pacientes deben ser instruidos sobre la importancia del control de la glucosa en sangre para evitar complicaciones asociadas con la DM. Se debe hacer hincapié en el manejo del estilo de vida, incluido el control de la dieta y el ejercicio físico. El autocontrol de la glucosa en sangre es un medio importante para que los pacientes asuman la responsabilidad del control de su diabetes. Es necesaria la estimación periódica de los niveles de glucosa, HbA1c y lípidos. Los profesionales de la salud deben informar a los pacientes sobre los síntomas de la hipoglucemia (como taquicardia, sudoración, confusión); se requiere énfasis en los chequeos regulares de los ojos y el cuidado de los pies [40].

Inflamación crónica de bajo grado asociada a Diabetes Mellitus tipo 2

Actualmente, se considera que la patogenia de la DM2 está vinculada a componentes inmunitarios tanto innatos como adaptativos que se reconocen como componentes etiológicos importantes en el desarrollo de la RI [68]. La obesidad se asocia con inflamación de bajo grado y es responsable de la activación del sistema inmunológico en pacientes que padecen DM2 [69,70]. La inflamación se relacionó por primera vez con la RI y la DM a principios de la década de 1990. Hotamisligil et al. reportaron un aumento de TNF- α en tejido adiposo de diferentes modelos animales de obesidad y diabetes; demostraron que la neutralización de TNF- α en ratas obesas mejoró la captación de glucosa periférica [71]; además, se demostró que otras citocinas inflamatorias, como IL-1 β , IL-6 e interferón gamma (IFN- γ), que aumentan en la obesidad y la DM, también modulan a

labaja la señalización de la insulina[72]. Por otro lado, varias citocinas antiinflamatorias, como interleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10), se han asociado con la protección de la sensibilidad a la insulina[73].

La activación anormal de las células inmunitarias y el entorno inflamatorio posterior tienen un papel esencial en la progresión de la DM2 [74]. La proliferación anormal de componentes del sistema inmune innato y adaptativo durante la inflamación del tejido adiposo puede conducir al desarrollo de esta patología[69]. Por otro lado, se observó que la polarización de los macrófagos proinflamatorios M1 aumentó y la activación de los linfocitos T CD4+ fue elevada [75–77].

Los macrófagos son el principal tipo de célula inflamatoria en los tejidos que captan la glucosa, como el tejido adiposo, músculo e hígado. Por ejemplo, macrófagos en tejido adiposo aumentaron de 5% en sujetos delgados hasta el 50% en individuos obesos diabéticos [78]. De manera que los estudios sobre la regulación inflamatoria de la diabetes se han centrado en la función inmunitaria innata (macrófagos) y adaptativa (linfocitos T) así como en la producción de sus citocinas, fundamentales en la patogénesis de la DM2 [7].

Macrófagos

Los macrófagos son el principal tipo de célula inflamatoria en los tejidos que captan la glucosa, como el tejido adiposo, músculo e hígado. Por ejemplo, los macrófagos en el tejido adiposo aumentaron de 5% en sujetos delgados a un nivel de hasta el 50% de todas las células del tejido adiposo en individuos obesos diabéticos [78]. Estas células expresan muchos marcadores de superficie celular indicativos de su estado inflamatorio y activación, como la expresión de CD14 (un receptor para LPS bacterianos) y CD16 (el receptor de baja afinidad para inmunoglobulina G, receptor Fcγ-III)[79]; los monocitos CD14+ CD16+ se relacionaron con el procesamiento y la presentación de antígenos y la inflamación [80]. Los macrófagos muestran una notable heterogeneidad fenotípica con la capacidad de desempeñar funciones muy diferentes según la condición biológica [81]. Por tanto, se ha caracterizado un espectro de muchas poblaciones de macrófagos diferentes mediante combinaciones de marcadores de membrana y perfiles de expresión génica. Esto condujo al establecimiento de una nomenclatura compleja, que con el tiempo se ha simplificado en dos fenotipos principales de macrófagos. Esta clasificación es una visión abstracta de la condición, ya que los macrófagos evolucionan dinámicamente de un fenotipo a otro según su entorno y pueden ocupar varios puntos del espectro con características mixtas [82].

La activación de los macrófagos se ha caracterizado principalmente por dos subpoblaciones: el clásico (M1, proinflamatorio) y el alternativo (M2, antiinflamatorio/proresolutivo)[83]. Los macrófagos M1 y M2 tienen diferentes perfiles transcripcionales y realizan diferentes funciones [84]. En general, las células M1 expresan en gran medida los marcadores de superficie CD80 y CD86, mientras que el subconjunto M2 expresa CD206 y CD163. El equilibrio de activación M1/M2 influye en la función de los órganos durante un proceso inflamatorio, como la invasión de patógenos. Durante una lesión, los macrófagos adoptan un fenotipo M1 para producir TNF- α , IL-1 β , interleucina 12 (IL-12), IL-6 e interleucina 23 (IL-23), entre otros, frente a los estímulos del patógeno. Sin embargo, cuando la respuesta M1 no está estrictamente regulada, se volverá perjudicial y causará daños en los tejidos, mientras que los macrófagos M2 contrarrestan la respuesta inflamatoria al secretar altas cantidades de inmunosupresores como IL-10 y factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), lo que contribuye a la reparación y remodelación de tejidos y promueve la angiogénesis, restaurando así la homeostasis de los tejidos [85].

En DM2, el mecanismo por el cual se incrementan los macrófagos M1 no ha sido descrito completamente, pero se ha propuesto que puede ser debido a un cambio fenotípico de M2 a M1 o bien, al reclutamiento de monocitos provenientes del torrente sanguíneo que se convierten en macrófagos en el tejido adiposo[14]. Los macrófagos M1 inducen un estado inflamatorio y RI a través de la inhibición de la señalización de la insulina mediado por TNF- α , mientras que los macrófagos M2 protegen de la RI a través de un mecanismo dependiente de IL-10 [86]. Además de sus actividades fagocíticas, los macrófagos producen diferentes tipos de señales para inducir la inflamación crónica, lo que desencadena la movilización de otras células inmunitarias hacia el sitio inflamatorio local y producir citocinas inflamatorias [87], perpetuando el estado inflamatorio que puede inducir al desarrollo de complicaciones.

En términos de marcadores de superficie celular que reflejan la activación de monocitos y macrófagos, Fadini y colaboradores[88] informan un aumento en la relación de polarización M1/M2 en DM2, ya que estos pacientes muestran una reducción en la frecuencia relativa de los marcadores M2 (CD206+/CD163+) , mientras que M1 (CD68+CCR2+) no cambian respecto a los controles. Además, la activación de los macrófagos está mediada por células involucradas en la inmunidad adaptativa. Las células T colaboradoras 1 (Th1) y T colaboradoras 17 (Th17) liberan IFN- γ e interleucina 17 (IL-17), que estimulan la diferenciación de macrófagos M1 proinflamatorios[89], mientras que las células Th2 y Treg promueven la polarización de macrófagos M2 antiinflamatorios a través de la producción de IL-4, IL-10 o interleucina 13 (IL-13)[90].

Además de los macrófagos, los monocitos también juegan un papel clave en la progresión de la obesidad y la RI en pacientes con DM2[91]. Los pacientes que padecen DM2 muestran una mayor expresión de marcadores de activación de monocitos (CD11b y CD36). Los bajos niveles de expresión de CD163 en la superficie de los monocitos se asociaron significativamente con la RI en pacientes con DM2 [92]. CD163 es un miembro del receptor tipo scavenger cuya función inmunológica es esencialmente homeostática; puede ser utilizado como biomarcador ya que su expresión es suprimida por mediadores proinflamatorios como LPS, IFN- γ y TNF- α , mientras que IL-10 lo regula positivamente en los monocitos y macrófagos[93]. Lo anterior demuestra el papel fisiopatológico de CD163 de los monocitos en el desarrollo de la RI y la DM2 [92] .

Linfocitos T

Las células T juegan un papel clave en la progresión de la DM2, asociándose con su hiperproliferación y sobreactivación a fenotipos proinflamatorios, así como a la activación de las vías inflamatorias [77]. La diferenciación de las células T efectoras está estrechamente relacionada con el proceso de regulación que influye en la producción de distintos conjuntos de citocinas efectoras , diferenciándose de manera anormal en pacientes con DM2[94]. También, se ha demostrado que la obesidad y la DM2 inducen la expresión de complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II en los adipocitos y, por lo tanto, activa las células T CD4+ para iniciar la inflamación crónica[95].

Las células T efectoras CD4+ se dividen principalmente en: Th1, T colaboradoras 2 (Th2), Th17 y T reguladoras (Tregs)[96].

Las células Th1 son células T CD4+ diferenciadas caracterizadas por la producción de IFN- γ , IL-2 TNF- α , [97], desencadenando inmunidad mediada por células e inflamación dependiente de fagocitos [96] . Las células producen citocinas antiinflamatorias claves como IL-4, interleucina 5 (IL-5), IL-6, interleucina 9 (IL-9), IL-10 e IL-13 [98], para regular negativamente las respuestas de anticuerpos [99]. Cuando las células T CD4+ se encuentran con la IL-6 y el TGF - β , tienden a diferenciarse en células Th17, productoras de IL-17, que desempeñan un papel patogénico en diversos trastornos inflamatorios. Las células Tregs son responsables de la regulación negativa de la respuesta inmunológica, mediante la producción de citocinas antiinflamatorias como IL-17 e interleucina 35 (IL-35)[100]. Los estudios han demostrado que las células Th1 y Th2 tienen un papel funcional clave en la regulación del proceso inflamatorio, aunque se activan más tarde que los macrófagos en la inflamación [12,101].

Linfocitos Th1 y Th2

Diversos estudios han demostrado que las células T CD4⁺ tienden a polarizarse a células proinflamatorias Th1 en sangre periférica y tejido adiposo en pacientes que padecen DM2; mientras que la polarización de las células Th2 antiinflamatorias está disminuída [102–106]. Además, la cantidad de células Th1 en tejido adiposo se correlacionó directamente con las concentraciones plasmáticas de proteína C reactiva de alta sensibilidad, mientras que la frecuencia de Th2 se correlacionó inversamente con las concentraciones plasmáticas de dicha proteína. Además, la frecuencia de células Th1 también se correlacionó con los niveles plasmáticos de IL-6 [107]. La secreción de TNF- α , IFN- γ e IL-17 y linfocitos Th1 aumentó drásticamente durante la patogenia de la RI induciendo el desarrollo de DM2 [108]. Con respecto a la relación entre la frecuencia de linfocitos y la activación de la enfermedad, se encontró que la frecuencia de células T CD3⁺ productoras de IFN- γ se correlacionó positivamente con el índice de masa corporal (IMC) [8,109]. Además, las citocinas producidas por Th1, IL-2 y TNF- β , son importantes para explicar la variación de HbA1c [110]. Durante la progresión de la DM2, los niveles de ácido ribonucleico mensajero (ARNm), IL-2 y TNF- α , se correlacionan positivamente con el porcentaje de Th1 y la proporción de Th1/Th2 [111].

Varios estudios clínicos han confirmado que Th1 estaba regulado a la alza en sangre periférica de personas con prediabetes o DM2 [112]. Por el contrario, las células T CD4⁺ vírgenes disminuyeron en los pacientes con DM2, lo que se asocia con la activación inmunitaria adaptativa y la inflamación crónica durante la patogénesis de la DM2 [113]. Es ampliamente aceptado que la activación de los macrófagos se ve afectada por las células T; las cuales desempeñan un papel dominante en la promoción o el mantenimiento de los procesos inflamatorios y la RI mediante la inducción de citocinas proinflamatorias en órganos metabólicos, como el tejido adiposo, el hígado, los músculos y el páncreas. Las células Th1 secretan IFN- γ para promover la polarización de M1 y mejorar sus funciones proinflamatorias al inducir la liberación de IL-1, IL-6 y TNF- α . Por el contrario, las células Th2 produce IL-4 e IL-13 para sesgar la diferenciación de los macrófagos hacia M2 [114,115]. Las células T CD4⁺ aumentan en el tejido adiposo e inducen el reclutamiento y la diferenciación de M1 secretora de TNF- α , mientras que la cantidad de M2 secretora de IL-10 disminuye significativamente en tejido adiposo [116]. Estos hallazgos sugirieron que la polarización de macrófagos M1 vs. M2 se consideraba un factor clave en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa mediada por linfocitos T, además que la evidencia experimental indica que la activación de la inmunidad mediada por células Th2 se retrasa y se ve afectada en la DM2 [117].

Linfocitos Th17

Th17, un importante subtipo de células T CD4+ proinflamatorias que secretan IL-17, se ha asociado fuertemente con DM2 [118]. Un estudio demostró las células Th17 aumentaron en pacientes con DM2 y podrían estar asociadas con un metabolismo lipídico desregulado [119]. Chen et al. [66] informó que los niveles de IL-17 están elevados en pacientes con DM2 recién diagnosticados que en sujetos de control. Además, encontraron un aumento en la expresión de ARNm de IL-17 y ROR γ T en CMN de pacientes con DM2 y dicho aumento en la expresión del gen IL-17 se asoció con la expresión del gen TNF- α . Además, el tratamiento con anticuerpos neutralizantes anti-IL-17 elevó la concentración sérica de adiponectina, redujo los niveles séricos de TNF- α y mejoró los marcadores de diferenciación de adipocitos [120]. Estos datos indican que la IL-17 podría desempeñar un papel crucial en el desarrollo de la RI y DM2. Varios resultados concluyeron que la desregulación de la producción de IL-17 puede resultar en una expresión excesiva de citocinas proinflamatorias e inflamación crónica [121]. También se ha demostrado que Th17 aumenta las complicaciones diabéticas, como la nefropatía diabética [122].

Linfocitos Treguladores

Se cree que las células Treg, un pequeño subconjunto de linfocitos T que constituyen solo del 5% al 20 % del compartimento CD4+, son importantes para prevenir respuestas inflamatorias excesivas y limitar el deterioro de los tejidos [123,124], mediante la supresión de la respuesta de células T efectoras, limitando la inflamación y previniendo la autoinmunidad [100,125,126]. Las células Treg expresan CD4, CD25 y el factor de transcripción Foxp3. Las células T CD4+ tienden a polarizarse a células Treg *in vitro* cuando se tratan con TGF- β , que parece depender de la oxidación de ácidos grasos y el metabolismo del colesterol en lugar de la glucólisis [127,128]. Las células Treg suprimen los niveles de células T efectoras por varias vías [129], incluida la inhibición de la proliferación inducida por el receptor de células T (TCR) y la transcripción de IL-2 de las células T convencionales [130], la liberación de citocinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β [131], la expresión de la molécula coinhibitoria del antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) [132] y la capacidad de migrar mediante la activación de la glucólisis [133].

El equilibrio entre las células Treg y Th1, Th2 o Th17 es importante para la respuesta inmunitaria en pacientes con DM2; las células Treg suprimen las actividades de estas células para mejorar la RI. Se ha informado que el porcentaje de células Treg disminuyó en la sangre periférica de pacientes con DM2, especialmente en pacientes recién diagnosticados, lo que culmina en el progreso de la inflamación y DM2 [134,135], con una concomitante disminución de la relación Treg/Th17 como de la Treg/Th1 [136]. Se ha descrito previamente que los altos niveles de insulina en un modelo de

obesidad inducida por la dieta afectan la capacidad de las células Treg para suprimir las respuestas inflamatorias a través de la vía de señalización AKT/mTOR[137], mostrando una expresión más baja de IL-10 y una capacidad deficiente para suprimir la producción de TNF- α [138].

Por lo general, las Treg regulan la respuesta de otros subtipos de células T, pero también pueden influir en las actividades de las células inmunitarias innatas [14,139]. Las células T reguladoras residentes en tejido adiposo se observaron comúnmente en las proximidades de los monocitos o macrófagos, lo que implica vínculos potenciales con los monocitos o macrófagos asociados a la adiposidad [114].

Citocinas

Las citocinas son un grupo de proteínas y glucoproteínas producidas por diversos tipos celulares, entre ellas las del sistema inmunológico, que actúan fundamentalmente como reguladores de las respuestas inmunitaria e inflamatoria; desempeñan un papel clave en el proceso inflamatorio que es definido por el balance entre citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias. Las citocinas actúan como reguladores sistémicos modulando la actividad de un amplio espectro de tipos celulares. El mecanismo biológico de las citocinas se produce a través de su interacción con receptores de membrana específicos que desencadenan una cascada de reacciones bioquímicas en el interior de la célula diana que determina su acción biológica[140]

Las citocinas constituyen una compleja red de interacciones: Pueden actuar de manera autocrina, paracrina, y endocrina. Están involucradas en el desarrollo, crecimiento y activación de las células del sistema inmunológico y en la respuesta inflamatoria, entre otras. Diferentes tipos de células secretan la misma citocina, y una citocina puede actuar en diversos tipos de células, fenómeno denominado pleiotropía[141].

IL-1 β

Es producida fundamentalmente por monocitos y macrófagos. Existen dos formas, IL-1 α e IL-1 β , aunque solamente tienen un 25 % de homología en su secuencia de aminoácidos, comparten el mismo receptor y ejercen efectos biológicos similares. La IL-1 β es una citocina multifuncional que afecta a casi todos los tipos celulares, considerada una de las citocinas pro-inflamatorias más importantes y su acción es en gran parte redundante. Es el principal pirógeno endógeno a través de la producción de prostaglandinas. Los principales efectos biológicos de IL-1 β incluyen: aumento de expresión de moléculas de adhesión celular en los sitios de inflamación, co-estimulación de células presentadoras de antígenos (CPA) y linfocitos T, proliferación de linfocitos B, hematopoyesis y

liberación de histamina por los mastocitos. La IL-1 β juega un papel clave en el inicio y desarrollo de la respuesta del hospedero, siendo un importante factor en el inicio de la respuesta inflamatoria y activación de funciones inmunológicas[142].

IL-2

La interleucina-2 (IL-2) es una citocina pleiotrópica que se identificó originalmente como un factor de crecimiento de células T. Es producida principalmente por los linfocitos T activados, formando parte de la respuesta de tipo Th1. La IL-2 desempeña el papel fundamental de promover la expansión, diferenciación y muerte de las células T activadas, que a su vez regulan las respuestas inmunitarias. Además, se descubrió que la IL-2 tiene un papel en la inducción de células Th1 y Treg. En conjunto, la IL-2 controla las respuestas inmunitarias al limitar las reacciones inmunitarias inapropiadas y al mismo tiempo mejorar las respuestas inmunitarias, estimulando la síntesis de interferón, la liberación de IL-1, TNF- α . IL-2 es necesaria para el establecimiento de la memoria inmunitaria celular, así como para el reconocimiento de autoantígenos y antígenos [143,144].

IL-4

La IL-4, una citocina pleiotrópica multifuncional con propiedades estimulantes de células B y promotoras de una respuesta Th2, producida principalmente por células T activadas, pero también por mastocitos, basófilos y eosinófilos. La IL-4 comparte homología de secuencia, receptores de superficie celular, señalización intracelular y efectos funcionales parciales en las células con la IL-13. Funcionalmente, la IL-4 es mejor conocida por tener un efecto antiinflamatorio sobre los linfocitos T y por regular la proliferación celular, la apoptosis y la expresión de numerosos genes en varios tipos de células, incluidos linfocitos, macrófagos y fibroblastos, así como células epiteliales y endoteliales. Otras actividades incluyen la regulación a la baja de la producción de IL-12, la respuesta de supresión de Th1 y la supresión o el bloqueo de las citocinas derivadas de monocitos, incluidas IL-1, TNF- α , IL-6, interleucina 8 (IL-8) y la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP) a través de su represión transcripcional[145,146].

IL-6

La IL-6 es producida por diversos tipos celulares: monocitos, macrófagos, linfocitos T y linfocitos B, fibroblastos, células endoteliales, adipocitos, entre otros. Es una citocina pluripotencial ya que tiene acciones tanto pro-inflamatorias como anti-inflamatorias. En la actualidad se le reconoce como el principal mediador de la respuesta de fase aguda, principalmente a través de la síntesis de proteína C reactiva; también posee efectos anti-inflamatorios al ejercer un control parcial sobre la producción de IL-1 β y TNF- α , y tener efecto antagonista a las células Treg; el mecanismo de

transseñalización activa varias rutas patológicas, como JAK/STAT3, Ras/MAPK, PI3K–PKB/Akt. A diferencia de IL-1 β y TNF- α que poseen acciones pro-inflamatorias. Los efectos de la IL-6 en la inmunidad dependen del contexto y de su concentración local, así como de la presencia o ausencia de otras proteínas reguladoras que actúan en la vía de transducción de señales, o de la concentración de su receptor soluble[147,148].

IL-10

La IL-10 es la citocina de mayor poder antiinflamatorio. Las funciones biológicas principales de la IL-10 son disminuir y regular la respuesta inflamatoria producida por las células dendríticas y los macrófagos, así como reducir las respuestas adaptativas de las células T CD4+ (Th1). Esta citocina es un potente inhibidor de la presentación antigénica, ya que reduce la expresión del CMH tipo II y de las moléculas accesorias de coestimulación CD80 y CD86. El efecto global es la inhibición de la maduración de dichas células, causando una reducción de las citocinas proinflamatorias como IFN- γ e IL-2, producidas por los linfocitos T. La IL-10 también inhibe la producción de otros mediadores inflamatorios como la IL-1 IL-6 y TNF- α , producidos por macrófagos. En células T CD4+ vírgenes, esta citocina inhibe la señalización por CD28, por lo que les impide activarse correctamente[149,150].

IL-12

IL-12 es una citocina heterodimérica y pleiotrópica producida principalmente por células fagocíticas en respuesta a bacterias, productos bacterianos y parásitos intracelulares y, en cierta medida, por linfocitos B. Influye en la inmunidad adaptativa al promover la respuesta Th1. Los receptores de IL-12 se encuentran principalmente en las células T y las células naturalkiller (NK). IL-12 exhibe múltiples funciones proinflamatorias: induce a los linfocitos Th0 a comprometerse con la diferenciación Th1, aumenta la actividad citolítica de las células NK y los linfocitos T citotóxicos, y es un potente inductor de las citocinas IFN- γ , TNF- α , factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e IL-10 de células T y células NK. La IL-12 derivada de macrófagos es inducida por la ingestión de bacterias, hongos, patógenos intracelulares (bacterias, virus) o productos bacterianos como el ácido desoxirribonucleico (ADN) bacteriano o la endotoxina. La IL-12 derivada de macrófagos impulsa a las células NK a generar IFN- γ , que a su vez aumenta la IL-12 derivada de fagocitos, en un poderoso ciclo proinflamatorio. La regulación de la actividad de IL-12 puede ocurrir ya sea a nivel del receptor o por regulación a la baja inducida por IL-4 o IL-10. Ambas citocinas inhiben la producción de IL-12 por los macrófagos y también pueden inhibir la capacidad de la IL-12 para mejorar la diferenciación de Th1; por el contrario, la IL-12 inhibe la expresión tanto de IL-4 como de IL-10 en sus células de origen[151].

MicroRNAs: biogénesis y función de los miRNAs.

Los microRNAs (miRNAs o miR) son una familia de ARN no codificantes de 19 a 23 nucleótidos que desempeñan un papel clave en múltiples procesos biológicos a través de la regulación de los niveles de muchas proteínas [152]. Esta función se ejerce a nivel de las regiones no traducidas 3' del ARNm (3'-UTR) para suprimir su traducción. Además de la supresión de la traducción del ARNm, los miR pueden controlar la degradación y el decaimiento del ARNm. Los miR se unen a la 3'-UTR de los ARNm diana mediante el emparejamiento directo de bases con la región semilla de 5'-miRNA, lo que da como resultado la represión de la traducción del ARNm o la inducción de la degradación del ARNm. Estos ARN se transcriben como grandes transcritos primarios miRNA (pri-miRNA) y son procesados en el núcleo por el complejo formado por la enzima endonucleasa ARNasa III Drosha y la proteína de unión a ARN DGCR8, para generar un bucle de tallo de ≈ 85 nucleótidos, denominado miRNAs precursores (pre-miRNA); estos precursores luego son exportados desde el núcleo al citoplasma por el complejo exportina 5/RanGTP (XPO5). En el citoplasma, otra enzima endonucleasa, Dicer, escinde los miRNAs precursores, generando un dúplex mi-R/miR* de 20–22 nucleótidos (formado por la cadena madura y la cadena “pasajero”) y luego los miRNA maduros [153].

Más de 10,000 miRs conservados están codificados por el genoma de los mamíferos. Actualmente, hay un total de 1881 genes precursores de miR humanos anotados pero la función de muchos de estos miR es en gran parte desconocida. Regulan muchos procesos biológicos al modular la expresión de 30 % de los genes, incluidos el desarrollo, la diferenciación, el metabolismo y la fisiología celular [154]. Está demostrado que la desregulación en la biogénesis y función de los miRs contribuye al desarrollo de enfermedades, por lo que emergen como novedosas huellas para detectar algunas patologías. Es importante destacar que se ha demostrado que los miRs funcionan como reguladores clave de las respuestas inmunitarias tanto en condiciones normales como patológicas [155]. Algunos miRs desempeñan un papel crucial como reguladores finos del sistema inmunitario innato y adaptativo, y algunos de ellos actúan como moduladores críticos de la respuesta inmunitaria contra los tumores [155]. Por todo lo anterior, las huellas de expresión de los miRs tienen potencial en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento en diversas enfermedades humanas. Su estabilidad y presencia en niveles consistentes y reproducibles en sangre periférica hacen posible su cuantificación, y los convierte en potenciales biomarcadores para el diagnóstico clínico y en posibles blancos terapéuticos [156].

Entre los diversos miRs que pueden desempeñar un papel en el control de la respuesta inmunitaria, miR-146 (miR-146a y miR-146b) y miR-155 surgieron como reguladores clave del

sistema inmunitario; una expresión desregulada de estos miRNAs también está implicada en el desarrollo de diversas enfermedades[157]. Tanto miR-146a como miR-155 responden particularmente a muchos estímulos inflamatorios, como los inducidos por algunas citocinas (TNF α , IL-1 β , interferones tipo I y tipo II (IFN), entre otras) o al TLR ligando en varios tipos de células, y particularmente en monocitos/macrófagos[158,159]. Ambos miRs apuntan y reprimen varios efectores: miR-155 a TNF α , polifosfato de inositol 5-fosfatasa 1 (SHIP1), el supresor de la señalización de citocinas 1 (SOCS1) y miR-146a al factor 6 asociado al receptor de TNF (TRAF6), la quinasa 1 asociada al receptor de interleucina-1-(IRAK1), la quinasa 1 asociada al receptor de interleucina-2 (IRAK2), el factor regulador de interferón 3 (IRF3) y al factor regulador de interferón 5 (IRF5). Finalmente, la expresión de estos dos miRNA se ha asociado con la perpetuación de la inflamación crónica [158,159].

miR-146a

miR-146a se encuentra en el cromosoma 5 y en humanos, se regula a la alza luego de la estimulación de los TLR, TNFR, IL1R y el receptor para compuestos de glucosilación avanzada (RAGE) de la superficie celular [160]. La expresión de miR-146a está directamente controlada por la unión de NF- κ B a su promotor [161]. Sin embargo, la inducción no se observa en todos los tipos de células, ya que neutrófilos polimorfonucleares no aumentan miR-146a después de la estimulación con LPS, a diferencia de los monocitos, macrófagos y células T [162].

miR-146a actúa como un regulador negativo de NF- κ B, induce una fosforilación reducida de I κ B α a nivel de serina 32, factor esencial para su degradación y liberación del complejo I κ B α /NF- κ B. Más concretamente, los experimentos llevados a cabo en células monocíticas estimuladas con LPS han demostrado que miR-146a se dirige a IRAK1, IRAK2 y TRAF6, reduciendo su expresión, y a todas las moléculas que juegan un papel clave como las quinasas adaptadoras de la ruta de la firma dependiente de MyD88, inducidas por la activación del TLR4. Además, miR-146a también se dirige a IRF3, otro componente de la vía de señalización dependiente de MyD88 [163,164].

Como consecuencia del direccionamiento de miR-146a de estos componentes reguladores, se ha demostrado que la expresión y liberación de muchas citocinas inflamatorias como IL-8 y RANTES disminuyen significativamente. Además, la IL-2 de las células T también se ve afectada[165]. La expresión de miR-146a aumenta durante la diferenciación de monocitos a macrófagos. LPS aumenta miR-146a, mientras que IL-4 reduce la expresión de miR-146a durante la maduración macrófaga[157]. Los estudios de eliminación de genes han demostrado que la deficiencia de miR-146a conduce a una producción excesiva de IL-6 y TNF α , síndrome mieloproliferativo, inflamación

crónica y una disminución en el número y la calidad de las células madre hematopoyéticas [166,167]. En ausencia de la expresión de miR-146a, los linfocitos Treg pierden sus efectos supresores, como consecuencia de la sobreexpresión de Stat1[168].

A diferencia de miR-155, el miR-146a limita la activación de las células T y promueve la resolución de las respuestas inflamatorias[166,169]. Así, estos dos miRNAs parecen tener impactos opuestos en la respuesta inflamatoria llevada a cabo por linfocitos T en contexto de diversas patologías [170].

miR-155

Uno de los miRs más destacados relacionados con la inflamación es miR-155, que está regulado a la alza tanto en células mieloides como linfoides después de su activación [171]; miR-155 es inducido en células inmunes estimuladas por TLR y citocinas proinflamatorias [172]. En células inmunes humanas y murinas, el miR-155 se puede clasificar como un gen de respuesta temprana, ya que su expresión es altamente inducido dentro de las 2 h de la activación de TLR [173]. miR-155 regula positivamente la señalización de TLR al dirigirse a moléculas de señalización clave, incluidas , MyD88, IKKe, el receptor que interactúa con proteína quinasa 1 (RIPK1), sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) y la subunidad p65 de NF- κ B[174,175]. miR-155 también facilita la señalización de CXCL12 a través de la inhibición de SHIP-1, un regulador negativo de las señales inducidas por TLR[176], resultando en el consiguiente aumento de la actividad de la quinasa AKT[177]. Esto es apoyado por la inhibición de SOCS1 por miR-155, que promovió las respuestas inflamatorias de los macrófagos y la señalización de IFN tipo I [178]; además, estas CPA deficientes en miR-155 exhiben una presentación antigénica alterada y, por lo tanto, no pueden activar las células T para promover la inflamación [179]. Paralelamente, otros estudios han informado de la inducción de la expresión de miR-155 durante la respuesta inflamatoria de los macrófagos inducida por diversos estímulos, incluidos los ligandos TLR, IFN- β e IFN- γ [180]. La activación de miR-155 implica la vía de la quinasa N-terminal c-Jun (JNK) [177].

La generación de macrófagos M1 se asocia con una alta inducción de la expresión de miR-155, mientras que la generación de macrófagos M2 se asocia con una inducción de miR-155 marcadamente inferior [181]. Respecto a las células T, miR-155 es requerido para el desarrollo de células Th1[182] y Th17 [183,184]. Se demostró que las células T de ratones deficientes en miR-155 tienen un sesgo hacia un fenotipo Th2, mientras que la sobreexpresión de miR-155 promueve un fenotipo Th1. El aumento del potencial de diferenciación Th2 de las células T CD4+ deficientes en miR-155 se atribuyó a una regulación positiva de c-Maf, un potente factor de transcripción del

promotor de IL-4 y un objetivo de miR-155. miR-155 también se dirige a IFN γ en células CD4+ cultivadas en condiciones Th1, que es una de las múltiples dianas conocidas responsables de la inhibición de la diferenciación Th1 de miR-155 en células T CD4+ [185].

Regulación y epistasis entre miR-146a y miR-155

Se ha demostrado que miR-155 y miR-146a forman una red reguladora única para garantizar una respuesta inflamatoria precisa a través de la regulación de la actividad de NF- κ B, existiendo una separación temporal en su dinámica de expresión, lo que permite esta arquitectura reguladora específica. También, se denota la jerarquía molecular y la interacción de estos dos miRs durante una respuesta inflamatoria, donde el miR-146a es esencial para regular a la baja al miR-155, evitando los efectos nocivos de su expresión elevada constante. Esta red reguladora permite una regulación estricta de un interruptor de "encendido" y "apagado" de la actividad de NF- κ B y la respuesta inflamatoria, demostrando que un estímulo inflamatorio conduce a la activación de NF- κ B, que a su vez activa la transcripción de miR-155. El miR-155 de rápida y alta transcripción reprime la expresión de SHIP1 y SOCS1 (entre otros objetivos potenciales), amplificando la actividad de NF- κ B y permitiendo un estado proliferativo para una fuerte y robusta actividad inflamatoria. A medida que se desarrolla la respuesta inflamatoria, los niveles de miR-146a se acumulan de manera retardada, lo que lleva a la represión de IRAK1 y TRAF6, atenuando así las señales de activación de NF- κ B. Por lo tanto, la actividad de NF- κ B se reduce, lo que conduce a la anulación de la transcripción de genes inflamatorios, así como de miR-155. Los niveles de miR-155 disminuyen gradualmente posterior a la estimulación, mientras que los niveles de miR-146a permanecieron altos y estables durante toda la duración de la respuesta. La rápida atenuación de los niveles de miR-155 permitió la regulación positiva de la expresión de SHIP1 y SOCS1, lo que refuerza la represión de la actividad de NF- κ B y la respuesta inflamatoria, asegurando la resolución del proceso inflamatorio; como regulador negativo, miR-146a contribuye a la regulación que determina la amplitud y duración de la respuesta. miR-155 funciona como un amplificador, proporcionando un fuerte inicio de una respuesta incluso frente al ruido, diferentes tipos de estímulos y varias concentraciones, así como una amplificación general en condiciones de estímulo subóptimas. Además, se demuestra el papel dominante que tiene la expresión de miR-155 en el desarrollo de la inflamación crónica. Estudios demuestran que cuando se elimina miR-146a, los niveles de miR-155 se elevan durante la respuesta inflamatoria, así como en condiciones de estado estacionario[21].

Reposicionamiento de fármacos

Debido a las altas tasas de falla, los costos elevados y la lentitud en el descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos, el reposicionamiento de los medicamentos existentes es una

propuesta atractiva que implica el uso de compuestos libres de riesgo, con menores costos generales de desarrollo y plazos de entrega más cortos para el tratamiento de varios tipos de enfermedades [23].

En los últimos años, muchas compañías farmacéuticas están desarrollando nuevos fármacos con el descubrimiento de nuevos objetivos biológicos mediante la aplicación de la estrategia de reposicionamiento de fármacos en el programa de descubrimiento y desarrollo de fármacos. Esto, maximiza el valor terapéutico de un fármaco y, en consecuencia, aumenta la tasa de éxito [186].

El reposicionamiento de fármacos confiere un riesgo reducido de falla donde se asocia una tasa de falla de aproximadamente 45% debido a problemas de seguridad o toxicidad en el programa tradicional de descubrimiento de fármacos con el beneficio adicional de ahorrar hasta 5 a 7 años en el tiempo promedio de desarrollo de fármacos [187]. Actualmente, la estrategia de reposicionamiento de medicamentos ha cobrado un impulso considerable, ya que aproximadamente un tercio de las aprobaciones de nuevos medicamentos corresponden a medicamentos reutilizados que actualmente generan alrededor del 25% de los ingresos anuales de la industria farmacéutica [188], contabilizando que aproximadamente el 30% de los medicamentos y productos biológicos (vacunas) aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de los EE. UU. (FDA) son medicamentos reposicionados. Además, las industrias farmacéuticas han colocado significativamente el mercado de medicamentos reutilizados en \$24,4 mil millones en 2015 con un crecimiento proyectado de hasta \$ 31,3 mil millones en 2020 [188]. Por lo tanto, esta es una estrategia emergente en la que los medicamentos existentes, que ya han sido probados como seguros en humanos, se redirigen en función de una molécula diana válida para ejercer un efecto farmacológico.

Actualmente, múltiples laboratorios farmacéuticos y de ciencia básica están investigando los mecanismos celulares y moleculares subyacentes que inician la inflamación y la relacionan con la resistencia a la insulina y el deterioro vascular. Estos nuevos hallazgos pueden brindar nuevas oportunidades para el tratamiento de pacientes con DM2[189], como la terapia antiinflamatoria y/o inmunomoduladora, proporcionando nuevas estrategias en su abordaje.

Nitazoxanida

La nitazoxanida (NTZ) es un fármaco de tipo tiazolida sintetizado por amidación a partir del ácido cloruro acetilsalicílico y 2-amino-5-nitrotiazol con un amplio espectro de efectos antiinfecciosos que modulan notablemente la supervivencia, el crecimiento y la proliferación de una variedad de bacterias extracelulares y protozoos intracelulares, helmintos, bacterias anaerobias y microaerófilas, así como virus [24–26]. Hoffman y colaboradores (2007) estudiaron el mecanismo de acción de

nitazoxanida frente a bacterias anaerobias y protozoarios, demostrando que inhibe la piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) y las reacciones de transferencia de electrones de enzimas dependientes que son esenciales para el metabolismo energético anaeróbico [190]. En *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) actúa como un desacoplador del potencial de membrana y la homeostasis al interior del organismo [191].

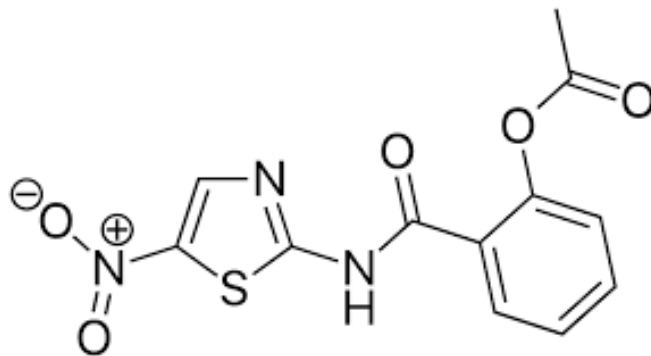


Figura 1. Estructura química de la nitazoxanida; es un fármaco de amplio espectro con efectos inmunomoduladores prometedores.

La NTZ se hidroliza rápidamente por las esterasas presentes en el plasma a un metabolito activo, es decir, tizoxanida a través de la desacetilación. La tizoxanida es una molécula muy polar con baja permeabilidad celular, razón por la cual se administra NTZ como profármaco [27]. Además, algunos estudios han informado que NTZ tiene funciones inmunomoduladoras prominentes, ejerciendo efectos inhibitorios en la producción de IL-6 por células RAW264.7 y macrófagos peritoneales estimulados por lipopolisacáridos con concentraciones inhibitorias del 50% (IC50s) de 1,54 mM y 0,17 mM, respectivamente, además de disminuir significativamente los niveles de IL-6 en ratones inyectados con tioglicolatoratones respecto a aquellos tratados con vehículo, lo que indica su papel regulador a nivel transcripcional [28]. Anteriormente, NTZ se propuso como un agonista de los receptores PPAR- γ en estudios *in-silico*, *in-vitro* e *in-vivo*[29,192], así como un inhibidor de citocinas, enfatizando su papel potencial contra la "tormenta de citocinas" en COVID-19 [30]. Por lo tanto, la NTZ tiene una enorme amplio espectro de actividad, que no solo se limita a propiedades antimicrobianas, sino también antiinflamatorias [24].

JUSTIFICACIÓN

La DM2 es una enfermedad de etiología multifactorial caracterizada por hiperglucemia crónica que por su magnitud y trascendencia es considerada un problema de salud pública a nivel mundial[41]. La FID estimó que el 94% del incremento en el número de personas con DM nivel global para el 2045 se dará en países de bajos y medianos ingresos, como México, donde se espera que el crecimiento poblacional sea mayor. En México, durante 2020, la DM pasó a ser la tercera causa de defunciones, superada por el COVID 19 y las enfermedades del corazón [193]; previamente ya se había decretado como alerta epidemiológica nacional el incremento de casos en nuestro país, lo que convierte al abordaje multidisciplinario de esta enfermedad en prioritario[194]. Actualmente, la respuesta inflamatoria es muy importante en la patogenia de la DM2, al considerarse la existencia de un estado inflamatorio crónico de bajo grado reconociendo componentes inmunitarios innatos y adaptativos como componentes etiológicos importantes en su desarrollo.

Una mejor comprensión de los mecanismos que vinculan la inflamación con la DM2 y las complicaciones relacionadas, ha incrementado considerablemente el interés en abordar las vías inflamatorias como parte de la estrategia para prevenir o controlar la DM2 y sus complicaciones, mediante el uso de biomarcadores inflamatorios, por lo que la regulación del proceso inflamatorio a nivel celular y molecular se ha asociado con un mejor control glucémico y una disminución de la incidencia de diabetes[187].;

En los últimos años se han estudiado múltiples enfoques médicos y farmacológicos que se dirigen directamente a las vías inflamatorias que respaldan el concepto de tratamiento antiinflamatorio y/o inmunomodulador para enfermedades como DM2[188,189]; se ha propuesto dirigirse a moduladores críticos del sistema inmunológico, para el control fenotípico de ciertas subpoblaciones que presentan alteraciones en su crecimiento, activación, proliferación, diferenciación y apoptosis[195], así como la producción y acción de sus citocinas secretadas, involucrando mecanismos moleculares que regulan estos procesos biológicos, como aquellos mediados por ciertos miRNAs (principalmente miR-155-5p y miR-146a-5p), que son responsables de coordinar la respuesta inflamatoria [190] y regular dichas vías de señalización, cuyas alteraciones perpetúan la inflamación crónica de bajo grado y favorecen el desarrollo de complicaciones clínicas.

Actualmente, el reposicionamiento de los medicamentos existentes es una propuesta atractiva que implica el uso de compuestos libres de riesgo, con menores costos generales de desarrollo y plazos de entrega más cortos para el tratamiento para diversos tipos de enfermedades[23]. Algunos estudios han informado que NTZ tiene funciones inmunomoduladoras prominentes, ejerciendo

efectos inhibitorios en la producción de varias citocinas[30], entre ellas la IL-6 secretada por células RAW264.7 y macrófagos peritoneales estimulados por LPS[28], indicando su papel regulador a nivel transcripcional [28]. Por todo lo anterior, se deben desarrollar nuevos enfoques para el tratamiento de la DM2 que investiguen mecanismos alternativos para regular funciones inmunitarias y moleculares importantes; NTZ es un candidato a fármaco inmunomodulador y/o antiinflamatorio a nivel celular, molecular y transcripcional interesante para mejorar la inflamación crónica y los procesos que subyacen durante el desarrollo y progresión de la DM2.

HIPOTESIS

Nitazoxanida ejercerá acciones inmunomoduladoras y anti-inflamatorias al regular la participación de biomarcadores de la respuesta inflamatoria crónica de bajo grado en un modelo *in-vitro* de células mononucleares de pacientes con diabetes *mellitus* tipo 2.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto inmunomodulador y antiinflamatorio de nitazoxanida en células mononucleares de pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar y clasificar a la población de estudio acorde a su estilo de vida, parámetros antropométricos y bioquímicos clínicos.
2. Cuantificar subpoblaciones M1 (proinflamatorias: CD14+, CD16+, CD 163-) y M2 (antiinflamatorias: CD14+, CD16+ Y CD163+) de monocitos de sangre periférica por citometría de flujo.
3. Evaluar el efecto de NTZ sobre la proliferación celular de linfocitos T de pacientes con DM2.
4. Determinar el efecto de NTZ en las citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias de sobrenadante del cultivo celular de CMN.
5. Evaluar el efecto de NTZ sobre la expresión relativa de miR-146a y miR-155 en CMN de pacientes con DM2.
6. Determinar el efecto de NTZ en subpoblaciones M1 y M2 de monocitos/macrófagos posteriores al cultivo in-vitro de CMN de pacientes con DM2.
7. Analizar diferencias entre las diferentes condiciones evaluadas y entre pacientes con DM2 controlados y no controlados.

MATERIALES Y MÉTODOS

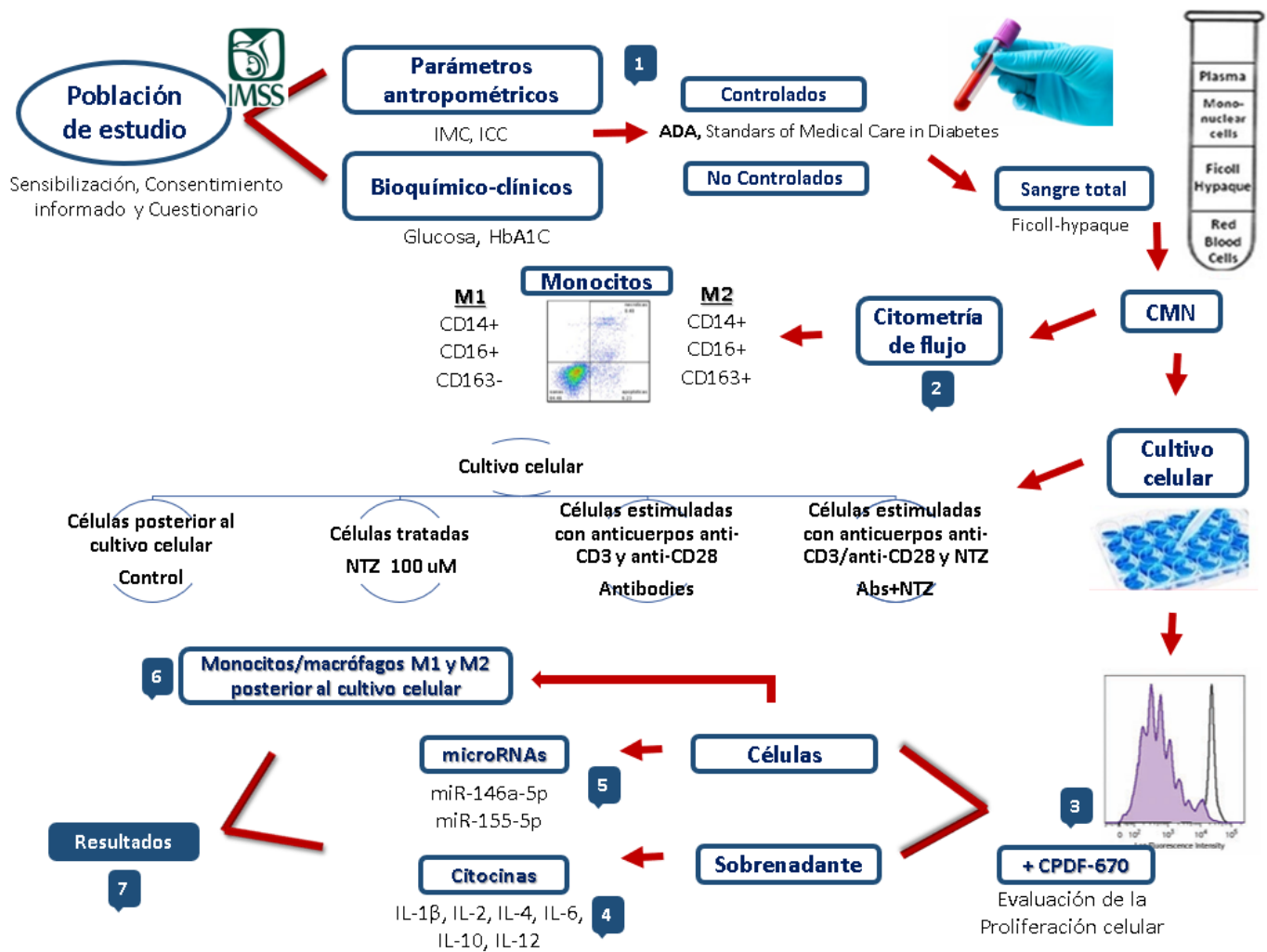


Figura 2. Resumen gráfico de la metodología empleada. Se seleccionaron 50 pacientes con DM2, y se evaluó la respuesta proliferativa de linfocitos T y la relación M1/M2 de macrófagos post cultivo celular por citometría de flujo, además de medir la concentración de citoquinas por ELISA y la expresión relativa de miRNAs relacionados con la respuesta inmune por PCR en tiempo real.

Diseño del estudio

Estudio prospectivo, transversal, analítico, experimental y comparativo.

Aislamiento de nitazoxanida de tabletas comerciales

Se utilizaron tabletas que contenían 500 mg de NTZ de Farmacias del Ahorro (México, lote R1710085). Se quitó la cubierta y el núcleo de la tableta se desintegró suavemente y se redujo a polvo usando un mortero. Se aisló NTZ de los excipientes mediante extracción heterogénea con

acetona y filtración a temperatura ambiente. Las aguas madres se evaporaron por rota evaporación y se aisló NTZ, obteniendo un polvo cristalino, amarillo e insoluble en agua con un rendimiento del 72%. La pureza de la NTZ aislada se confirmó mediante la comparación del punto de fusión de los datos de análisis espectroscópico, espectrométrico y elemental [196,197]. El punto de fusión de la muestra obtenida experimentalmente fue de 202 °C, lo que se correlacionó con lo reportado en la literatura (202 °C) [196,197]. Además, el análisis de resonancia magnética nuclear de la muestra aislada proporcionó los siguientes datos: ¹RMN H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2,18 (s, 3H, CH₃); 7,27 (dd, 1H, H-3'); 7,60 (td, 1H, H-4'); 7,28–7,30 (m, 1H, H-5'); 8,16 (dd, 1H, H-6'); 8,74 (s, 1H, H-4); 10,81 (s, 1H, NH). RMN 13C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 20,9 (CH₃), 117,8 (C-3'), 125,4 (C-5'), 131,4 (C-4'), 132,1 (C-6'), 132,9 (C-1'), 139,4 (C-5), 149,9 (C-2'), 153,2 (C-4), 162,3 (C-2), 163,2 (NHC=O) y 170,5 (OC=O) ppm. EM (FAB+): *m/z* 308 (M+H)⁺. Las colecciones de datos coincidieron con los informados en la literatura [198]. El análisis elemental confirmó ≥95 % de pureza de la muestra (±0,3 % del valor calculado): Anal. Calc. para C₁₂H₉N₃O₅S: C, 43,90; H, 2,95; N, 13,67; S, 10,44. Encontrado: C, 46,71; H, 2,94; N, 13,71; S, 10,39 [199].

Descripción de la población de estudio

El tamaño de la muestra se obtuvo mediante un ajuste estadístico, considerando el diseño del estudio. Los cálculos se realizaron mediante ajustes estadísticos al determinar variables y parámetros previamente evaluados por otros grupos de investigación [200]; estudios similares han utilizado un tamaño de muestra similar al utilizado en este estudio [201,202].

Cincuenta pacientes consecutivos, aleatorizados y dispuestos a participar con diagnóstico clínico de DM2 sin complicaciones fueron invitados a una consulta médica externa en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" en la Ciudad de México. Se incluyeron en nuestro estudio pacientes con diagnóstico de DM2 igual o menor a diez años, con tratamiento farmacológico y sin complicaciones. Se excluyeron pacientes con enfermedades infecciosas, cáncer, hemoglobinopatías, embarazo, lactancia o complicaciones crónicas avanzadas. Los criterios de eliminación fueron pacientes que no desearon participar en el estudio, pérdida de muestra y datos incompletos. Los datos sociodemográficos, de estilo de vida, de actividad física y nutricionales se obtuvieron mediante un cuestionario en el momento de la inclusión; se midieron parámetros antropométricos al momento de la consulta: peso, talla, circunferencia de cintura y cadera. El protocolo fue aprobado por los comités de investigación y bioética del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" (No. 20-1183). Todos los participantes firmaron un consentimiento informado para participar.

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMN).

Después de 8-10 h de ayuno, se obtuvieron 15 mL de sangre periférica por punción venosa con tubos colectores con anticoagulante ácido etilendiaminetetraacético(EDTA) (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) de cada paciente. El porcentaje de HbA1c se determinó mediante un analizador Cobas C111 (Roche, Basilea, Suiza). Las CMN se obtuvieron por centrifugación en Ficoll (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) a 1500 rpm durante 30 min. Se realizaron lavados con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se evaluó la viabilidad con azul tripán (0,04 %) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.).

Cuantificación de subpoblaciones M1 y M2 de monocitos de sangre periférica

Se utilizaron 5×10^5 CMN de sangre periférica por paciente y tiñeron con anticuerpos monoclonales anti-CD14 tipo IgG 2 κ marcado con ficoeritrina y cianina 7(PE-Cy7) (# 557742), anti-CD16 tipo IgG 1 κ marcado con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (# 555406) y anti-CD163 tipo IgG 1 κ marcado con ficoeritrina (PE) (# 556018) (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Nueva Jersey, EE. UU.). La expresión de CD163 se utilizó para determinar la presencia de poblaciones M2 o M1. Las células no marcadas y los anticuerpos de control de isotipo se usaron como referencia (controles). Los controles de isotipo fueron CD14 tipo IgG2 α κ marcado con PECY7, CD16 tipo IgG1 1 κ marcado con FITC y CD163 tipo IgG1 1 κ marcado con PE. Las subpoblaciones celulares se cuantificaron en un citómetro FACSAria (BD Biosciences), utilizando el software FACSDiva (BD Biosciences) y el programa FlowJo 7.6.2 (ThreeStar; Ashland, OR, EE. UU.).

Cultivo Celular *in vitro* de CMN

Un total de 5×10^5 CMN/pozo se cultivaron en placas de cultivo estériles de 24 pozos (transparentes, de poliestireno y de fondo plano) (Corning, Nueva York, NY, EE. UU.) con medio RPMI-1640 suplementado con L-glutamina, 1 % de penicilina/estreptomina y β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) y suero fetal bovino al 10 % (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EE. UU.).

Ensayos de proliferación celular

Para los ensayos de proliferación celular, 5×10^5 CMN expuestas a diferentes tratamientos se marcaron con fluoróforo CPDF-670 (Cell ProliferationDyeeFluor, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EE. UU.), que se usó para monitorear divisiones celulares individuales uniéndose a cualquier proteína celular que contenga aminos primarias; luego, el tinte se distribuyó por igual entre las células hijas, medido como una reducción sucesiva a la mitad de la intensidad de fluorescencia del tinte hasta

6 generaciones [203]. Las células sin estimulación con anticuerpos monoclonales y sin tratamiento con NTZ formaron el tratamiento de control; las células tratadas con NTZ 100 μ M formaron el tratamiento NTZ; células estimuladas con 100 ng/mL de anti-CD3 (ratón IgG2a, clon OKT3) (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE. UU.) y 500 ng/mL de anticuerpos anti-CD28 (ratón IgG1, clon CD28.2) (BioLegend, San Diego, CA, EE. UU.) conformaron el tratamiento Anticuerpos (Acs); las células estimuladas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 tratadas con NTZ 100 μ M formaron el tratamiento Acs + NTZ.

La concentración de NTZ se seleccionó en base a la investigación de SeongKeung Hong et al. [y nuestra anterior estandarización de la metodología, en la que encontramos efectos similares entre NTZ 100 μ M y concentraciones más altas. Para los cultivos celulares, se disolvió NTZ como solución madre 100 mM en dimetilsulfóxido (DMSO), y se realizaron titulaciones mediante diluciones 1:10 con PBS hasta alcanzar una concentración de 100 μ M. La concentración final de DMSO en los medios de cultivo fue inferior al 0,1 %. Una vez cultivadas las CMN, se añadieron simultáneamente los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (utilizados para la estimulación de células T) y NTZ 100 μ M. En el caso de los diferentes controles utilizados en el estudio, sólo se añadieron las NTZ o anticuerpos inmediatamente después de cultivar las CMN. Se realizaron pruebas de proliferación en todos los tratamientos aplicados [204,205], y debido a que los miRNA involucrados en una respuesta inmune se expresan diferencialmente después de la estimulación de células T (3–7 días) [206], seleccionamos 120 h de cultivo celular a 37 °C y 5 % de dióxido de carbono (CO₂) en un ambiente húmedo. Las muestras fueron medidas y cuantificadas por citometría de flujo (FACS Aria, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) mediante la incorporación del fluoróforo CPDF-670. El ensayo de viabilidad celular se realizó tiñendo y contando las células vivas o muertas con colorante azul tripán (0,04 %) para evaluar la integridad de la membrana celular.

Cuantificación de citocinas en sobrenadantes de cultivos celulares

Se recogieron los sobrenadantes de todos los cultivos celulares tratados y se determinaron las concentraciones de IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 e IL-12 mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) usando kits comerciales (Pharmingen; San Diego, California, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante; se añadió las muestras con las diferentes condiciones a evaluar una en un recipiente de reacción junto con las partículas paramagnéticas recubiertas con la citocina de interés monoclonal de ratón anti-humano, el reactivo de bloqueo y el conjugado. Después de la incubación, los materiales unidos a la fase sólida se mantuvieron en un campo magnético mientras que los materiales no unidos se eliminan por lavado. Posteriormente, el sustrato quimioluminiscente se agregó al recipiente y la luz generada por la reacción fue medida en un espectrofotómetro

especializado. La producción de luz fue directamente proporcional a la concentración de la citocina de interés en la muestra a partir de una curva de calibración multipunto.

Aislamiento de ARN de CMN

Se recuperaron las CMN cultivadas en las diferentes condiciones evaluadas. El ARN total se extrajo de CMN mediante el método Qiazol siguiendo el protocolo del fabricante (Qiagen, Hilden, Alemania). La concentración y la pureza del ARN se evaluaron usando un Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific; Rockford, IL, EE. UU.). La expresión de miR-155-5p y miR-146a-5p se determinó usando el ensayo de cebador RT y sondas de hidrólisis (AppliedBiosystem; CA, EE. UU.). El ARN extraído aislado se convirtió inmediatamente en ADNc, como se describe a continuación.

Determinación de miRNAs por RT-qPCR.

Los miRNAs se determinaron usando RT-qPCR de dos pasos con ensayo específico de cebador RT en combinación con sondas TaqMan (AppliedBiosystem; CA, EE. UU.). Cada reacción de RT utilizó 2,5 μ L de los 14 μ L de ARN eluido utilizando el kit de transcripción inversa TaqMan MicroRNA (AppliedBiosystems; CA, EE. UU.). El programa de reacción de RT consistió en 30 minutos a 16 ° C, 30 minutos a 42 ° C y 5 minutos a 85 ° C. Los miRNA se detectaron y cuantificaron utilizando miRNAs Assays miR-155-5p (Assay ID: 463509_mat; AppliedBiosystem; CA, EE. UU.), MiR-146a-5p (Assay ID: 001187; AppliedBiosystem; CA, EE. UU.) Y como gen de referencia U6 (ID de ensayo: 001973; AppliedBiosystem; CA, EE. UU.). Los 1,5 μ L de reacción de RT se amplificaron en reacciones de 10 μ L. Las condiciones de los ciclos de PCR fueron la desnaturalización inicial a 95 ° C durante 5 min, seguida de 45 ciclos a 95 ° C durante 10 s, a 60 ° C durante 40 s y a 72 ° C durante 5 s. La PCR se realizó utilizando un sistema LightCycler TM 480 II (Roche AppliedScience, Basilea, Suiza) con el kit LightCycler 480 Probes Master (Roche AppliedScience). Las concentraciones relativas de miARN se normalizaron con los valores de control de U6, y los valores se calcularon utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Determinación de subpoblaciones de monocitos / macrófagos M1 y M2 después de cultivo celular *in-vitro* por citometría de flujo.

Se cultivaron 1×10^5 CMN estimuladas con anticuerpos o estimuladas más el tratamiento con NTZ (Acs + NTZ) por paciente en las mismas condiciones. Después de 120 horas, las células se recolectaron y lavaron con PBS suplementado con suero bovino fetal al 1% (Thermo Fisher Scientific; Rockford, IL, EE. UU.) y azida sódica al 0,1% (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE. UU.) y tiñeron con anticuerpos monoclonales anti-CD14 PE, anti-CD16 FITC y anti-CD163 PE. Las subpoblaciones

fueron cuantificadas por citometría de flujo (FACSAria, BD Biosciences), utilizando el software FACSDiva (BD Biosciences) y el programa FlowJo 7.6.2 (ThreeStar; Ashland, OR, EE. UU.).

Análisis estadístico

Los datos se presentan como mediana. La prueba de Friedman seguida de la prueba de Tukey se utilizó para el análisis de muestras múltiples. Las correlaciones entre variables se determinaron mediante la prueba de Pearson; $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPadPrism v7.0 (GraphPadInc, La Jolla, CA, EE. UU.) y el software SPSS v15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, EE. UU.).

RESULTADOS

Descripción de la población y estilos de vida

La población de estudio consistió en 38 mujeres (76%) y 12 hombres (24%). La edad de los pacientes fue de 35 a los 80 años, con una mediana de edad de 53 años y el rango etario predominante osciló entre los 51 a los 60 años con 18 participantes (36%) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de la población de acuerdo con el grupo etario.

Grupo etario	Número de participantes	Porcentaje
31 a 40 años	4	8%
41 a 50 años	15	30%
51 a 60 años	18	36%
61 a 70 años	10	20%
71 a 80 años	3	6%
Total	50	100%

Según el cuestionario de autoinforme, los pacientes refirieron: hipertensión arterial (56%), cardiopatía (20%), consumo de alcohol (menos de 21 unidades de bebida estándar/semana) (24%), consumo frecuente de bebidas azucaradas (1000 mL mínimo semanalmente) (50%), tabaquismo (12%), actividad física moderada de 3 a 6 MET (unidad de medida del índice metabólico que permite establecer la intensidad de una actividad) (58%), dieta balanceada (consistente en 2000 kcal /día) (56%) y metformina como tratamiento anti hiperglucemiante (84%).

El 90% de la población de estudio tiene sobrepeso u obesidad

Al momento de recolección de la muestra sanguínea, 45 (90%) pacientes (35 mujeres y 10 hombres) tenían sobrepeso u obesidad ($\text{ÍMC} \geq 25,0 \text{ kg/m}^2$). En promedio, la población estudiada presentó un IMC promedio de 29.47 kg/m^2 ; para el género femenino, el promedio fue de 30.32 kg/m^2 y para el género masculino de 28.62 kg/m^2 (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de la población respecto a su género e IMC.

Género	Normopeso ¹	Sobrepeso ²	Obesidad ³	Total
Femenino	4	21	13	38
Masculino	1	8	3	12
Total	5	29	6	50

¹ Normopeso: 18 a 24.9 kg/m^2 .

² Sobrepeso: 25 a 29.9 kg/m².

³Obesidad: ≥ 30 kg/m²

El Índice de Cintura-Cadera (ICC) es una medida antropométrica específica para determinar los niveles de grasa intraabdominal. La OMS establece como valores normales de 0.75 a 0.84 en mujeres y de 0.78 a 0.94 en hombres; valores superiores indican obesidad abdominovisceral, lo cual se asocia a un riesgo cardiovascular elevado e incremento de la probabilidad de contraer otras enfermedades como hipertensión arterial [207]. Del total de pacientes, 43 (86%, 35 mujeres y 8 hombres) tuvieron un aumento de la relación cintura-cadera. La población total presentó un promedio de ICC de 0.95, siendo para el género femenino de 0.94 y para el masculino de 0.98 (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de la población de acuerdo con el ICC.

Genero	Rangos de ICC	Número de pacientes	Total
Femenino	0.75-0.84	4	38
	>0.84	34	
Masculino	0.78-0.94	3	12
	>0.94	9	

Dos de tres pacientes no tienen un control glucémico adecuado

Según el porcentaje de HbA1c, las guías de la Asociación Americana de Diabetes (ADA)[208] y la Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010 para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus, 15 (30%) pacientes fueron controlados y 35 (70%) descontrolados. (Tabla 4). El promedio de HbA1c en mujeres fue de 9.85% y en hombres de 8.91%.

Tabla 4. Clasificación de pacientes controlados y no controlados.

Paciente	No. pacientes	%	HbA1C
Controlado	14	28%	5.49%
No controlado	36	72%	10.15%
Total	50	100%	9.17%

En pacientes con DM2 existe un incremento de monocitos M1 en sangre periférica

La población seleccionada presentó un promedio de 17.67% de monocitos M1 proinflamatorios respecto al 1.88% de monocitos M2 antiinflamatorios, (proporción 1 a 9). Los pacientes controlados tuvieron un promedio de 15.09% de M1 y 1.99% de M2 (proporción 1 a 7),

mientras que en los no controlados fue de 18.83% y 1.83% de M1 y M2 respectivamente (proporción 1 a 10), no encontrando diferencias significativas entre ambos grupos. La proporción M1/M2 fue similar entre controlados y no controlados (Figura 3).

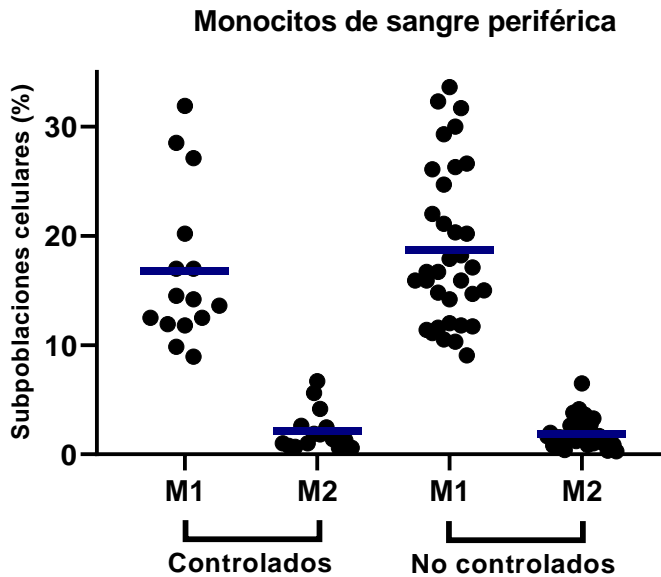


Figura3. En pacientes con DM2 existe un incremento de monocitos M1 y disminución de M2 en sangre periférica. Se utilizaron CMN de sangre periférica y tiñeron con los anticuerpos anti-CD14, anti-CD16 y anti-CD163. Las subpoblaciones celulares se cuantificaron en un citómetro FACSAria (BD Biosciences), utilizando el software FACSDiva (BD Biosciences) y el programa FlowJo 7.6.2. Se muestran las medias de las diferentes subpoblaciones celulares. T de student para muestras independientes. M1 p=0.181, M2 p=0.707

NTZ inhibe la proliferación de células T inducida por anti-CD3 y anti-CD28

El porcentaje de proliferación celular de células estimuladas con anticuerpos tratadas con NTZ (Acs + NTZ) fue tres veces menor en comparación con las células estimuladas con anticuerpos (Anticuerpos) ($p < 0,0001$), y NTZ fue similar en comparación con el grupo control. Además, la viabilidad celular fue similar en todas las condiciones evaluadas: Control 91%, Anticuerpos 95%, NTZ 87% y Acs + NTZ 89% (Figura 4). Los histogramas producto del análisis de la citometría de flujo se muestra en la Figura 5.

Evaluación de la proliferación celular

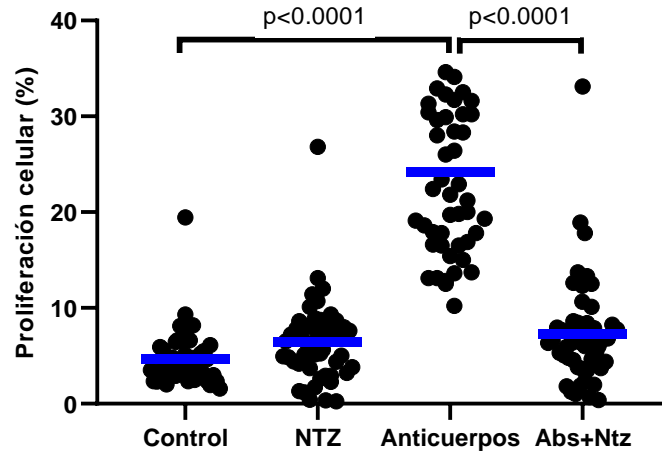


Figura 4. NTZ inhibe la proliferación celular inducida por anti-CD3 y anti-CD28 en CMN. Se evaluó la proliferación celular a los 5 días utilizando CPDF-670 en CMN con medio celular RPMI-1640 (Control), CMN tratadas con nitazoxanida 100 μ M (NTZ), CMN estimuladas con anticuerpos anti-CD3 y anti CD28 (Anticuerpos) y CMN estimuladas con anticuerpos y tratadas con nitazoxanida (Acs + NTZ). El diagrama de puntos dispersos muestra medidas individuales y la barra representa la media. T de student para muestras independientes.

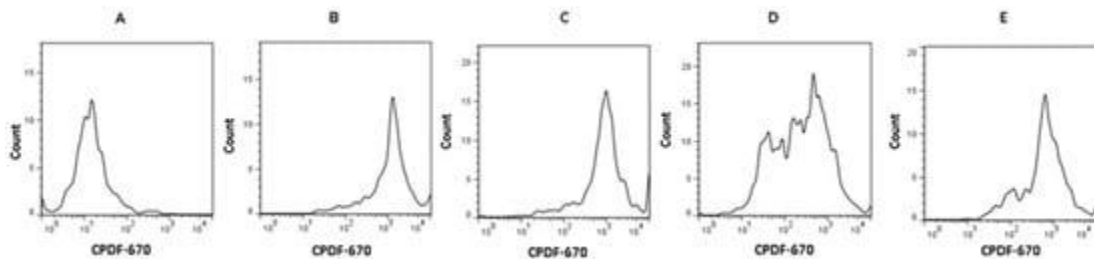


Figura 5. Histogramas de las condiciones evaluadas en los ensayos de proliferación celular. Histogramas de análisis de citometría de flujo que muestran células no marcadas con CPDF-670 cultivadas en ausencia de estímulo o tratamientos (A), CMN marcadas con CPDF-670 cultivadas sin estímulo o tratamientos (B), CMN marcadas con CPDF-670 con tratamiento NTZ 100 μ M (C), CMN marcadas con CPDF-670 y estimuladas con anti-CD3 y anti-CD28 (D), CMN marcadas con CPDF-670, estimuladas con anticuerpos anti-CD3, anti-CD28 y tratamiento con NTZ 100 μ M (E).

En el análisis de pacientes controlados vs. no controlados, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones evaluadas (Figura 6). Los resultados completos se muestran en la Tabla 5.

Evaluación de la proliferación celular: Controlados vs. no controlados

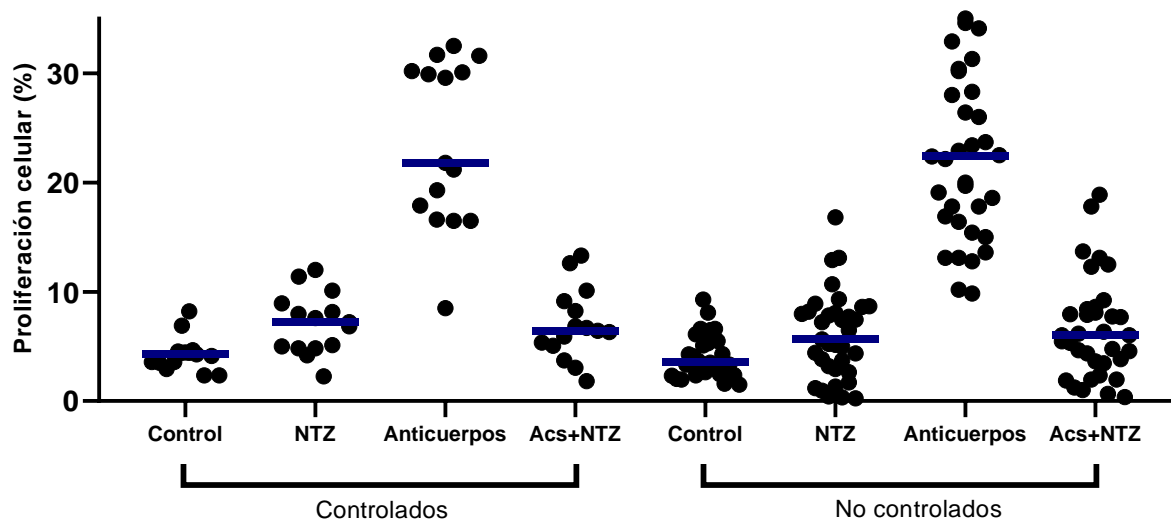


Figura 6. Evaluación de la proliferación celular entre pacientes controlados vs pacientes no controlados.

Se evaluó la proliferación celular de linfocitos T entre pacientes controlados (HbA1c <7.0%) y no controlados (HbA1c ≥7.0%) a los 5 días a 37°C, 5% de CO₂ y atmósfera húmeda, utilizando el fluoróforo CPDF-670 en CMN con medio celular RPMI-1640 (Control), CMN tratadas con nitazoxanida 100 μM (NTZ), CMN estimuladas con anticuerpos anti-CD3 y anti CD28 (Anticuerpos) y CMN estimuladas con anticuerpos y tratadas con nitazoxanida (Acs + NTZ). El diagrama de puntos dispersos muestra medidas individuales y la barra representa la media. T de student para muestras independientes. Control, p=0.739; NTZ, p=0.0.728; Anticuerpos, p=0.722; Abs+NTZ, p=0.978.

Tabla 5. Evaluación de la proliferación celular de linfocitos T entre pacientes controlados y no controlados.

	Control	NTZ	Anticuerpos	Acs + NTZ
Paciente controlado	4.29%*	6.97%*	23.12%*	6.92%*
Paciente no controlado	4.08%*	6.40%*	21.93%*	6.97%*
General	4.14%*	6.56%*	22.26%*	6.96%*

*Porcentaje de proliferación celular

NTZ disminuye las citocinas proinflamatorias en los sobrenadantes de CMN.

En comparación con los niveles de citocinas producidos por células sin tratamiento (Control), las células tratadas con NTZ mostraron una disminución significativa en las concentraciones de IL-1β

($p = 0.0291$), IL-2 ($p = 0.0417$) e IL-6 ($p = 0.0320$), mientras que las células estimuladas con anticuerpos aumentaron significativamente los niveles de IL-2 ($p = 0,0155$), IL-6 ($p = 0,0462$), IL-10 ($p = 0.0318$) e IL-12 ($p = 0.0035$). Sin embargo, esos incrementos se inhibieron cuando las células se estimularon con los anticuerpos y trataron con la NTZ (Acs+NTZ) (IL-2 $p < 0.0001$; IL-6 $p < 0.0001$; IL-10 $p < 0.0001$; e IL-12 $p = 0.0155$), restableciendo los niveles de manera similar a los detectado en células tratadas solo con NTZ, lo que demuestra los efectos inhibidores de NTZ en la producción de citocinas inducidas por anticuerpos en CMN.

Curiosamente, las concentraciones de IL-4 no se alteraron por ningún tratamiento, mientras que la IL-1 β disminuyó cuando las células fueron tratadas con NTZ respecto al control ($p = 0.0291$) pero sin mostrar cambios significativos cuando se estimularon con anticuerpos ni en el estímulo + el tratamiento (Acs + NTZ) (Figura 7).

El análisis entre pacientes controlados y no controlados no reveló diferencias significativas entre las evaluaciones realizadas para cada citocina ($p > 0.05$).

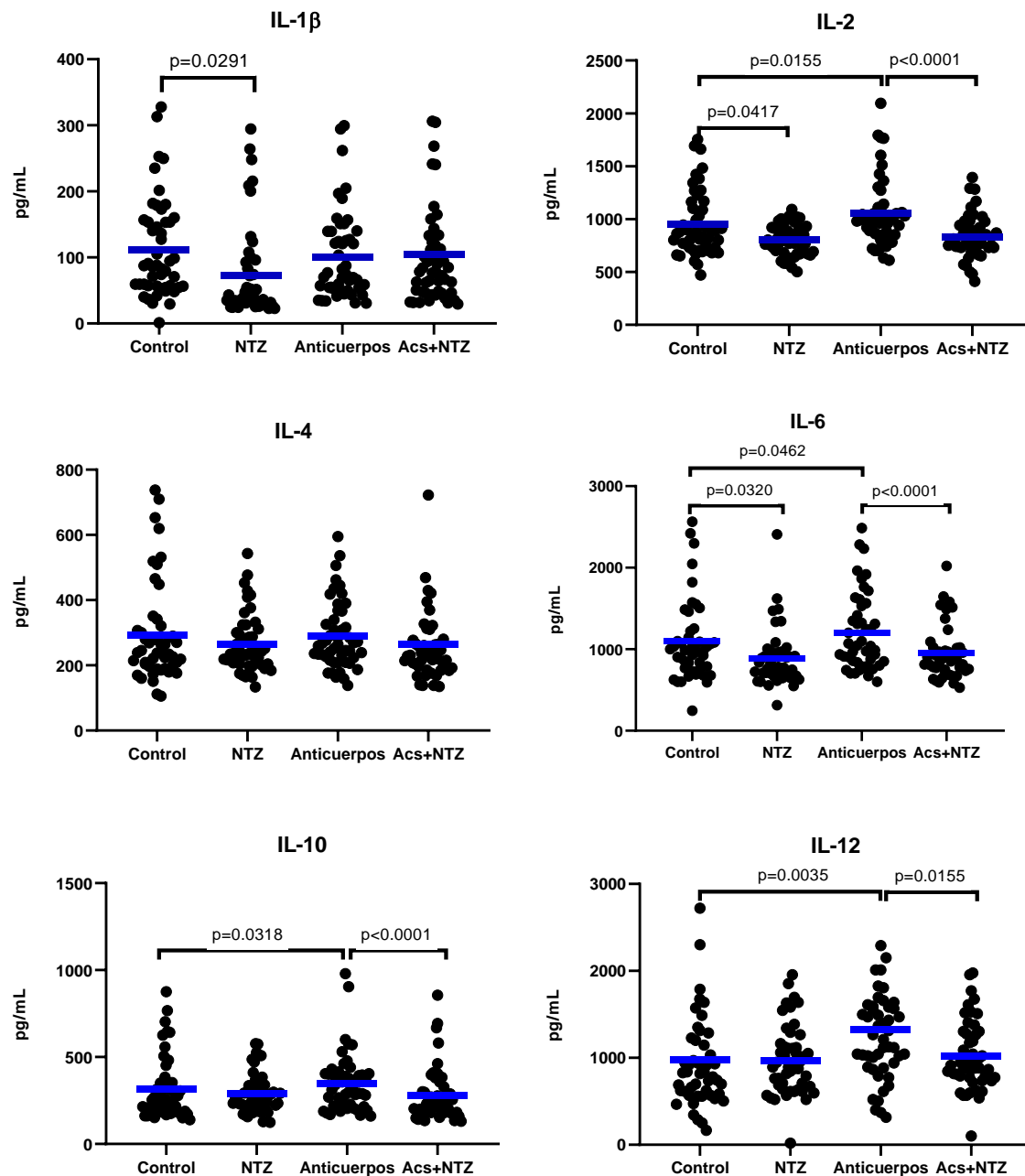


Figura 7. NTZ reduce los niveles de citocinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12 en el sobrenadante de CMN. La medición se realizó a los 5 días de cultivo celular mediante el ensayo ELISA, se evaluaron las citocinas según el tipo de tratamiento realizado en las CMN: Células con medio celular RPMI-1640 (Control), CMN tratadas con NTZ 100 μ M (NTZ), CMN estimuladas con anticuerpos anti-CD3 y anti CD28 (Anticuerpos) y CMN estimuladas con anticuerpos y tratadas con NTZ (Acs + NTZ). El diagrama de puntos dispersos muestra medidas individuales y la barra representa la media. Se muestran la prueba de Friedman para muestras pareadas $p < 0.05$, el DHS post hoc de Tukey y los valores p exactos para pruebas individuales.

NTZ regula negativamente la expresión de miR-155-5p en CMN.

Las CMN tratadas con NTZ mostraron niveles relativos significativamente más bajos de miR-155-5p que las células no estimuladas (Control) ($p < 0.0001$). Por el contrario, las CMN estimuladas con anticuerpos mostraron niveles más altos de expresión de miR-155-5p en comparación con las células no tratadas (control) ($p = 0.0032$). Además, se encontró regulación descendente de la expresión relativa de miR-155-5p en células tratadas con anticuerpos y NTZ (Acs + Ntz) en comparación con CMN estimuladas solo con anticuerpos ($p < 0.0001$), indicando que NTZ está ejerciendo un efecto inmunomodulador a nivel de miR-155-5p. La expresión relativa de miR-146a-5p no mostró diferencias entre todas las condiciones evaluadas (Figura 8).

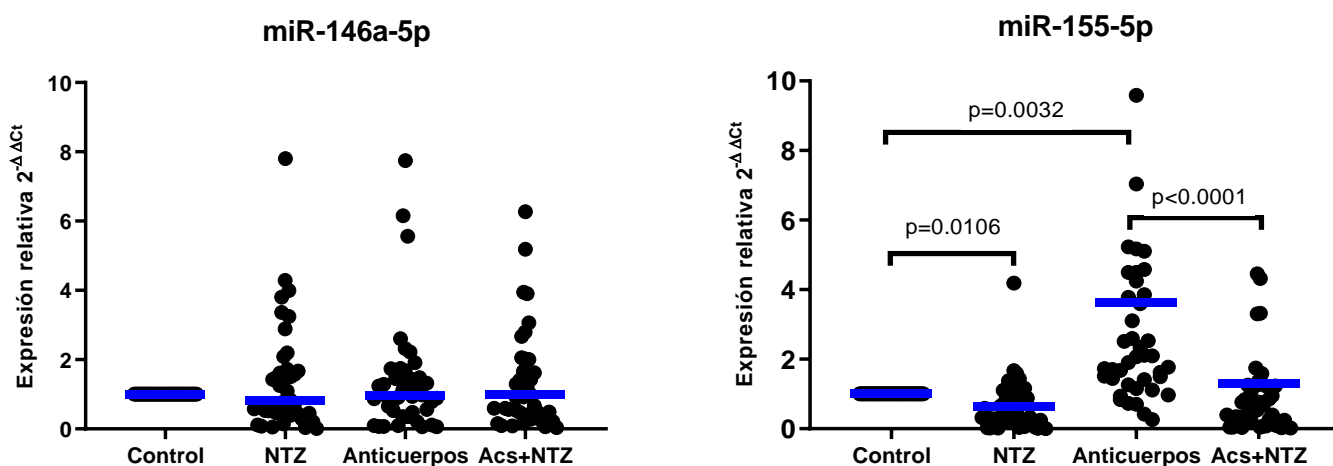


Figura 8. NTZ regula la expresión de miR-155-5p sin causar cambios en la expresión de miR-146a-5p en CMN. Se extrajo el ARN total de CMN en células de cultivo mediante el método Qiazol, los miRNAs se determinaron usando RT-qPCR de dos pasos con RT-ensayo específico de cebadores en combinación con sondas TaqMan. La expresión de miRNA en CMN se realizó mediante RT-qPCR usando U6 como referencia y las concentraciones relativas de miARN se normalizaron con valores de Ct de U6, y los valores se calcularon usando fórmulas $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y $2^{-\Delta Ct}$. Las evaluaciones realizadas fueron: CMN con medio celular RPMI-1640 (Control), CMN tratadas con NTZ 100 μ M (NTZ), CMN estimuladas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (Anticuerpos) y CMN estimuladas con anticuerpos y tratadas con NTZ (Acs + NTZ). El diagrama de puntos dispersos muestra medidas individuales y la barra representa la media. Se muestran la prueba de Friedman para muestras pareadas $p < 0.05$, la DHS post hoc de Tukey y los valores p exactos para pruebas individuales.

Como se muestra en la Figura 9, no se encontraron diferencias significativas entre los niveles relativos de microRNAs, miR-155-5p y miR-146a-5p entre pacientes controlados vs. no

controlados para las diferentes condiciones evaluadas (NTZ, $p = 0.977$; Anticuerpos, $p = 0.283$; Acs + NTZ, $p = 0.479$).

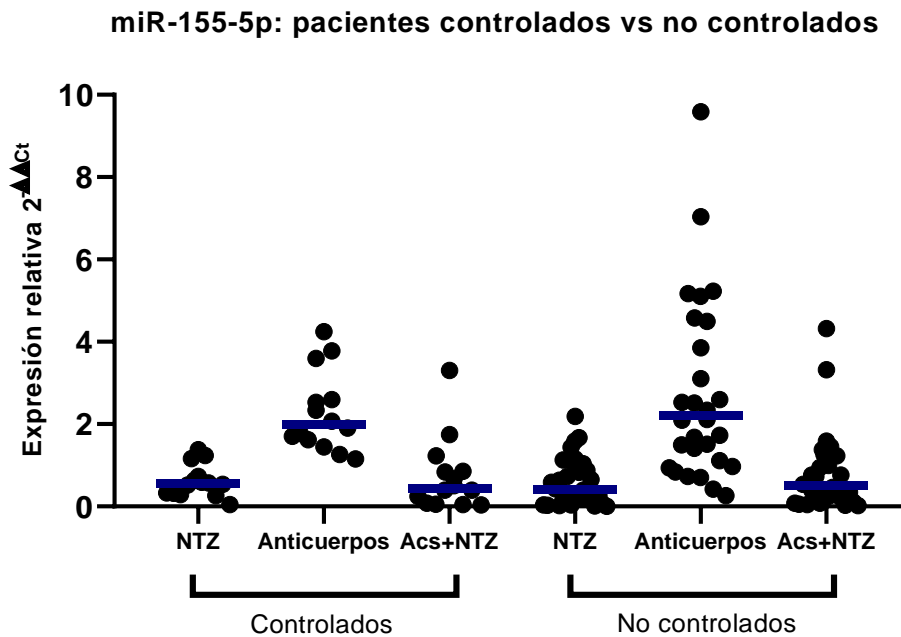


Figura9. Expresión de miR-155-5p en CMN de pacientes controlados vs. no controlados. El análisis de la expresión de miR-155-5p entre pacientes controlados ($HbA1c < 7.0\%$) y no controlados ($HbA1c \geq 7.0\%$) a los 5 días de cultivo celular no mostró diferencias significativas. El diagrama de puntos dispersos muestra medidas individuales y la barra representa la media. prueba de Friedman para muestras pareadas.

NTZ reduce la relación M1 / M2 en CMN estimuladas con anti-CD3 y anti-CD28.

Las CMN tratadas con anticuerpos más NTZ (Abs + NTZ) mostraron menor presencia de monocitos/macrófagos M1 proinflamatorios respecto a las células estimuladas solo con anticuerpos ($p=0.005$), además de un aumento concomitante de los monocitos/macrófagos M2 antiinflamatorios ($p = 0.007$), resultando en una disminución significativa de la relación M1/M2 (Acs vs. Acs + NTZ, $p < 0,001$) (Figura 10).

La estrategia para el análisis de monocitos/macrófagos posterior al cultivo in-vitro por citometría de flujo, se muestra en la Figura 11.

Cuantificación de subpoblaciones M1 y M2 de monocitos/macrófagos

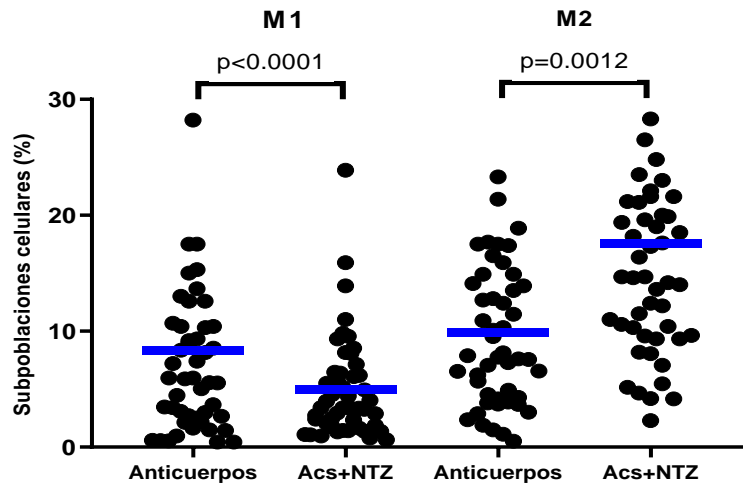


Figura 10. NTZ modifica la relación de monocitos/macrófagos M1 y M2. La cuantificación de macrófagos proinflamatorios M1 (CD14 +, CD16 + y CD163-) y macrófagos antiinflamatorios M2 (CD14 +, CD16 + y CD163 +) se realizó tras 5 días de cultivo celular según el tipo de tratamiento realizado en las CMN: Células estimuladas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 y CMN estimuladas con anticuerpos y tratadas con NTZ. El diagrama de puntos dispersos muestra medidas individuales y la barra representa la media. Prueba de Friedman para muestras pareadas $p < 0.05$, DHS post hoc de Tukey y los valores p exactos para pruebas individuales.

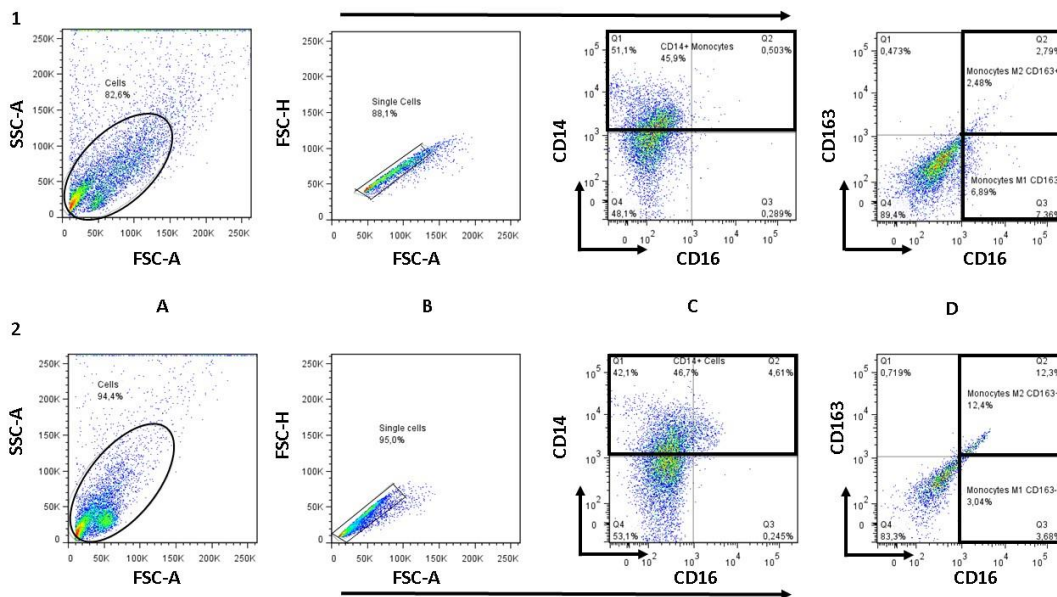


Figura 11. Estrategia para la determinación de monocitos/macrófagos M1 y M2 por citometría de flujo. (A) Gráfica de FSC (A) frente a SSC (A): celdas en la gráfica del área de dispersión frontal/área de dispersión lateral. (B) FSC (A) frente a FSC (H): compuerta de las celdas que tienen un área y una altura iguales: compuerta de exclusión de doblete. (C) Gráfica de CD16 frente a CD14: selección de monocitos en función de sus marcadores: selección de la puerta de subpoblación CD14+ y CD16+. (D) Gráfica de CD16 frente a CD163:

activación para determinar y cuantificar monocitos/macrófagos M1 (CD14+, CD16+, CD163-) y M2 (CD14+, CD16+, CD163+). Para A–D, el color representa la densidad celular: de alta densidad (rojo) a baja densidad (azul). Secuencia anterior: células estimuladas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (Anticuerpos). Secuencia a continuación: células estimuladas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 y tratadas con NTZ 100 µM (Abs + NTZ).

Los resultados de la cuantificación de subpoblaciones celulares de monocitos/macrófagos M1 y M2 posterior al cultivo celular de pacientes controlados vs. no controlados se muestran enTabla 6.

Tabla 6. Subpoblaciones celulares de monocitos/macrófagos M1y M2 posterioral cultivo celular *in vitro*.

	CMN tratadas con NTZ 100µM			CMN estimuladas con anticuerpos anti-CD3 y anti- CD28			CMN estimuladas con anticuerpos y tratadas con NTZ 100µM		
	M1	M2	M1/M2	M1	M2	M1/M2	M1	M2	M1/M2
Paciente Controlado	10.6%	19.10%	0.58:1	11.7%	9.15%	1.7:1	7.58%	20.35%	0.46:1
Paciente No controlado	5.67%	15.30%	0.40:1	6.67%	10.45%	0.64:1	3.86%	16.38%	0.30:1
General	7.26%	16.45%	0.45:1	8.24%	10.05%	0.9:1	4.90%	17.49%	0.34:1

*Porcentaje de presencia de subpoblaciones celulares de monocitos/macrófagos.

El análisis de monocitos/macrófagos estimulados con anticuerpos no reveló diferencias significativas entre pacientes controlados vs. no controlados al comparar la presencia de subpoblaciones M1 proinflamatoria ($p=0.05$) y M2 antiinflamatoria ($p=0.679$) (Figura 12).

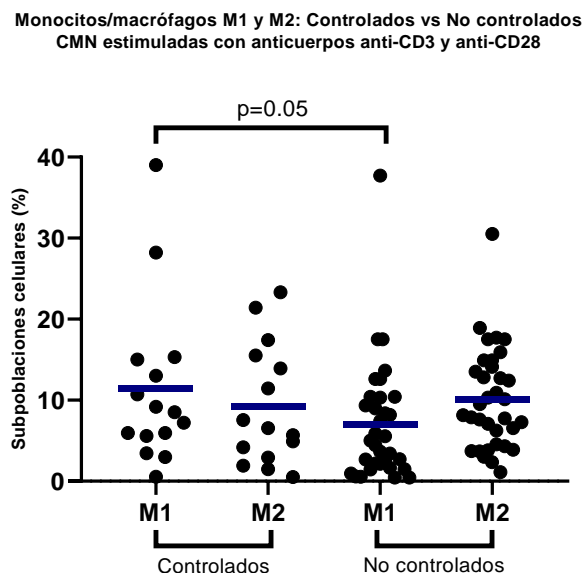


Figura 12. CMN posterior al estímulo con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28: Controlados vs. no controlados. Cuantificación de macrófagos proinflamatorios M1y antiinflamatorios M2 posterior al cultivo celular en la condición de estimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Se evaluaron pacientes controlados (HbA1c <7.0%) y no controlados (HbA1c ≥7.0%)a los 5 días de cultivo celular, a 37°C, 5% de CO₂ y atmosfera húmeda, sin mostrar diferencias significativas. El diagrama de puntos dispersos muestra medidas individuales y la barra representa la media. T de student para muestras independientes. M1, p=0.05; M2, p=0.679.

Respecto al análisis de las CMN estimuladas con anticuerpos y tratadas con NTZ, se reveló diferencia significativa entre los monocitos/macrófagos M1 de pacientes controlados vs no controlados (p=0.010) pero sin mostrar cambios significativos cuando en los M2 (p=0.907).

**Monocitos/macrófagos M1 y M2: Controlados vs No controlados
CMN estimuladas con anticuerpos y tratadas con NTZ**

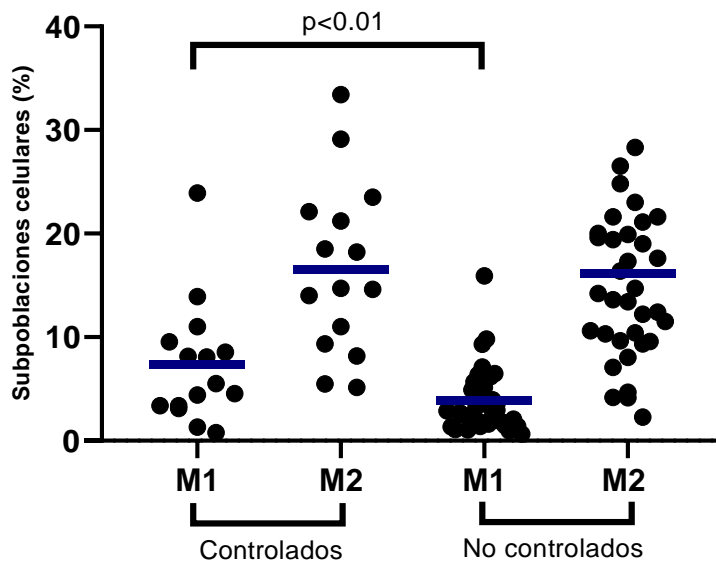


Figura 13. CMN posterior al estímulo con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28: Controlados vs. no controlados. Cuantificación de macrófagos proinflamatorios M1y antiinflamatorios M2 posterior al cultivo celular en la condición de estimulación con anticuerpos anti-CD3, anti-CD28 y tratamiento con NTZ. Se evaluaron pacientes controlados (HbA1c <7.0%) y no controlados (HbA1c ≥7.0%)a los 5 días de cultivo celular sin mostrar diferencias significativas. El diagrama de puntos dispersos muestra medidas individuales y la barra representa la media. T de student para muestras independientes. M1, p=0.010; M2, p=0.907

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El aumento acelerado de DM2, conjuga factores biológicos, como el componente genético-familiar, formas de distribución de la grasa corporal y el proceso de envejecimiento, con los determinantes sociales propios de la industrialización, urbanización y globalización que han propiciado cambios en las formas de vida, en particular en la alimentación y en la actividad física, tanto doméstica, como laboral y recreativa, así como el comportamiento geográfico, la distribución del ingreso y los bienes sociales, entre otros [209].

Actualmente, la inflamación sistémica crónica de bajo grado es reconocida como un factor causante de patogénesis en DM2 [3,4] produciendo anomalías en la respuesta inmunológica [5] al sufrir alteraciones en la activación, proliferación, diferenciación y supervivencia de células T y macrófagos, deterioro funcional de células B y células NK y disminución de quimiotaxis, fagocitosis y opsonización [6]. Se ha demostrado que las células proinflamatorias y sus citocinas desempeñan un papel fundamental en la DM2 [210]. A este respecto, se ha reportado un aumento significativo de células T totales y proinflamatorias circulantes, así como alteraciones en su capacidad proliferativa y secreción de citocinas en comparación con sujetos sanos [211].

En el presente estudio encontramos evidencia para el reposicionamiento de NTZ como un fármaco inmunomodulador. Nuestros principales hallazgos son que la NTZ inhibió la proliferación celular inducida por anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, redujo la concentración de citocinas proinflamatorias en sobrenadantes de cultivos celulares, reguló negativamente la expresión de miR-155-5p sin causar cambios en miR-146a-5p y disminuyó la relación M1/M2 de monocitos/macrófagos (Figura 14).

Es importante mencionar que la selección de sujetos para este estudio incluyó pacientes consecutivos, aleatorizados y dispuestos a participar. Se ha reportado que las mujeres tienen una mayor preocupación por su atención médica, lo que llevó a un uso significativamente mayor de los servicios de salud y visitas a las clínicas y servicios de atención primaria para el diagnóstico en comparación con los hombres [212,213], lo que explicaría por qué hay considerablemente más mujeres que hombres participaron en el estudio.

Aunque el tratamiento con NTZ no indujo efectos citotóxicos sobre las CMN, indujo un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular, relevante para mejorar el estado inflamatorio crónico de bajo grado y prevenir/retrasar el desarrollo de complicaciones. Los ensayos de viabilidad celular y toxicidad celular son herramientas importantes para evaluar las respuestas celulares a compuestos

experimentales de interés [214,215]. Nuestros resultados refuerzan los hallazgos descritos por Giacometti et al., quienes reportaron la ausencia de citotoxicidad al usar diferentes concentraciones (1.6, 6.5 y 26 mmol/L) de NTZ (citotoxicidad de 8.9 a 11.2%) y NTZ junto con antibióticos (citotoxicidad del 6,5 al 8,4%) en cultivos de células A-549[216]. Otro estudio se centró en evaluar la citotoxicidad de NTZ en líneas celulares de glioblastoma humano (LN229, A172 y U87) e informó que las concentraciones de 1 a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dieron como resultado una viabilidad celular superior al 90 % [198]. Además, se ha descrito que la exposición a NTZ (100 μM) en células HepG 2.2.15 cultivadas no indujo citotoxicidad [217], lo que indica que este efecto inmunomodulador de NTZ podría tener relevancia clínica.

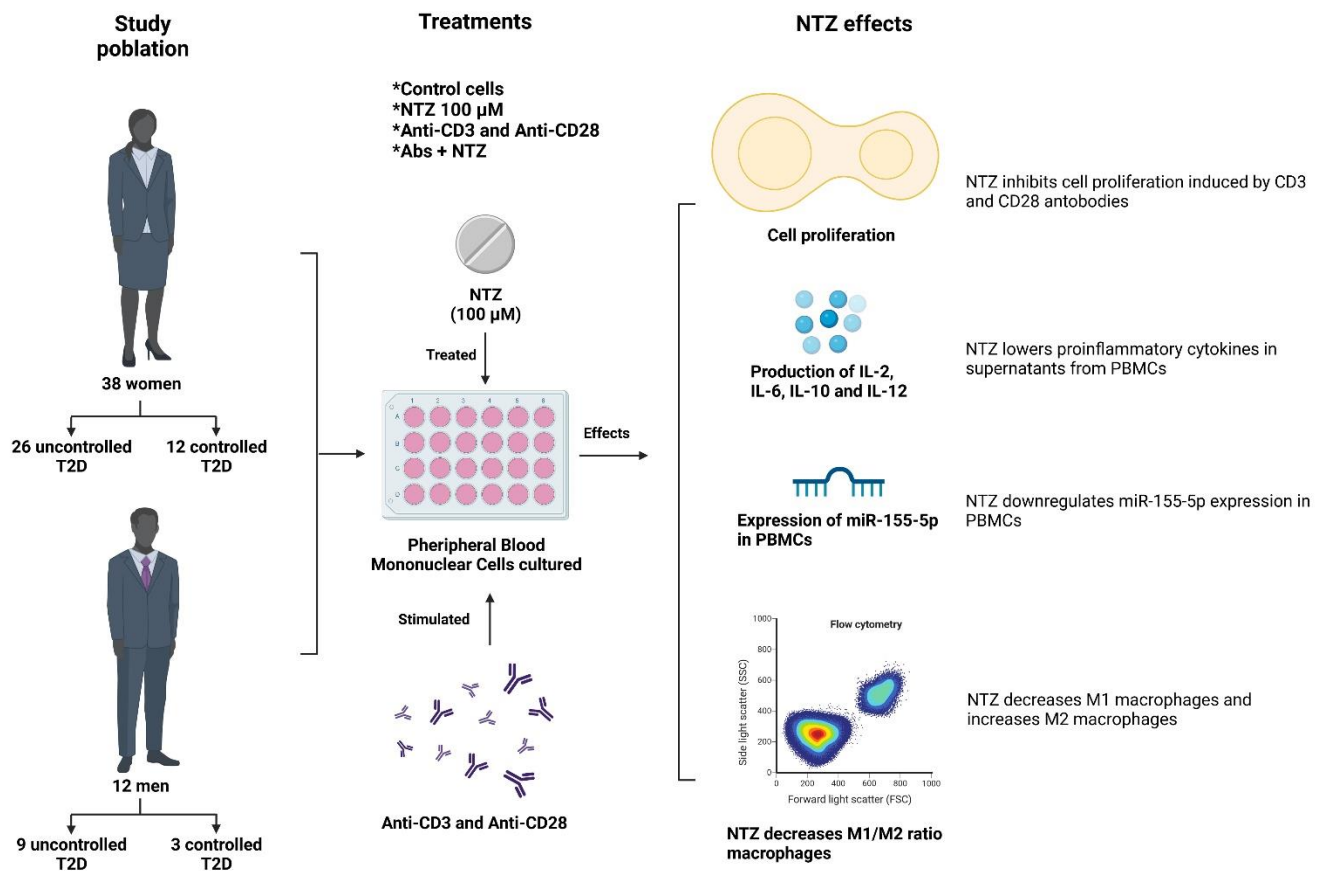


Figura 14. NTZ ejerce efectos inmunomoduladores sobre las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con diabetes tipo 2. Se seleccionaron 50 pacientes consecutivos, aleatorizados y dispuestos a participar con un diagnóstico clínico de DM2 sin complicaciones [38]. Las células sin estimulación de anticuerpos monoclonales y sin tratamiento con NTZ formaron el tratamiento de control; las células tratadas con NTZ 100 μM formaron el tratamiento con NTZ; las células estimuladas con anticuerpos anti-CD3 / anti-CD28 formaron el tratamiento con Anticuerpos, las células estimuladas con anticuerpos anti-CD3 / anti-CD28 tratadas con NTZ 100 μM formaron el tratamiento Abs + NTZ. NTZ ejerce un efecto inhibitor sobre la proliferación

celular de células T estimuladas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 sin modificar la viabilidad celular y disminuciones significativas en las concentraciones sobrenadantes de citocinas IL-2, IL-6, IL-10 e IL-12. Además, NTZ regula negativamente la expresión relativa de miR-155-5p sin cambios en miR-146a-5p. La relación M1 / M2 de monocitos / macrófagos disminuyó el M1 y aumentó la subpoblación M2 en NTZ.

Un mecanismo propuesto para el efecto inmunomodulador de NTZ podría producirse por la inducción en la disminución significativa de los niveles de IL-2 observados con o sin los estímulos de anticuerpos. Esto era de esperar porque la IL-2 es producida por linfocitos T activados y es esencial para el crecimiento, proliferación, diferenciación y supervivencia de las células T. La IL-2 también es crucial para la producción de IL-6, necesaria para el mantenimiento del proceso inflamatorio, induciendo la síntesis de otras citocinas también involucradas en el crecimiento, proliferación y diferenciación de linfocitos T, independientemente de la expresión/secreción del gen IL-2 [218]. Nuestros hallazgos también muestran que NTZ produjo una disminución significativa en el nivel de sobrenadantes de IL-6 de CMN cultivadas, mientras que la concentración de IL-6 se restableció mediante el estímulo con anticuerpos. La IL-6 es una citocina pleiotrópica que se considera un biomarcador de inflamación [219] y una diana terapéutica para el tratamiento de la diabetes tipo 2 [148]; por lo tanto, es posible que la IL-6 pueda actuar de manera similar a la IL-12, determinando la diferenciación de las células T CD4 vírgenes hacia las células efectoras [220]. También se ha demostrado que NTZ limita el aumento de la producción de IL-12 inducida con o sin estimulación con anticuerpos. Se ha informado que la deficiencia de IL-6 conduce al agotamiento de IL-12, lo que resulta en una reducción de la respuesta inflamatoria, necesaria para proporcionar señales de proliferación y supervivencia a las células T CD4+ murinas a través de la vía de señalización de fosfatidilinositol 3-quinasa/Akt [221], lo que podría explicar el efecto de NTZ en ambas citocinas [222]. Además, se requiere IL-1 β como molécula estimulante de células T para su activación e inducción de inflamación, aunque el mecanismo aún no se ha dilucidado [223]. Nuestro estudio encontró que NTZ redujo la secreción de IL-1 β en CMN de cultivo celular.

Con respecto a las citocinas antiinflamatorias, NTZ no modificó los niveles de IL-4, mientras que restableció los niveles basales de IL-10 en las CMN estimuladas con anticuerpos. Por lo tanto, estos hallazgos sugieren que NTZ no estaba involucrada en la polarización de Th2 ya que NTZ no modificó la producción de IL-4 por parte de las CMN expuestas, posiblemente debido a sus efectos inhibitorios sobre la síntesis de IL-6, disminuida por los efectos de la NTZ. Sin embargo, estudios previos habían demostrado que la IL-6 induce una regulación positiva de la IL-4 después de preincubaciones cortas (5 min) de células T estimuladas con anti-CD3/anti-CD28, mientras que con períodos de preincubación más prolongados con IL-6 (12 y 24 h), el efecto sobre la producción de IL-

4 desapareció gradualmente[224]sin inducir alteraciones en los niveles de IL-4, reforzando los resultados obtenidos en este estudio. Sin embargo, para conocer el efecto particular de la NTZ sobre cada una de las principales subpoblaciones de células T, es necesario realizar mayores investigaciones que conlleven a la cuantificación de los factores de transcripción de LT: T-bet, GATA3, RORyt y FOXP3. Cabe resaltar que el efecto de la NTZ sobre las citocinas fue independiente del control o descontrol glucémico del paciente.

Cabe mencionar que los niveles de IL-6 en el sobrenadante de CMN estimuladas con anticuerpos se correlacionaron positivamente con el IMC ($r = 0,363$, $p = 0,001$) y con la relación cintura/cadera ($r = 0,252$, $p = 0,007$). Estos resultados también respaldan la idea de que la secreción de IL-6 en la obesidad es proporcional a la expansión de la masa grasa, particularmente en la región abdominal[225].

Los efectos inmunomoduladores de la NTZ sobre las concentraciones de citocinas son relevantes porque los moduladores de citocinas individuales se usan con frecuencia para enfermedades inflamatorias graves, como tocilizumab (inhibidor de IL-6) en la artritis reumatoide [226], daclizumab (inhibidor de IL-2) en la esclerosis múltiple [227]y anakinra (inhibidor de IL-1) en otras enfermedades autoinmunes [228]. Según nuestros hallazgos, la NTZ podría convertirse en un candidato potencial para el tratamiento antiinflamatorio.

Las células T tienen funciones importantes en una respuesta inmune adquirida y los miRNAs regulan esta respuesta inmunitaria dirigiéndose a los miARN de los genes implicados en el desarrollo, la proliferación, la diferenciación y la función de las células T. Los cambios en la expresión de miARN durante la activación de las células T resaltan que su función puede verse limitada por un marco espaciotemporal específico relacionado con las señales que inducen funciones efectoras basadas en células T[21]. La activación de las células T depende del TCR y de moléculas coestimuladoras (como CD28). Posteriormente, las células T proliferan vigorosamente, dando lugar a la expansión clonal. A este respecto, miR-155-5p y miR-146a-5p están involucrados en la regulación de la proliferación de células T. Los miRNAs responden a señales microambientales dinámicas y regulan múltiples funciones de los subconjuntos de células T y macrófagos, incluido su desarrollo, supervivencia y activación [229]. Ejemplo de ello son las citocinas, que actúan como señales ascendentes claves y funcionales capaces de afectar la expresión de ciertos miRNAs[229]. Como hemos descrito, la hiperglucemia aumenta la producción de citocinas proinflamatorias que actúan a través de NF- κ B, conduciendo a un estado inflamatorio sostenido, alterando la expresión de miRNAs[230]. A su vez, las citocinas actúan como señales ascendentes claves y funcionales que pueden afectar la expresión de

ciertos miRNAs. miR-146a funciona como un regulador antiinflamatorio en varios tipos de células inmunes al reprimir la señalización de NF- κ B y AP1 y participa en la regulación de la respuesta inflamatoria [166] Por otro lado, la expresión de miR-155 ha demostrado ser esencial para el desarrollo y la función de las células T, células B y células mieloides [231,232]. miR-155-5p y miR-146a-5p están regulados transcripcionalmente por NF- κ B[233], mientras controlan y coordinan la inflamación permitiendo una respuesta inflamatoria robusta y definida, formando un circuito regulador que inicia con la inducción en la señalización de NF- κ B (miR-155-5p) y su apagado sincronizado con precisión (miR-146a-5p) [21].

Nuestros hallazgos muestran que la NTZ disminuyó significativamente la expresión de miR-155-5p en CMN cultivadas, mientras que disminuyó en la línea de base, cuyos niveles aumentaron cuando las células se estimularon con anticuerpos, sugiriendo una actividad transcripcional de la NTZ en la respuesta NF- κ B. Es bien sabido que miR-155-5p y miR-146a-5p están regulados transcripcionalmente por NF- κ B y coordinan la inflamación, lo que da como resultado una respuesta inflamatoria definida[21]. También encontramos que el tratamiento con NTZ no modificó la expresión de miR-146a-5p. Recientemente, los estudios informaron una disminución significativa en la expresión de miR-146a-5p, así como un aumento en la expresión de miR-155-5p en el suero sanguíneo de pacientes con DM2[234,235], lo que causa una pérdida en los efectos supresores de la Treg células como consecuencia de la sobreexpresión del transductor de señal y el activador de la transcripción 1(STAT1)[168] sin represión en la expresión de IRAK1 y TRAF6, que son cinasas adaptadoras de vías esenciales como MyD88 [165] para el mantenimiento del proceso inflamatorio. Los resultados obtenidos en este estudio confirman la sobreexpresión de miR-155-5p en DM2 y que la NTZ podría modular los efectos de miR-155-5p en CMN al reprimir SHIP1 o SOCS1, atenuando la actividad de NF- κ B y evitando un estado proliferativo, siendo ambos cruciales en el desarrollo de la respuesta inmune[180] y en la síntesis de moléculas efectoras inmunes, por ejemplo, las citocinas. Sin embargo, los objetivos moleculares de la NTZ relacionados con la expresión de miR-155-5p aún no se han dilucidado. El control o descontrol glucémico de los pacientes demostró no influir sobre la expresión de estos miRNAs.

La expresión de miR-155-5p en CMN estimuladas con anticuerpos y tratadas con NTZ (Acs + NTZ) mostró una correlación positiva con IL-1 β ($r = 0,227$, $p = 0,034$). La expresión de miR-155-5p puede ser inducida por IL-1 β [236]; se ha propuesto que el inflamasoma NLRP3 es el iniciador que provoca la transcripción de IL-1 y la señalización autocrina que impulsa la expresión de miR-155-5p a través de un mecanismo de señalización de IL-1. miR-155-5p se sinergiza con el inflamasoma para inducir una señal de alimentación positiva que promueve aún más la liberación de IL-1, por lo tanto, la

inhibición del receptor de IL-1 con su antagonista cancela la expresión de miR-155-5p [237]. Esta correlación positiva ya se ha informado previamente en CMN como consecuencia de la eliminación de SOCS1 [238].

Varios estudios han proporcionado pruebas convincentes de que los miRNAs desempeñan un papel fundamental en la modulación de la activación de los macrófagos, la polarización, la infiltración de tejidos y la resolución de la inflamación y forman una red compleja que ejerce una regulación generalizada de las vías inflamatorias al dirigirse a múltiples componentes de la vía de señalización de TLR y, por lo tanto, afecta el perfil de citocinas inflamatorias [239]. Los estudios mencionados anteriormente han demostrado que un aumento en la expresión de miR-155-5p promovió la polarización hacia los macrófagos M1, mientras que miR-146a-5p indujo la polarización hacia los macrófagos M2 en modelos murinos y humanos al dirigirse a varios factores de transcripción y proteínas adaptadoras involucradas en las rutas IRF/STAT [240].

Los fenotipos M1 y M2 desempeñan funciones distintivas en el crecimiento celular y la progresión de enfermedades relacionadas con la inflamación. Esto es importante porque los tratamientos que actúan sobre los miRNAs y que modulan la polarización de los macrófagos pueden tener potencial terapéutico en el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Para la determinación de las subpoblaciones de monocitos/macrófagos M1 y M2, se puede utilizar CD163 como marcador diferencial, que se expresa en la superficie celular de los monocitos/macrófagos activados, ejerciendo funciones antiinflamatorias como la producción de IL-10[93,241], y se escinde de su superficie en respuesta a estímulos inflamatorios (macrófagos M1) [242], lo que sugiere que podría usarse como biomarcador de metainflamación [240].

Curiosamente, la NTZ ejerce efectos inmunomoduladores al disminuir significativamente la subpoblación proinflamatoria M1 y aumentar significativamente la subpoblación antiinflamatoria M2 de monocitos/macrófagos, como lo observado en nuestro estudio, lo que influye, de manera importante, en el equilibrio de la relación M1/M2 a favor de limitar el proceso inflamatorio desarrollado en la DM2. En relación con este resultado, los monocitos de sangre periférica de pacientes obesos con DM2, como se informó anteriormente, fueron menos susceptibles de diferenciarse en un fenotipo alternativo, lo que contribuyó a una condición inflamatoria desregulada y persistente[243]. Los resultados obtenidos en este estudio confirman y respaldan la sobreexpresión de miR-155-5p en DM2, además del efecto epistático que ejerce mir-155-5p sobre miR-146a-5p en la regulación de la respuesta inmunológica [170], anulando la represión de la activación de NF- κ B mediada por miR-146a, enfatizando la función dominante de miR-155-5p en la promoción de la inflamación posiblemente

explicando el motivo por el que no existe un incremento de miR-146a-5p en aquellas células estimuladas con anticuerpos en comparación con las células control, tal como se ha descrito en estudios con ratones[244]. Además, nuestro estudio reveló que la NTZ podría regular la diferenciación y la actividad de los macrófagos M1 y M2. Lo anterior es importante porque el desarrollo de los macrófagos M2 depende del factor de transcripción STAT-6, favoreciendo la tolerancia a la glucosa y reduciendo la metainflamación[245], pudiendo ser un objetivo terapéutico de la NTZ, por lo que se necesitan más estudios relacionados.

El análisis de monocitos/macrófagos entre pacientes controlados y no controlados reveló que la NTZ disminuye significativa y mayormente la subpoblación M1 en pacientes sin control glucémico que en aquellos controlados. Por otro lado, nuestros resultados mostraron una correlación positiva entre monocitos/macrófagos M1 e IL-12 ($r = 0.543$, $p = 0.001$) después de la estimulación con anticuerpos. Esta correlación apoya nuestros resultados debido a que la señalización y producción de IL-12 son propiedades proinflamatorias definitorias de los macrófagos M1[246]. Estudios previos han revelado que la sobreexpresión de IL-12 podría revertir el fenotipo y la función de los macrófagos M2 en macrófagos similares a M1 y propiciar la diferenciación de linfocitos Th1 y bloquear su fenotipo hacia Th2 [247].

Se ha propuesto que la NTZ es un agonista de los receptores PPAR- γ , con efectos postranscripcionales capaces de mejorar el perfil glucémico en la diabetes tipo 2 [29]. Previamente, Diana Kovács y cols. (2013) utilizaron el método de coincidencia de perfil de fármacos unidimensional (oDPM) para encontrar posibles agonistas de PPAR γ [192]. Vale la pena mencionar que también es posible que mecanismos independientes adicionales de PPAR permitan que la NTZ ejerza sus efectos inmunomoduladores. La farmacocinética de la NTZ revela que su metabolito podría alcanzar una C_{max} de 1,9 mg/L (7,1 mM)[27,248]; por lo tanto, la concentración de 0,1 mM utilizada en nuestro experimento podría ser fácilmente alcanzable en la sangre después de la administración del fármaco, resultado que es relevante para la evaluación de su efecto como agente inmunomodulador en modelos *in vivo*.

CONCLUSIONES

Nuestros hallazgos revelan un efecto inmunomodulador y antiinflamatorio potencial de la NTZ al inhibir la proliferación celular, reducir significativamente los niveles de citocinas proinflamatorias de sobrenadantes de cultivo celular *in-vitro*, disminuir la expresión de miR-155-5p sin causar cambios en miR-146a-5p y regular el equilibrio de monocitos/macrófagos M1/M2. Estos hallazgos, junto con el amplio historial de seguridad del fármaco, sugieren beneficios terapéuticos alternativos que podrían mejorar el estado de la enfermedad y contribuir al futuro reposicionamiento de la NTZ dada la importancia de la necesidad de un fármaco inmunorregulador y adyuvante en el tratamiento de la DM2 y otras enfermedades inflamatorias.

PERSPECTIVAS

- Evaluación del efecto de NTZ sobre los principales blancos moleculares de miR-155-5p y miR-146a: Ship1, Socs1, Irak1, Traf6, Ets1, Bach6 y Pu.1.
- Determinar el alcance del efecto de NTZ en experimentos in-vitro, mediante el uso del pri-miR-155 y antago-miR-155.
- Determinar el efecto de NTZ sobre los niveles de expresión de los factores de transcripción Tbet, GATA-3, ROR γ t y FOXP3 de linfocitos T posterior a un estímulo con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 y cuantificar dichas subpoblaciones.
- Evaluar el efecto de NTZ en cultivo de monocitos con un microambiente hiperglucémico estimulados con GM-CSF, LPS e IL-4.
- Evaluar la trazabilidad del efecto de NTZ sobre las principales citocinas proinflamatorias: RNAm, citocina intracelular y citocina en sobrenadante de cultivo celular
- Evaluar el efecto de NTZ sobre la expresión de PPAR en una línea celular Mono Mac 6.
- Evaluar el efecto de NTZ sobre los principales marcadores y subpoblaciones inflamatorias en un modelo in-vivo de diabetes no insulino dependiente, junto con la medición de parámetros bioquímico-clínicos de relevancia en esta enfermedad.

BIBLIOGRAFÍAS

1. Zhang, C.; Xiao, C.; Wang, P.; Xu, W.; Zhang, A.; Li, Q.; Xu, X. The alteration of Th1/Th2/Th17/Treg paradigm in patients with type 2 diabetes mellitus: Relationship with diabetic nephropathy. *Hum. Immunol.***2014**, *75*, 289–296, doi:10.1016/J.HUMIMM.2014.02.007.
2. International Diabetes Federation *IDF Diabetes Atlas, 9th edn. Brussels, Belgium*; 2019; ISBN 9782930229874.
3. Caballero, A.E. Endothelial dysfunction, inflammation, and insulin resistance: A focus on subjects at risk for type 2 diabetes. *Curr. Diab. Rep.* 2004, *4*, 237–246.
4. Pickup, J.C. Inflammation and Activated Innate Immunity in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2004, *27*, 813–823.
5. Kintscher, U.; Hartge, M.; Hess, K.; Foryst-Ludwig, A.; Clemenz, M.; Wabitsch, M.; Fischer-Posovszky, P.; Barth, T.F.E.; Dragun, D.; Skurk, T.; et al. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: A primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.***2008**, *28*, 1304–1310, doi:10.1161/ATVBAHA.108.165100.
6. Berbudi, A.; Rahmadika, N.; Tjahjadi, A.I.; Ruslami, R. Type 2 Diabetes and its Impact on the Immune System. *Curr. Diabetes Rev.***2019**, *16*, 442–449, doi:10.2174/1573399815666191024085838.
7. Xia, C.; Rao, X.; Zhong, J. Role of T Lymphocytes in Type 2 Diabetes and Diabetes-Associated Inflammation. *J. Diabetes Res.***2017**, *2017*, doi:10.1155/2017/6494795.
8. Francisco, C.O.; Catai, A.M.; Moura-Tonello, S.C.G.; Arruda, L.C.M.; Lopes, S.L.B.; Benze, B.G.; Del Vale, A.M.; Malmegrim, K.C.R.; Leal, A.M.O. Cytokine profile and lymphocyte subsets in type 2 diabetes. *Brazilian J. Med. Biol. Res.***2016**, *49*, doi:10.1590/1414-431X20155062.
9. Nyambuya, T.M.; Dlodla, P. V.; Nkambule, B.B. T cell activation and cardiovascular risk in type 2 diabetes mellitus: A protocol for a systematic review and meta-analysis. *Syst. Rev.* 2018, *7*, 167.
10. Dandona, P.; Aljada, A.; Bandyopadhyay, A. Inflammation: The link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol.* 2004, *25*, 4–7.
11. Baltimore, D.; Boldin, M.P.; O'Connell, R.M.; Rao, D.S.; Taganov, K.D. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat. Immunol.***2008**, *9*, 839–845, doi:10.1038/NI.F.209.
12. Lumeng, C.N.; Bodzin, J.L.; Saltiel, A.R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.***2007**, *117*, 175–184, doi:10.1172/JCI29881.
13. Makki, K.; Froguel, P.; Wolowczuk, I. Adipose Tissue in Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance: Cells, Cytokines, and Chemokines. *ISRN Inflamm.***2013**, *2013*, 1–12, doi:10.1155/2013/139239.
14. Chawla, A.; Nguyen, K.D.; Goh, Y.P.S. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2011, *11*, 738–749.
15. Donath, M.Y.; Shoelson, S.E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.***2011**, *11*, 98–107, doi:10.1038/NRI2925.
16. Caspar-Bauguil, S.; Cousin, B.; Galinier, A.; Segafredo, C.; Nibbelink, M.; André, M.; Casteilla, L.; Pénicaud, L. Adipose tissues as an ancestral immune organ: Site-specific change in obesity. *FEBS Lett.***2005**, *579*, 3487–3492, doi:10.1016/j.febslet.2005.05.031.
17. Ouchi, N.; Parker, J.L.; Lugus, J.J.; Walsh, K. Adipokines in inflammation and metabolic

- disease. *Nat. Rev. Immunol.***2011**, *11*, 85–97, doi:10.1038/NRI2921.
18. Kloosterman, W.P.; Plasterk, R.H.A. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev. Cell***2006**, *11*, 441–450, doi:10.1016/J.DEVCEL.2006.09.009.
 19. Raisch, J.; Darfeuille-Michaud, A.; Nguyen, H.T.T. Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer. *World J. Gastroenterol.* 2013, *19*, 2985–2996.
 20. Mehta, A.; Baltimore, D. MicroRNAs as regulatory elements in immune system logic. *Nat. Rev. Immunol.* 2016, *16*, 279–294.
 21. Mann, M.; Mehta, A.; Zhao, J.L.; Lee, K.; Marinov, G.K.; Garcia-Flores, Y.; Baltimore, D. An NF- κ B-microRNA regulatory network tunes macrophage inflammatory responses. *Nat. Commun.***2017**, *8*, doi:10.1038/s41467-017-00972-z.
 22. Testa, U.; Pelosi, E.; Castelli, G.; Labbaye, C. miR-146 and miR-155: Two Key Modulators of Immune Response and Tumor Development. *Non-Coding RNA***2017**, *3*, doi:10.3390/NCRNA3030022.
 23. Pushpakom, S.; Iorio, F.; Eyers, P.A.; Escott, K.J.; Hopper, S.; Wells, A.; Doig, A.; Guilliams, T.; Latimer, J.; McNamee, C.; et al. Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2018, *18*, 41–58.
 24. Hemphill, A.; Mueller, J.; Esposino, M. Nitazoxanide, a broad-spectrum thiazolide anti-infective agent for the treatment of gastrointestinal infections. *Expert Opin. Pharmacother.* 2006, *7*, 953–964.
 25. Singh, N.; Narayan, S. Nitazoxanide: A broad spectrum antimicrobial. *Med. J. Armed Forces India***2011**, *67*, 67–68, doi:10.1016/S0377-1237(11)80020-1.
 26. Rossignol, J.F. Nitazoxanide: A first-in-class broad-spectrum antiviral agent. *Antiviral Res.* 2014, *110*, 94–103.
 27. Shou, J.; Wang, M.; Cheng, X.; Wang, X.; Zhang, L.; Liu, Y.; Fei, C.; Wang, C.; Gu, F.; Xue, F.; et al. Nitazoxanide induces autophagy by inhibiting PI3K/Akt/mTOR pathway in RAW264.7 macrophage cells. *Arch. Pharm. Res.***2020**, *43*, 257–270, doi:10.1007/S12272-019-01202-4.
 28. Hong, S.K.; Kim, H.J.; Song, C.S.; Choi, I.S.; Lee, J.B.; Park, S.Y. Nitazoxanide suppresses IL-6 production in LPS-stimulated mouse macrophages and TG-injected mice. *Int. Immunopharmacol.***2012**, *13*, 23–27, doi:10.1016/j.intimp.2012.03.002.
 29. Elaidy, S.M.; Hussain, M.A.; El-Kherbetawy, M.K. Time-dependent therapeutic roles of nitazoxanide on high-fat diet/streptozotocin-induced diabetes in rats: Effects on hepatic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma receptors. *Can. J. Physiol. Pharmacol.***2018**, *96*, 485–497, doi:10.1139/cjpp-2017-0533.
 30. Mahmoud, D.B.; Shitu, Z.; Mostafa, A. Drug repurposing of nitazoxanide: can it be an effective therapy for COVID-19? *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 2020, *18*.
 31. History of diabetes mellitus - PubMed Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11953758/> (accessed on Feb 13, 2022).
 32. Conget, D.I. Diagnóstico, clasificación y patogenia de la diabetes mellitus. *Rev. Española Cardiol.***2002**, *55*, 528–535, doi:10.1016/S0300-8932(02)76646-3.
 33. Kaul, K.; Tarr, J.M.; Ahmad, S.; Kohner, E.M.; Chibber, R. Diabetes. *Diabetes An Old Dis. a New Insight***2013**, *771*, 1–11.
 34. de Koning, E.J.P.; Bonner-Weir, S.; Rabelink, T.J. Preservation of beta-cell function by targeting beta-cell mass. *Trends Pharmacol. Sci.***2008**, *29*, 218–227, doi:10.1016/J.TIPS.2008.02.001.
 35. Association, A.D. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in

- Diabetes—2021. *Diabetes Care***2021**, *44*, S15–S33, doi:10.2337/DC21-S002.
36. Introduction: Standards of medical care in diabetesd2021. *Diabetes Care* 2021, *44*, S1–S2.
 37. American Diabetes Association Improving care and promoting health in populations: Standards of medical care in diabetes–2021. *Diabetes Care***2021**, *44*, S7–S14, doi:10.2337/dc21-s001.
 38. INSP Encuesta Nacional de Salud y Nutrición - MC Available online: <https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2016/index.php> (accessed on Jan 18, 2021).
 39. Barquera, S.; Campos-Nonato, I.; Aguilar-Salinas, C.; Lopez-Ridaura, R.; Arredondo, A.; Rivera-Dommarco, J. Diabetes in Mexico: Cost and management of diabetes and its complications and challenges for health policy. *Global. Health***2013**, *9*, 1–9, doi:10.1186/1744-8603-9-3/TABLES/6.
 40. Regina, C.C.; Mu'ti, A.; Fitriany, E. Diabetes Mellitus Type 2. *Verdure Heal. Sci. J.***2021**, *3*, 8–17.
 41. Galicia-Garcia, U.; Benito-Vicente, A.; Jebari, S.; Larrea-Sebal, A.; Siddiqi, H.; Uribe, K.B.; Ostolaza, H.; Martín, C. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int. J. Mol. Sci.***2020**, *21*, 1–34, doi:10.3390/IJMS21176275.
 42. Salim, B. Diabetes mellitus and its treatment. **2005**, 111–134.
 43. DeFronzo, R.A.; Ferrannini, E.; Groop, L.; Henry, R.R.; Herman, W.H.; Holst, J.J.; Hu, F.B.; Kahn, C.R.; Raz, I.; Shulman, G.I.; et al. Type 2 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2015**, *1*, 1–22, doi:10.1038/nrdp.2015.19.
 44. Goldfine, A.B.; Fonseca, V.; Shoelson, S.E. Therapeutic approaches to target inflammation in type 2 diabetes. *Clin. Chem.***2011**, *57*, 162–167, doi:10.1373/CLINCHEM.2010.148833.
 45. Robertson, R.P.; Harmon, J.; Tran, P.O.T.; Poitout, V. Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes***2004**, *53 Suppl 1*, doi:10.2337/DIABETES.53.2007.S119.
 46. Prentki, M.; Nolan, C.J. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.***2006**, *116*, 1802–1812, doi:10.1172/JCI29103.
 47. Kalupahana, N.S.; Moustaid-Moussa, N.; Claycombe, K.J. Immunity as a link between obesity and insulin resistance. *Mol. Aspects Med.***2012**, *33*, 26–34, doi:10.1016/J.MAM.2011.10.011.
 48. DeFronzo, R.A. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med. Clin. North Am.* **2004**, *88*, 787–835.
 49. Poitout, V.; Robertson, R.P. Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr. Rev.***2008**, *29*, 351–366, doi:10.1210/ER.2007-0023.
 50. Poitout, V.; Robertson, R.P. Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology***2002**, *143*, 339–342, doi:10.1210/ENDO.143.2.8623.
 51. Wajchenberg, B.L. beta-cell failure in diabetes and preservation by clinical treatment. *Endocr. Rev.***2007**, *28*, 187–218, doi:10.1210/10.1210/ER.2006-0038.
 52. Van Raalte, D.H.; Diamant, M. Glucolipotoxicity and beta cells in type 2 diabetes mellitus: target for durable therapy? *Diabetes Res. Clin. Pract.***2011**, *93 Suppl 1*, doi:10.1016/S0168-8227(11)70012-2.
 53. Cnop, M.; Igoillo-Esteve, M.; Cunha, D.A.; Ladrière, L.; Eizirik, D.L. An update on lipotoxic endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells. *Biochem. Soc. Trans.***2008**, *36*, 909–915, doi:10.1042/BST0360909.

54. Lambert, A.J.; Brand, M.D. Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J. Biol. Chem.***2004**, *279*, 39414–39420, doi:10.1074/JBC.M406576200.
55. Akash, M.S.H.; Rehman, K.; Chen, S. Role of inflammatory mechanisms in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J. Cell. Biochem.***2013**, *114*, 525–531, doi:10.1002/JCB.24402.
56. Hotamisligil, G.S.; Erbay, E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat. Rev. Immunol.***2008**, *8*, 923–934, doi:10.1038/NRI2449.
57. Ehses, J.A.; Ellingsgaard, H.; Böni-Schnetzler, M.; Donath, M.Y. Pancreatic islet inflammation in type 2 diabetes: from alpha and beta cell compensation to dysfunction. *Arch. Physiol. Biochem.***2009**, *115*, 240–247, doi:10.1080/13813450903025879.
58. LÓPEZ CORONA, A. Diabetes mellitus. Control de la glucemia. *Farm. Prof.***2002**, *16*, 42–47.
59. Group, T.D.C. and C.T.R. The Effect of Intensive Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199309303291401>**2010**, *329*, 977–986, doi:10.1056/NEJM199309303291401.
60. Effect of intensive diabetes management on macrovascular events and risk factors in the diabetes control and complications trial. *Am. J. Cardiol.***1995**, *75*, 894–903, doi:10.1016/S0002-9149(99)80683-3.
61. DOF - Diario Oficial de la Federación Available online: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5168074&fecha=23/11/2010 (accessed on Feb 10, 2022).
62. Cepeda Marte, J.L.; Ruiz-Matuk, C.; Mota, M.; Pérez, S.; Recio, N.; Hernández, D.; Fernández, J.; Porto, J.; Ramos, A. Quality of life and metabolic control in type 2 diabetes mellitus diagnosed individuals. *Diabetes Metab. Syndr.***2019**, *13*, 2827–2832, doi:10.1016/J.DSX.2019.07.062.
63. Eckstein, M.L.; Williams, D.M.; O'Neil, L.K.; Hayes, J.; Stephens, J.W.; Bracken, R.M. Physical exercise and non-insulin glucose-lowering therapies in the management of Type 2 diabetes mellitus: a clinical review. *Diabet. Med.***2019**, *36*, 349–358, doi:10.1111/DME.13865.
64. Rydén, L.; Members, A.F.; Standl, E.; Members, A.F.; Bartnik, M.; Members, A.F.; Van den Berghe, G.; Members, A.F.; Betteridge, J.; Members, A.F.; et al. Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases: executive summary The Task Force on Diabetes and Cardiovascular Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur. Heart J.***2007**, *28*, 88–136, doi:10.1093/EURHEARTJ/EHL260.
65. Massey, C.N.; Feig, E.H.; Duque-Serrano, L.; Wexler, D.; Moskowitz, J.T.; Huffman, J.C. Well-being interventions for individuals with diabetes: A systematic review. *Diabetes Res. Clin. Pract.***2019**, *147*, 118–133, doi:10.1016/J.DIABRES.2018.11.014.
66. Krentz, A.J.; Patel, M.B.; Bailey, C.J. New Drugs for Type 2 Diabetes Mellitus. *Drugs* **2008**, *68*, 2131–2162, doi:10.2165/00003495-200868150-00005.
67. Dey, L.; Attele, A.S.; Yuan, C.-S. Type 2 Diabetes Alternative Therapies for Type 2 Diabetes. *Altern. Med. Rev.* **2002**, *7*.
68. Goldberg, R.B. Cytokine and Cytokine-Like Inflammation Markers, Endothelial Dysfunction, and Imbalanced Coagulation in Development of Diabetes and Its Complications. *J. Clin. Endocrinol. Metab.***2009**, *94*, 3171–3182, doi:10.1210/JC.2008-2534.
69. Richardson, V.R.; Smith, K.A.; Carter, A.M. Adipose tissue inflammation: Feeding the

development of type 2 diabetes mellitus. *Immunobiology***2013**, *218*, 1497–1504, doi:10.1016/J.IMBIO.2013.05.002.

70. Lee, C.H.; Lam, K.S.L. Obesity-induced insulin resistance and macrophage infiltration of the adipose tissue: A vicious cycle. *J. Diabetes Investig.***2019**, *10*, 29–31, doi:10.1111/JDI.12918.
71. Hotamisligil, G.S.; Shargill, N.S.; Spiegelman, B.M. Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor- α : Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance. *Science (80-)*.**1993**, *259*, 87–91, doi:10.1126/SCIENCE.7678183.
72. Ouchi, N.; Parker, J.L.; Lugus, J.J.; Walsh, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* *2011* **11**, 85–97, doi:10.1038/nri2921.
73. Ricardo-Gonzalez, R.R.; Eagle, A.R.; Odegaard, J.I.; Jouihan, H.; Morel, C.R.; Heredia, J.E.; Mukundan, L.; Wu, D.; Locksley, R.M.; Chawla, A. IL-4/STAT6 immune axis regulates peripheral nutrient metabolism and insulin sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***2010**, *107*, 22617–22622, doi:10.1073/pnas.1009152108.
74. Donath, M.Y.; Shoelson, S.E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* *2011* **11**, 98–107, doi:10.1038/nri2925.
75. Murano, I.; Barbatelli, G.; Parisani, V.; Latini, C.; Muzzonigro, G.; Castellucci, M.; Cinti, S. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *J. Lipid Res.***2008**, *49*, 1562–1568, doi:10.1194/JLR.M800019-JLR200.
76. Shirakawa, K.; Yan, X.; Shinmura, K.; Endo, J.; Kataoka, M.; Katsumata, Y.; Yamamoto, T.; Anzai, A.; Isobe, S.; Yoshida, N.; et al. Obesity accelerates T cell senescence in murine visceral adipose tissue. *J. Clin. Invest.***2016**, *126*, 4626–4639, doi:10.1172/JCI88606.
77. Stentz, F.; targets, A.K.-C. drug; 2003, undefined Activated T lymphocytes in type 2 diabetes: implications from in vitro studies. *ingentaconnect.com*.
78. Weisberg, S.P.; McCann, D.; Desai, M.; Rosenbaum, M.; Leibel, R.L.; Ferrante, A.W. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.***2003**, *112*, 1796–1808, doi:10.1172/JCI19246.
79. Canè, S.; Ugel, S.; Trovato, R.; Marigo, I.; De Sanctis, F.; Sartoris, S.; Bronte, V. The endless saga of monocyte diversity. *Front. Immunol.***2019**, *10*, 1786, doi:10.3389/FIMMU.2019.01786/BIBTEX.
80. Ziegler-Heitbrock, L.; Ancuta, P.; Crowe, S.; Dalod, M.; Grau, V.; Hart, D.N.; Leenen, P.J.M.; Liu, Y.J.; MacPherson, G.; Randolph, G.J.; et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood***2010**, *116*, e74–e80, doi:10.1182/BLOOD-2010-02-258558.
81. Okabe, Y.; Medzhitov, R. Tissue-Specific Signals Control Reversible Program of Localization and Functional Polarization of Macrophages. *Cell***2014**, *157*, 832–844, doi:10.1016/J.CELL.2014.04.016.
82. Murray, P.J.; Allen, J.E.; Biswas, S.K.; Fisher, E.A.; Gilroy, D.W.; Goerdt, S.; Gordon, S.; Hamilton, J.A.; Ivashkiv, L.B.; Lawrence, T.; et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity***2014**, *41*, 14–20, doi:10.1016/J.IMMUNI.2014.06.008.
83. Martinez, F.O.; Helming, L.; Gordon, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol.***2009**, *27*, 451–483, doi:10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.021908.132532.
84. Mantovani, A.; Sica, A.; Sozzani, S.; Allavena, P.; Vecchi, A.; Locati, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.***2004**, *25*, 677–686, doi:10.1016/J.IT.2004.09.015.

85. Shapouri-Moghaddam, A.; Mohammadian, S.; Vazini, H.; Taghadosi, M.; Esmaeili, S.A.; Mardani, F.; Seifi, B.; Mohammadi, A.; Afshari, J.T.; Sahebkar, A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.***2018**, *233*, 6425–6440, doi:10.1002/JCP.26429.
86. Donath, M.Y.; Shoelson, S.E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2011, *11*, 98–107.
87. Murdoch, C.; Muthana, M.; Coffelt, S.B.; Lewis, C.E. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer***2008**, *8*, 618–631, doi:10.1038/NRC2444.
88. Fadini, G.P.; De Kreutzenberg, S.V.; Boscaro, E.; Albiero, M.; Cappellari, R.; Kränkel, N.; Landmesser, U.; Toniolo, A.; Bolego, C.; Cignarella, A.; et al. An unbalanced monocyte polarisation in peripheral blood and bone marrow of patients with type 2 diabetes has an impact on microangiopathy. *Diabetologia***2013**, *56*, 1856–1866, doi:10.1007/S00125-013-2918-9.
89. Tiemessen, M.M.; Jagger, A.L.; Evans, H.G.; Van Herwijnen, M.J.C.; John, S.; Taams, L.S. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.***2007**, *104*, 19446–19451, doi:10.1073/PNAS.0706832104.
90. Febbraio, M.A.; Bente, A.; Pedersen, K. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB J.***2002**, *16*, 1335–1347, doi:10.1096/FJ.01-0876REV.
91. Lowe, G.; Woodward, M.; Hillis, G.; Rumley, A.; Li, Q.; Harrap, S.; Marre, M.; Hamet, P.; Patel, A.; Poulter, N.; et al. Circulating Inflammatory Markers and the Risk of Vascular Complications and Mortality in People With Type 2 Diabetes and Cardiovascular Disease or Risk Factors: The ADVANCE Study. *Diabetes***2014**, *63*, 1115–1123, doi:10.2337/DB12-1625.
92. Kawarabayashi, R.; Motoyama, K.; Nakamura, M.; Yamazaki, Y.; Morioka, T.; Mori, K.; Fukumoto, S.; Imanishi, Y.; Shioi, A.; Shoji, T.; et al. The Association between Monocyte Surface CD163 and Insulin Resistance in Patients with Type 2 Diabetes. *J. Diabetes Res.***2017**, *2017*, doi:10.1155/2017/6549242.
93. Buechler, C.; Ritter, M.; Orsó, E.; Langmann, T.; Klucken, J.; Schmitz, G. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J. Leukoc. Biol.***2000**, *67*, 97–103, doi:10.1002/jlb.67.1.97.
94. Inácio, D.P.; Amado, T.; Silva-Santos, B.; Gomes, A.Q. Control of T cell effector functions by miRNAs. *Cancer Lett.***2018**, *427*, 63–73, doi:10.1016/J.CANLET.2018.04.011.
95. Deng, T.; Lyon, C.J.; Minze, L.J.; Lin, J.; Zou, J.; Liu, J.Z.; Ren, Y.; Yin, Z.; Hamilton, D.J.; Reardon, P.R.; et al. Class II major histocompatibility complex plays an essential role in obesity-induced adipose inflammation. *Cell Metab.***2013**, *17*, 411–422, doi:10.1016/J.CMET.2013.02.009/ATTACHMENT/8D322151-F4F1-4D3C-9F8C-91B905B6D1D1/MMC1.PDF.
96. Raphael, I.; Nalawade, S.; Eagar, T.N.; Forsthuber, T.G. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine***2015**, *74*, 5–17, doi:10.1016/J.CYTO.2014.09.011.
97. Wilson, C.B.; Rowell, E.; Sekimata, M. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* 2009 *9*, 91–105, doi:10.1038/nri2487.
98. Ansel, K.M.; Djuretic, I.; Tanasa, B.; Rao, A. REGULATION OF TH2 DIFFERENTIATION AND IL4 LOCUS ACCESSIBILITY. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115821>**2006**, *24*, 607–656, doi:10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.23.021704.115821.

99. Kahn, S.E.; Hull, R.L.; Utzschneider, K.M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat.* **2006** *444*, 840–846, doi:10.1038/nature05482.
100. Zhu, J.; Yamane, H.; Paul, W.E. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations*. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101212>, **2010**, *28*, 445–489, doi:10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-030409-101212.
101. Martinez, F.O.; Sica, A.; Mantovani, A.; Locati, M. Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.* **2008**, *13*, 453–461, doi:10.2741/2692/PDF.
102. McLaughlin, T.; Liu, L.F.; Lamendola, C.; Shen, L.; Morton, J.; Rivas, H.; Winer, D.; Tolentino, L.; Choi, O.; Zhang, H.; et al. T-cell profile in adipose tissue is associated with insulin resistance and systemic inflammation in humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2014**, *34*, 2632–2636, doi:10.1161/ATVBAHA.114.304636.
103. Harford, K.A.; Reynolds, C.M.; McGillicuddy, F.C.; Roche, H.M. Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue. *Proc. Nutr. Soc.* **2011**, *70*, 408–417, doi:10.1017/S0029665111000565.
104. Nekoua, M.P.; Fachinan, R.; Atchamou, A.K.; Nouatin, O.; Amoussou-Guenou, D.; Amoussou-Guenou, M.K.; Moutairou, K.; Yessoufou, A. Modulation of immune cells and Th1/Th2 cytokines in insulin-treated type 2 diabetes mellitus. *Afr. Health Sci.* **2016**, *16*, 712–724, doi:10.4314/ahs.v16i3.11.
105. Cortez-Espinosa, N.; Cortés-García, J.D.; Martínez-Leija, E.; Rodríguez-Rivera, J.G.; Barajas-López, C.; González-Amaro, R.; Portales-Pérez, D.P. CD39 expression on Treg and Th17 cells is associated with metabolic factors in patients with type 2 diabetes. *Hum. Immunol.* **2015**, *76*, 622–630, doi:10.1016/J.HUMIMM.2015.09.007.
106. Sell, H.; Habich, C.; Eckel, J. Adaptive immunity in obesity and insulin resistance. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2012**, *8*, 709–716, doi:10.1038/nrendo.2012.114.
107. Chehimi, M.; Vidal, H.; Eljaafari, A. Pathogenic Role of IL-17-Producing Immune Cells in Obesity, and Related Inflammatory Diseases. *J. Clin. Med.* **2017**, *6*, 68, doi:10.3390/JCM6070068.
108. Ouchi, N.; Parker, J.L.; Lugus, J.J.; Walsh, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2011**, *11*, 85–97, doi:10.1038/nri2921.
109. Hotamisligil, G.S.; Shargill, N.S.; Spiegelman, B.M. Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor- α : Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance. *Science (80-)*. **1993**, *259*, 87–91, doi:10.1126/SCIENCE.7678183.
110. Ip, B.; Cilfone, N.A.; Belkina, A.C.; Defuria, J.; Jagannathan-Bogdan, M.; Zhu, M.; Kuchibhatla, R.; McDonnell, M.E.; Xiao, Q.; Kepler, T.B.; et al. Th17 cytokines differentiate obesity from obesity-associated type 2 diabetes and promote TNF α production. *Obesity* **2016**, *24*, 102–112, doi:10.1002/OBY.21243.
111. Zhang, Q.; Fang, W.; Ma, L.; Wang, Z. Di; Yang, Y.M.; Lu, Y.Q. VEGF levels in plasma in relation to metabolic control, inflammation, and microvascular complications in type-2 diabetes. *Med. (United States)* **2018**, *97*, doi:10.1097/MD.000000000010415.
112. McLaughlin, T.; Liu, L.F.; Lamendola, C.; Shen, L.; Morton, J.; Rivas, H.; Winer, D.; Tolentino, L.; Choi, O.; Zhang, H.; et al. T-cell profile in adipose tissue is associated with insulin resistance and systemic inflammation in humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2014**, *34*, 2632–2636, doi:10.1161/ATVBAHA.114.304636.
113. Nekoua, M.P.; Fachinan, R.; Atchamou, A.K.; Nouatin, O.; Amoussou-Guenou, D.; Amoussou-Guenou, M.K.; Moutairou, K.; Yessoufou, A. Modulation of immune cells and Th1/Th2 cytokines in insulin-treated type 2 diabetes mellitus. *Afr. Health Sci.* **2016**, *16*, 712–724,

doi:10.4314/ahs.v16i3.11.

114. Feuerer, M.; Herrero, L.; Cipolletta, D.; Naaz, A.; Wong, J.; Nayer, A.; Lee, J.; Goldfine, A.B.; Benoist, C.; Shoelson, S.; et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat. Med.* 2009 **15**:930–939, doi:10.1038/nm.2002.
115. Chatzigeorgiou, A.; Karalis, K.P.; Bornstein, S.R.; Chavakis, T. Lymphocytes in obesity-related adipose tissue inflammation. *Diabetologia* **2012**, *55*, 2583–2592, doi:10.1007/S00125-012-2607-0/FIGURES/1.
116. Nishimura, S.; Manabe, I.; Nagasaki, M.; Eto, K.; Yamashita, H.; Ohsugi, M.; Otsu, M.; Hara, K.; Ueki, K.; Sugiura, S.; et al. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat. Med.* 2009 **15**:914–920, doi:10.1038/nm.1964.
117. Wu, D.; Molofsky, A.B.; Liang, H.E.; Ricardo-Gonzalez, R.R.; Jouihan, H.A.; Bando, J.K.; Chawla, A.; Locksley, R.M. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science (80-.)*. **2011**, *332*, 243–247, doi:10.1126/SCIENCE.1201475/SUPPL_FILE/WU.SOM.PDF.
118. Zúñiga, L.A.; Shen, W.-J.; Joyce-Shaikh, B.; Pyatnova, E.A.; Richards, A.G.; Thom, C.; Andrade, S.M.; Cua, D.J.; Kraemer, F.B.; Butcher, E.C. IL-17 Regulates Adipogenesis, Glucose Homeostasis, and Obesity. *J. Immunol.* **2010**, *185*, 6947–6959, doi:10.4049/JIMMUNOL.1001269.
119. Garidou, L.; Pomié, C.; Klopp, P.; Waget, A.; Charpentier, J.; Aloulou, M.; Giry, A.; Serino, M.; Stenman, L.; Lahtinen, S.; et al. The Gut Microbiota Regulates Intestinal CD4 T Cells Expressing ROR γ t and Controls Metabolic Disease. *Cell Metab.* **2015**, *22*, 100–112, doi:10.1016/J.CMET.2015.06.001/ATTACHMENT/7CA94B85-133C-4BCE-9E90-6C3A5C91C450/MMC1.PDF.
120. Chen, C.; Shao, Y.; Wu, X.; Huang, C.; Lu, W. Elevated Interleukin-17 Levels in Patients with Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Mellitus. *Biochem. Physiol. Open Access* 2016 **5**:1–7, doi:10.4172/2168-9652.1000206.
121. Tsai, S.; Clemente-Casares, X.; Revelo, X.S.; Winer, S.; Winer, D.A. Are Obesity-Related Insulin Resistance and Type 2 Diabetes Autoimmune Diseases? *Diabetes* **2015**, *64*, 1886–1897, doi:10.2337/DB14-1488.
122. Abouzeid, S.; Sherif, N. Role of alteration in Treg/Th17 cells' balance in nephropathic patients with Type 2 diabetes mellitus. *Electron. physician* **2015**, *7*, 1613–1618, doi:10.19082/1613.
123. Zheng, Y.; Rudensky, A.Y. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat. Immunol.* 2007 **8**:457–462, doi:10.1038/ni1455.
124. Sakaguchi, S.; Yamaguchi, T.; Nomura, T.; Ono, M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell* **2008**, *133*, 775–787, doi:10.1016/J.CELL.2008.05.009.
125. Zheng, Y.; Rudensky, A.Y. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat. Immunol.* 2007 **8**:457–462, doi:10.1038/ni1455.
126. Dimeloe, S.; Burgener, A.V.; Grähler, J.; Hess, C. T-cell metabolism governing activation, proliferation and differentiation; a modular view. *Immunology* **2017**, *150*, 35–44, doi:10.1111/IMM.12655.
127. Michalek, R.D.; Gerriets, V.A.; Jacobs, S.R.; Macintyre, A.N.; MacIver, N.J.; Mason, E.F.; Sullivan, S.A.; Nichols, A.G.; Rathmell, J.C. Cutting Edge: Distinct Glycolytic and Lipid Oxidative Metabolic Programs Are Essential for Effector and Regulatory CD4+ T Cell Subsets. *J. Immunol.* **2011**, *186*, 3299–3303, doi:10.4049/JIMMUNOL.1003613.

128. Price, F.D.; Von Maltzahn, J.; Bentzinger, F.; Dumont, N.A.; Yin, H.; Chang, N.C.; Wilson, D.H.; Frenette, J.; Rudnicki, M.A.; Med, N.; et al. Erratum: De novo fatty acid synthesis controls the fate between regulatory T and T helper 17 cells. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 414–414, doi:10.1038/nm0415-414d.
129. Guzmán-Flores, J.M.; Portales-Pérez, D.P. Mechanisms of suppression of regulatory T-cells (Treg). *Gac. Med. Mex.* **2013**, *149*, 630–638.
130. Thornton, A.M.; Shevach, E.M. CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells Suppress Polyclonal T Cell Activation In Vitro by Inhibiting Interleukin 2 Production. *J. Exp. Med.* **1998**, *188*, 287–296, doi:10.1084/JEM.188.2.287.
131. Kleinewietfeld, M.; Hafler, D.A. Regulatory T cells in autoimmune neuroinflammation. *Immunol. Rev.* **2014**, *259*, 231–244, doi:10.1111/IMR.12169.
132. Du, X.; Liu, M.; Su, J.; Zhang, P.; Tang, F.; Ye, P.; Devenport, M.; Wang, X.; Zhang, Y.; Liu, Y.; et al. Uncoupling therapeutic from immunotherapy-related adverse effects for safer and effective anti-CTLA-4 antibodies in CTLA4 humanized mice. *Cell Res.* **2018**, *28*, 433–447, doi:10.1038/s41422-018-0012-z.
133. Kishore, M.; Cheung, K.C.P.; Fu, H.; Bonacina, F.; Wang, G.; Coe, D.; Ward, E.J.; Colamatteo, A.; Jangani, M.; Baragetti, A.; et al. Regulatory T Cell Migration Is Dependent on Glucokinase-Mediated Glycolysis. *Immunity* **2018**, *48*, 831–832, doi:10.1016/J.IMMUNI.2018.03.034.
134. Jagannathan-Bogdan, M.; McDonnell, M.E.; Shin, H.; Rehman, Q.; Hasturk, H.; Apovian, C.M.; Nikolajczyk, B.S. Elevated Proinflammatory Cytokine Production by a Skewed T Cell Compartment Requires Monocytes and Promotes Inflammation in Type 2 Diabetes. *J. Immunol.* **2011**, *186*, 1162–1172, doi:10.4049/JIMMUNOL.1002615.
135. Yuan, N.; Zhang, H.F.; Wei, Q.; Wang, P.; Guo, W.Y. Expression of CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells, Interleukin 10 and Transforming Growth Factor β in Newly Diagnosed Type 2 Diabetic Patients. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **2018**, *126*, 96–101, doi:10.1055/S-0043-113454/ID/R01-2017-0007-DIA-0025.
136. Zeng, L.; Lu, H.; Deng, H.; Mu, P.; Li, X.; Wang, M. Noninferiority Effects on Glycemic Control and β -Cell Function Improvement in Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Patients: Basal Insulin Monotherapy Versus Continuous Subcutaneous Insulin Infusion Treatment. <https://home.liebertpub.com/dia> **2012**, *14*, 35–42, doi:10.1089/DIA.2011.0123.
137. Han, J.M.; Patterson, S.J.; Speck, M.; Ehses, J.A.; Levings, M.K. Insulin Inhibits IL-10–Mediated Regulatory T Cell Function: Implications for Obesity. *J. Immunol.* **2014**, *192*, 623–629, doi:10.4049/JIMMUNOL.1302181.
138. Gregor, M.F.; Hotamisligil, G.S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101322> **2011**, *29*, 415–445, doi:10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-031210-101322.
139. Murphy, T.J.; Choileain, N.N.; Zang, Y.; Mannick, J.A.; Lederer, J.A. CD4+CD25+ Regulatory T Cells Control Innate Immune Reactivity after Injury. *J. Immunol.* **2005**, *174*, 2957–2963, doi:10.4049/JIMMUNOL.174.5.2957.
140. Kany, S.; Vollrath, J.T.; Relja, B. Cytokines in Inflammatory Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, doi:10.3390/IJMS20236008.
141. Zhang, J.M.; An, J. Cytokines, Inflammation and Pain. *Int. Anesthesiol. Clin.* **2007**, *45*, 27, doi:10.1097/AIA.0B013E318034194E.
142. Dinarello, C.A. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol. Rev.* **2018**, *281*, 8, doi:10.1111/IMR.12621.

143. Asao, H. Interleukin-2. *Ref. Modul. Biomed. Sci.***2014**, doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.04058-7.
144. Hoyer, K.K.; Dooms, H.; Barron, L.; Abbas, A.K. Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease. *Immunol. Rev.***2008**, 226, 19–28, doi:10.1111/J.1600-065X.2008.00697.X.
145. Luzina, I.G.; Keegan, A.D.; Heller, N.M.; Rook, G.A.W.; Shea-Donohue, T.; Atamas, S.P. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of “alternatives.” *J. Leukoc. Biol.***2012**, 92, 753, doi:10.1189/JLB.0412214.
146. Curtis, J.L. Interleukins: IL-4. *Encycl. Respir. Med. Four-Volume Set***2006**, 354–359, doi:10.1016/B0-12-370879-6/00475-0.
147. Tanaka, T.; Narazaki, M.; Kishimoto, T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.***2014**, 6, 16295–16296, doi:10.1101/CSHPERSPECT.A016295.
148. Unver, N.; McAllister, F. IL-6 family cytokines: Key inflammatory mediators as biomarkers and potential therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2018, 41, 10–17.
149. Steen, E.H.; Wang, X.; Balaji, S.; Butte, M.J.; Bollyky, P.L.; Keswani, S.G. The Role of the Anti-Inflammatory Cytokine Interleukin-10 in Tissue Fibrosis. *Adv. Wound Care***2020**, 9, 184, doi:10.1089/WOUND.2019.1032.
150. Couper, K.N.; Blount, D.G.; Riley, E.M. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *J. Immunol.***2008**, 180, 5771–5777, doi:10.4049/JIMMUNOL.180.9.5771.
151. Trinchieri, G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.***1995**, 13, 251–276, doi:10.1146/ANNUREV.IY.13.040195.001343.
152. Testa, U.; Pelosi, E.; Castelli, G.; Labbaye, C. miR-146 and miR-155: Two key modulators of immune response and tumor development. *Non-coding RNA* 2017, 3.
153. Kim, Y.K.; Kim, B.; Kim, V.N. Re-evaluation of the roles of DROSHA, Export in 5, and DICER in microRNA biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***2016**, 113, E1881–E1889, doi:10.1073/PNAS.1602532113.
154. Okada, H.; Kohanbash, G.; Lotze, M.T. MicroRNAs in immune regulation--opportunities for cancer immunotherapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.***2010**, 42, 1256–1261, doi:10.1016/J.BIOCEL.2010.02.002.
155. Paladini, L.; Fabris, L.; Bottai, G.; Raschioni, C.; Calin, G.A.; Santarpia, L. Targeting microRNAs as key modulators of tumor immune response. *J. Exp. Clin. Cancer Res.***2016**, 35, doi:10.1186/S13046-016-0375-2.
156. Condrat, C.E.; Thompson, D.C.; Barbu, M.G.; Bugnar, O.L.; Boboc, A.; Cretoiu, D.; Suciu, N.; Cretoiu, S.M.; Voinea, S.C. miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. *Cells***2020**, 9, doi:10.3390/CELLS9020276.
157. Eigsti, R.L.; Sudan, B.; Wilson, M.E.; Graff, J.W. Regulation of activation-associated microRNA accumulation rates during monocyte-to-macrophage differentiation. *J. Biol. Chem.***2014**, 289, 28433–28447, doi:10.1074/JBC.M114.599316.
158. Labbaye, C.; Testa, U. The emerging role of MIR-146A in the control of hematopoiesis, immune function and cancer. *J. Hematol. Oncol.***2012**, 5, doi:10.1186/1756-8722-5-13.
159. Mashima, R. Physiological roles of miR-155. *Immunology***2015**, 145, 323–333, doi:10.1111/IMM.12468.
160. Nejad, C.; Stunden, H.J.; Gantier, M.P. A guide to miRNAs in inflammation and innate immune

- responses. *FEBS J.***2018**, *285*, 3695–3716, doi:10.1111/FEBS.14482.
161. Taganov, K.D.; Boldin, M.P.; Chang, K.J.; Baltimore, D. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.***2006**, *103*, 12481–12486, doi:10.1073/PNAS.0605298103.
 162. Curtale, G.; Citarella, F.; Carissimi, C.; Goldoni, M.; Carucci, N.; Fulci, V.; Franceschini, D.; Meloni, F.; Barnaba, V.; Macino, G. An emerging player in the adaptive immune response: microRNA-146a is a modulator of IL-2 expression and activation-induced cell death in T lymphocytes. *Blood***2010**, *115*, 265–273, doi:10.1182/BLOOD-2009-06-225987.
 163. Lu, C.; Huang, X.; Zhang, X.; Roensch, K.; Cao, Q.; Nakayama, K.I.; Blazar, B.R.; Zeng, Y.; Zhou, X. miR-221 and miR-155 regulate human dendritic cell development, apoptosis, and IL-12 production through targeting of p27kip1, KPC1, and SOCS-1. *Blood***2011**, *117*, 4293–4303, doi:10.1182/BLOOD-2010-12-322503.
 164. Hou, J.; Wang, P.; Lin, L.; Liu, X.; Ma, F.; An, H.; Wang, Z.; Cao, X. MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. *J. Immunol.***2009**, *183*, 2150–2158, doi:10.4049/JIMMUNOL.0900707.
 165. Hou, J.; Wang, P.; Lin, L.; Liu, X.; Ma, F.; An, H.; Wang, Z.; Cao, X. MicroRNA-146a Feedback Inhibits RIG-I-Dependent Type I IFN Production in Macrophages by Targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. *J. Immunol.***2009**, *183*, 2150–2158, doi:10.4049/jimmunol.0900707.
 166. Boldin, M.P.; Taganov, K.D.; Rao, D.S.; Yang, L.; Zhao, J.L.; Kalwani, M.; Garcia-Flores, Y.; Luong, M.; Devrekanli, A.; Xu, J.; et al. miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *J. Exp. Med.***2011**, *208*, 1189–1201, doi:10.1084/jem.20101823.
 167. Zhao, J.L.; Rao, D.S.; Boldin, M.P.; Taganov, K.D.; O’Connell, R.M.; Baltimore, D. NF-kappaB dysregulation in microRNA-146a-deficient mice drives the development of myeloid malignancies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***2011**, *108*, 9184–9189, doi:10.1073/PNAS.1105398108.
 168. Lu, L.F.; Boldin, M.P.; Chaudhry, A.; Lin, L.L.; Taganov, K.D.; Hanada, T.; Yoshimura, A.; Baltimore, D.; Rudensky, A.Y. Function of miR-146a in Controlling Treg Cell-Mediated Regulation of Th1 Responses. *Cell***2010**, *142*, 914–929, doi:10.1016/j.cell.2010.08.012.
 169. Yang, L.; Boldin, M.P.; Yu, Y.; Liu, C.S.; Ea, C.K.; Ramakrishnan, P.; Taganov, K.D.; Zhao, J.L.; Baltimore, D. miR-146a controls the resolution of T cell responses in mice. *J. Exp. Med.***2012**, *209*, 1655–1670, doi:10.1084/JEM.20112218.
 170. Huffaker, T.B.; Hu, R.; Runtsch, M.C.; Bake, E.; Chen, X.; Zhao, J.; Round, J.L.; Baltimore, D.; O’Connell, R.M. Epistasis between MicroRNAs 155 and 146a during T Cell-Mediated Antitumor Immunity. *Cell Rep.***2012**, *2*, 1697–1709, doi:10.1016/j.celrep.2012.10.025.
 171. Haasch, D.; Chen, Y.W.; Reilly, R.M.; Grace Chiou, X.; Koterski, S.; Smith, M.L.; Kroeger, P.; McWeeny, K.; Halbert, D.N.; Mollison, K.W.; et al. T cell activation induces a noncoding RNA transcript sensitive to inhibition by immunosuppressant drugs and encoded by the proto-oncogene, BIC. *Cell. Immunol.***2002**, *217*, 78–86, doi:10.1016/S0008-8749(02)00506-3.
 172. Alivernini, S.; Gremese, E.; McSharry, C.; Tolusso, B.; Ferraccioli, G.; McInnes, I.B.; Kurowska-Stolarska, M. MicroRNA-155-at the critical interface of innate and adaptive immunity in arthritis. *Front. Immunol.***2018**, *8*, 1932, doi:10.3389/FIMMU.2017.01932/BIBTEX.
 173. O’Neill, L.A.; Sheedy, F.J.; McCoy, C.E. MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.***2011**, *11*, 163–175, doi:10.1038/NRI2957.
 174. Nejad, C.; Stunden, H.J.; Gantier, M.P. A guide to miRNAs in inflammation and innate immune responses. *FEBS J.***2018**, *285*, 3695–3716, doi:10.1111/FEBS.14482.

175. Wu, X.Y.; Fan, W.D.; Fang, R.; Wu, G.F. Regulation of microRNA-155 in endothelial inflammation by targeting nuclear factor (NF)- κ B P65. *J. Cell. Biochem.***2014**, *115*, 1928–1936, doi:10.1002/JCB.24864.
176. Graff, J.W.; Dickson, A.M.; Clay, G.; McCaffrey, A.P.; Wilson, M.E. Identifying functional microRNAs in macrophages with polarized phenotypes. *J. Biol. Chem.***2012**, *287*, 21816–21825, doi:10.1074/JBC.M111.327031.
177. O’Connell, R.M.; Chaudhuri, A.A.; Rao, D.S.; Baltimore, D. Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***2009**, *106*, 7113–7118, doi:10.1073/PNAS.0902636106.
178. Zhao, R.; Dong, R.; Yang, Y.; Wang, Y.; Ma, J.; Wang, J.; Li, H.; Zheng, S. MicroRNA-155 modulates bile duct inflammation by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 in biliary atresia. *Pediatr. Res.***2017**, *82*, 1007–1016, doi:10.1038/PR.2017.87.
179. Rodriguez, A.; Vigorito, E.; Clare, S.; Warren, M. V.; Couttet, P.; Soond, D.R.; Van Dongen, S.; Grocock, R.J.; Das, P.P.; Miska, E.A.; et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science (80-)***2007**, *316*, 608–611, doi:10.1126/SCIENCE.1139253/SUPPL_FILE/RODRIGUEZ_SOM.PDF.
180. O’Connell, R.M.; Taganov, K.D.; Boldin, M.P.; Cheng, G.; Baltimore, D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***2007**, *104*, 1604–1609, doi:10.1073/pnas.0610731104.
181. Jablonski, K.A.; Gaudet, A.D.; Amici, S.A.; Popovich, P.G.; Guerau-de-Arellano, M. Control of the Inflammatory Macrophage Transcriptional Signature by miR-155. *PLoS One***2016**, *11*, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0159724.
182. Tili, E.; Michaille, J.-J.; Cimino, A.; Costinean, S.; Dumitru, C.D.; Adair, B.; Fabbri, M.; Alder, H.; Liu, C.G.; Calin, G.A.; et al. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J. Immunol.***2007**, *179*, 5082–5089, doi:10.4049/JIMMUNOL.179.8.5082.
183. Murugaiyan, G.; Beynon, V.; Mittal, A.; Joller, N.; Weiner, H.L. Silencing microRNA-155 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.***2011**, *187*, 2213–2221, doi:10.4049/JIMMUNOL.1003952.
184. O’Connell, R.M.; Kahn, D.; Gibson, W.S.J.; Round, J.L.; Scholz, R.L.; Chaudhuri, A.A.; Kahn, M.E.; Rao, D.S.; Baltimore, D. MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. *Immunity***2010**, *33*, 607–619, doi:10.1016/J.IMMUNI.2010.09.009.
185. Goncalves-Alves, E.; Saferding, V.; Schliehe, C.; Benson, R.; Kurowska-Stolarska, M.; Brunner, J.S.; Puchner, A.; Podesser, B.K.; Smolen, J.S.; Redlich, K.; et al. MicroRNA-155 controls T helper cell activation during viral infection. *Front. Immunol.***2019**, *10*, 1367, doi:10.3389/FIMMU.2019.01367/BIBTEX.
186. Rudrapal, M.; Khairnar, S.J.; Jadhav, A.G. Drug Repurposing (DR): An Emerging Approach in Drug Discovery. *Drug Repurposing - Hypothesis, Mol. Asp. Ther. Appl.***2020**, doi:10.5772/INTECHOPEN.93193.
187. Xue, H.; Li, J.; Xie, H.; Wang, Y. Review of Drug Repositioning Approaches and Resources. *Int. J. Biol. Sci.***2018**, *14*, 1232, doi:10.7150/IJBS.24612.
188. Cha, Y.; Erez, T.; Reynolds, I.J.; Kumar, D.; Ross, J.; Koytiger, G.; Kusko, R.; Zeskind, B.; Risso, S.; Kagan, E.; et al. Drug repurposing from the perspective of pharmaceutical companies. *Br. J. Pharmacol.***2018**, *175*, 168–180, doi:10.1111/BPH.13798.
189. Goldfine, A.B.; Fonseca, V.; Shoelson, S.E. Therapeutic Approaches to Target Inflammation in

- Type 2 Diabetes. *Clin. Chem.***2011**, *57*, 162, doi:10.1373/CLINCHEM.2010.148833.
190. Hoffman, P.S.; Sisson, G.; Croxen, M.A.; Welch, K.; Harman, W.D.; Cremades, N.; Morash, M.G. Antiparasitic drug nitazoxanide inhibits the pyruvate oxidoreductases of *Helicobacter pylori*, selected anaerobic bacteria and parasites, and *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.***2007**, *51*, 868–876, doi:10.1128/AAC.01159-06.
 191. De Carvalho, L.P.S.; Lin, G.; Jiang, X.; Nathan, C. Nitazoxanide kills replicating and nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* and evades resistance. *J. Med. Chem.***2009**, *52*, 5789–5792, doi:10.1021/JM9010719.
 192. Kovács, D.; Simon, Z.; Hári, P.; Málnási-Csizmadia, A.; Hegedus, C.; Drimba, L.; Németh, J.; Sári, R.; Szilvássy, Z.; Peitl, B. Identification of PPAR γ ligands with one-dimensional drug profile matching. *Drug Des. Devel. Ther.***2013**, *7*, 917–928, doi:10.2147/DDDT.S47173.
 193. Stoian, A.P.; Banerjee, Y.; Rizvi, A.A.; Rizzo, M. Diabetes and the COVID-19 Pandemic: How Insights from Recent Experience Might Guide Future Management., doi:10.1089/met.2020.0037.
 194. DIABETES EN MÉXICO Available online: <https://www.insp.mx/avisos/3652-diabetes-en-mexico.html#sup1> (accessed on Feb 13, 2022).
 195. Tsalamandris, S.; Antonopoulos, A.S.; Oikonomou, E.; Papamikroulis, G.A.; Vogiatzi, G.; Papaioannou, S.; Devereux, S.; Tousoulis, D. The Role of Inflammation in Diabetes: Current Concepts and Future Perspectives. *Eur. Cardiol. Rev.***2019**, *14*, 50, doi:10.15420/ECR.2018.33.1.
 196. Glisoni, R.J.; Sosnik, A. Encapsulation of the antimicrobial and immunomodulator agent nitazoxanide within polymeric micelles. *J. Nanosci. Nanotechnol.***2014**, *14*, 4670–4682, doi:10.1166/JNN.2014.8647.
 197. Pubchem Nitazoxanide | C₁₂H₉N₃O₅S - PubChem Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nitazoxanide> (accessed on Dec 8, 2020).
 198. Malesuik, M.D.; Goncalves, H.M.L.; Garcia, C.V.; Trein, M.R.; Nardi, N.B.; Schapoval, E.E.S.; Steppe, M. Identification, characterization and cytotoxicity in vitro assay of nitazoxanide major degradation product. *Talanta***2012**, *93*, 206–211, doi:10.1016/j.talanta.2012.02.014.
 199. Abbasalipourkabir, R.; Fallah, M.; Sedighi, F.; Maghsood, A.H.; Javid, S. Nanocapsulation of nitazoxanide in solid lipid nanoparticles as a new drug delivery system and in vitro release study. *J. Biol. Sci.***2016**, *16*, 120–127, doi:10.3923/jbs.2016.120.127.
 200. Bhalerao, S.; Kadam, P. Sample size calculation. *Int. J. Ayurveda Res.***2010**, *1*, 55, doi:10.4103/0974-7788.59946.
 201. Guzman-Flores, J.M.; Cortez-Espinosa, N.; Cortés-García, J.D.; Vargas-Morales, J.M.; Cataño-Cañizalez, Y.G.; Rodríguez-Rivera, J.G.; Portales-Perez, D.P. Expression of CD73 and A2A receptors in cells from subjects with obesity and type 2 diabetes mellitus. *Immunobiology***2015**, *220*, 976–984, doi:10.1016/J.IMBIO.2015.02.007.
 202. Guzmán-Flores, J.M.; Ramírez-Emiliano, J.; Pérez-Vázquez, V.; López-Briones, S. Th17 and regulatory T cells in patients with different time of progression of type 2 diabetes mellitus. *Cent. J. Immunol.***2020**, *45*, 29–36, doi:10.5114/CEJI.2020.94670.
 203. eBioscience™ Cell Proliferation Dye eFluor™ 670 Available online: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/65-0840-85> (accessed on Nov 22, 2021).
 204. Trickett, A.; Kwan, Y.L. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *J. Immunol. Methods***2003**, *275*, 251–255, doi:10.1016/S0022-1759(03)00010-3.
 205. Riddell, S.R.; Greenberg, P.D. The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to




- clone and expand human antigen-specific T cells. *J. Immunol. Methods***1990**, *128*, 189–201, doi:10.1016/0022-1759(90)90210-M.
206. Rodríguez-Galán, A.; Fernández-Messina, L.; Sánchez-Madrid, F. Control of immunoregulatory molecules by miRNAs in T cell activation. *Front. Immunol.***2018**, *9*, 1–10, doi:10.3389/fimmu.2018.02148.
207. Czernichow, S.; Kengne, A.P.; Stamatakis, E.; Hamer, M.; Batty, G.D. Body mass index, waist circumference and waist-hip ratio: Which is the better discriminator of cardiovascular disease mortality risk? Evidence from an individual-participant meta-analysis of 82864 participants from nine cohort studies. *Obes. Rev.***2011**, *12*, 680–687, doi:10.1111/j.1467-789X.2011.00879.x.
208. Johnson, E.L.; Feldman, H.; Butts, A.; Chamberlain, J.; Collins, B.; Doyle-Delgado, K.; Dugan, J.; Leal, S.; Rhinehart, A.S.; Shubrook, J.H.; et al. Standards of medical care in diabetes—2020 abridged for primary care providers. *Clin. Diabetes* **2020**, *38*, 10–38.
209. Moreno-Altamirano, L.; García-García, J.J.; Soto-Estrada, G.; Capraro, S.; Limón-Cruz, D. Epidemiología y determinantes sociales asociados a la obesidad y la diabetes tipo 2 en México. *Rev. Médica Del Hosp. Gen. México***2014**, *77*, 114–123, doi:10.1016/j.hgmx.2014.07.002.
210. Jagannathan-Bogdan, M.; McDonnell, M.E.; Shin, H.; Rehman, Q.; Hasturk, H.; Apovian, C.M.; Nikolajczyk, B.S. Elevated Proinflammatory Cytokine Production by a Skewed T Cell Compartment Requires Monocytes and Promotes Inflammation in Type 2 Diabetes. *J. Immunol.***2011**, *186*, 1162–1172, doi:10.4049/jimmunol.1002615.
211. Mahabadi-Ashtiyani, E.; Sheikh, V.; Borzouei, S.; Salehi, I.; Alahgholi-Hajibehzad, M. The increased T helper cells proliferation and inflammatory responses in patients with type 2 diabetes mellitus is suppressed by sitagliptin and vitamin D3 in vitro. *Inflamm. Res.***2019**, *68*, 857–866, doi:10.1007/s00011-019-01265-5.
212. Wexler, D.J.; Grant, R.W.; Meigs, J.B.; Nathan, D.M.; Cagliero, E. Sex disparities in treatment of cardiac risk factors in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care***2005**, *28*, 514–520, doi:10.2337/DIACARE.28.3.514.
213. K D Bertakis 1, R Azari, L J Helms, E J Callahan, J.A.R. Gender differences in the utilization of health care services - PubMed Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10718692/> (accessed on Nov 22, 2021).
214. Borra, R.C.; Lotufo, M.A.; Gagioti, S.M.; Barros, F. de M.; Andrade, P.M. A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. *Braz. Oral Res.***2009**, *23*, 255–262, doi:10.1590/S1806-83242009000300006.
215. Adan, A.; Kiraz, Y.; Baran, Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Curr. Pharm. Biotechnol.***2016**, *17*, 1213–1221, doi:10.2174/1389201017666160808160513.
216. Giacometti, A.; Cirioni, O.; Barchiesi, F.; Ancarani, F.; Scalise, G. Activity of nitazoxanide alone and in combination with azithromycin and rifabutin against *Cryptosporidium parvum* in cell culture. *J. Antimicrob. Chemother.***2000**, *45*, 453–456, doi:10.1093/jac/45.4.453.
217. Hu, Y.; Zhu, W.; Tang, G.; Mayweg, A. V.; Yang, G.; Wu, J.Z.; Shen, H.C. Novel therapeutics in discovery and development for treatment of chronic HBV infection. In *Annual Reports in Medicinal Chemistry*; Academic Press Inc., 2013; Vol. 48, pp. 265–281.
218. Lotz, M.; Jirik, F.; Kabouridis, P.; Tsoukas, C.; Hirano, T.; Kishimoto, T.; Carson, D.A. B cell stimulating factor 2/interleukin 6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes. *J. Exp. Med.***1988**, *167*, 1253–1258, doi:10.1084/jem.167.3.1253.
219. Vainer, N.; Dehlendorff, C.; Johansen, J.S. Systematic literature review of IL-6 as a biomarker or treatment target in patients with gastric, bile duct, pancreatic and colorectal cancer. *Oncotarget* **2018**, *9*, 29820–29841.

220. Rincón, M.; Anguita, J.; Nakamura, T.; Fikrig, E.; Flavell, R.A. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *J. Exp. Med.***1997**, *185*, 461–469, doi:10.1084/jem.185.3.461.
221. Yoo, J.K.; Cho, J.H.; Lee, S.W.; Sung, Y.C. IL-12 Provides Proliferation and Survival Signals to Murine CD4 + T Cells Through Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathway . *J. Immunol.***2002**, *169*, 3637–3643, doi:10.4049/jimmunol.169.7.3637.
222. Leal, I.S.; Smedegård, B.; Andersen, P.; Appelberg, R. Interleukin-6 and interleukin-12 participate in induction of a type 1 protective T-cell response during vaccination with a tuberculosis subunit vaccine. *Infect. Immun.***1999**, *67*, 5747–5754, doi:10.1128/iai.67.11.5747-5754.1999.
223. Nambu, A.; Nakae, S.; Iwakura, Y. IL-1 β , but not IL-1 α , is required for antigen-specific T cell activation and the induction of local inflammation in the delayed-type hypersensitivity responses. *Int. Immunol.***2006**, *18*, 701–712, doi:10.1093/intimm/dxl007.
224. Heijink, I.H.; Vellenga, E.; Borger, P.; Postma, D.S.; De Monchy, J.G.R.; Kauffman, H.F. Interleukin-6 promotes the production of interleukin-4 and interleukin-5 by interleukin-2-dependent and -independent mechanisms in freshly isolated human T cells. *Immunology***2002**, *107*, 316–324, doi:10.1046/j.1365-2567.2002.01501.x.
225. Khaodhjar, L.; Ling, P.R.; Blackburn, G.L.; Bistran, B.R. Serum levels of interleukin-6 and C-reactive protein correlate with body mass index across the broad range of obesity. *J. Parenter. Enter. Nutr.***2004**, *28*, 410–415, doi:10.1177/0148607104028006410.
226. Kaneko, A. Tocilizumab in rheumatoid arthritis: Efficacy, safety and its place in therapy. *Ther. Adv. Chronic Dis.* 2013, *4*, 15–21.
227. Bielekova, B. Daclizumab therapy for multiple sclerosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.***2019**, *9*, doi:10.1101/cshperspect.a034470.
228. Cavalli, G.; Dinarello, C.A. Anakinra therapy for non-cancer inflammatory diseases. *Front. Pharmacol.***2018**, *9*, doi:10.3389/fphar.2018.01157.
229. Garavelli, S.; De Rosa, V.; de Candia, P. The Multifaceted Interface Between Cytokines and microRNAs: An Ancient Mechanism to Regulate the Good and the Bad of Inflammation. *Front. Immunol.* 2018, *9*, 3012.
230. Li, J.; Huang, M.; Shen, X. The association of oxidative stress and pro-inflammatory cytokines in diabetic patients with hyperglycemic crisis. *J. Diabetes Complications***2014**, *28*, 662–666, doi:10.1016/j.jdiacomp.2014.06.008.
231. Thai, T.H.; Calado, D.P.; Casola, S.; Ansel, K.M.; Xiao, C.; Xue, Y.; Murphy, A.; Friendewey, D.; Valenzuela, D.; Kutok, J.L.; et al. Regulation of the germinal center response by MicroRNA-155. *Science (80-.)***2007**, *316*, 604–608, doi:10.1126/science.1141229.
232. Vigorito, E.; Kohlhaas, S.; Lu, D.; Leyland, R. miR-155: An ancient regulator of the immune system. *Immunol. Rev.* 2013, *253*, 146–157.
233. Taganov, K.D.; Boldin, M.P.; Chang, K.J.; Baltimore, D. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***2006**, *103*, 12481–12486, doi:10.1073/pnas.0605298103.
234. Baldeón R., L.; Weigelt, K.; de Wit, H.; Ozcan, B.; van Oudenaren, A.; Sempértegui, F.; Sijbrands, E.; Grosse, L.; Freire, W.; Drexhage, H.A.; et al. Decreased Serum Level of miR-146a as Sign of Chronic Inflammation in Type 2 Diabetic Patients. *PLoS One***2014**, *9*, e115209, doi:10.1371/journal.pone.0115209.
235. Mensà, E.; Giuliani, A.; Maccacchione, G.; Gurău, F.; Bonfigli, A.R.; Romagnoli, F.; De Luca, M.;

- Sabbatinelli, J.; Olivieri, F. Circulating miR-146a in healthy aging and type 2 diabetes: Age- and gender-specific trajectories. *Mech. Ageing Dev.***2019**, *180*, 1–10, doi:10.1016/j.mad.2019.03.001.
236. Pottier, N.; Maurin, T.; Chevalier, B.; Puisségur, M.P.; Lebrigand, K.; Robbe-Sermesant, K.; Bertero, T.; Cardenas, C.L.L.; Courcot, E.; Rios, G.; et al. Identification of keratinocyte growth factor as a target of microRNA-155 in lung fibroblasts: Implication in epithelial-mesenchymal interactions. *PLoS One***2009**, *4*, doi:10.1371/journal.pone.0006718.
237. Artlett, C.M.; Sassi-Gaha, S.; Hope, J.L.; Feghali-Bostwick, C.A.; Katsikis, P.D. Mir-155 is overexpressed in systemic sclerosis fibroblasts and is required for NLRP3 inflammasome-mediated collagen synthesis during fibrosis. *Arthritis Res. Ther.***2017**, *19*, doi:10.1186/s13075-017-1331-z.
238. Li, X.; Tian, F.; Wang, F. Rheumatoid arthritis-associated microRNA-155 targets socs1 and upregulates TNF- α and IL-1 β in PBMCs. *Int. J. Mol. Sci.***2013**, *14*, 23910–23921, doi:10.3390/ijms141223910.
239. Curtale, G.; Rubino, M.; Locati, M. MicroRNAs as molecular switches in macrophage activation. *Front. Immunol.***2019**, *10*, 1–13, doi:10.3389/fimmu.2019.00799.
240. Essandoh, K.; Li, Y.; Huo, J.; Fan, G.C. MiRNA-mediated macrophage polarization and its potential role in the regulation of inflammatory response. *Shock* 2016, *46*, 122–131.
241. Moniuszko, M.; Bodzenta-Lukaszyk, A.; Kowal, K.; Lenczewska, D.; Dabrowska, M. Enhanced frequencies of CD14⁺⁺CD16⁺, but not CD14⁺CD16⁺, peripheral blood monocytes in severe asthmatic patients. *Clin. Immunol.***2009**, *130*, 338–346, doi:10.1016/j.clim.2008.09.011.
242. Thomsen, J.H.; Etzerodt, A.; Svendsen, P.; Moestrup, S.K. The haptoglobin-cd163-heme oxygenase-1 pathway for hemoglobin scavenging. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013, *2013*.
243. Bories, G.; Caiazzo, R.; Derudas, B.; Copin, C.; Raverdy, V.; Pigeyre, M.; Pattou, F.; Staels, B.; Chinetti-Gbaguidi, G. Impaired alternative macrophage differentiation of peripheral blood mononuclear cells from obese subjects. *Diabetes Vasc. Dis. Res.***2012**, *9*, 189–195, doi:10.1177/1479164111430242.
244. Comer, B.S.; Camoretti-Mercado, B.; Kogut, P.C.; Halayko, A.J.; Solway, J.; Gerthoffer, W.T. MicroRNA-146a and microRNA-146b expression and anti-inflammatory function in human airway smooth muscle. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.***2014**, *307*, L727–L734, doi:10.1152/ajplung.00174.2014.
245. Wu, D.; Molofsky, A.B.; Liang, H.E.; Ricardo-Gonzalez, R.R.; Jouihan, H.A.; Bando, J.K.; Chawla, A.; Locksley, R.M. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science (80-)***2011**, *332*, 243–247, doi:10.1126/SCIENCE.1201475/SUPPL_FILE/WU.SOM.PDF.
246. Orecchioni, M.; Ghosheh, Y.; Pramod, A.B.; Ley, K. Macrophage polarization: Different gene signatures in M1(Lps+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively activated macrophages. *Front. Immunol.* 2019, *10*, 1084.
247. Yu, X.-L.; Wu, B.-T.; Ma, T.-T.; Lin, Y.; Cheng, F.; Xiong, H.-Y.; Xie, C.-L.; Liu, C.-Y.; Wang, Q.; Li, Z.-W.; et al. *Overexpression of IL-12 reverses the phenotype and function of M2 macrophages to M1 macrophages*; 2016; Vol. 9;.
248. A Stockis, X.D.L.J.C.J.F.R. Pharmacokinetics of nitazoxanide after single oral dose administration in 6 healthy volunteers - PubMed Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8864798/> (accessed on Nov 22, 2021).

Article

Nitazoxanide Exerts Immunomodulatory Effects on Peripheral Blood Mononuclear Cells from Type 2 Diabetes Patients

Mauricio Castillo-Salazar ¹, Fausto Sánchez-Muñoz ² , Rashidi Springall del Villar ², Gabriel Navarrete-Vázquez ¹ , Adrián Hernández-DíazCoudet ² , Carlos Mojica-Cardoso ³, Sara García-Jiménez ¹, Cairo Toledano-Jaimes ¹ and Germán Bernal-Fernández ^{1,*}

¹ Pharmacy Faculty, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca 62209, Mexico; mau.castillosalazar@gmail.com (M.C.-S.); gabriel_navarrete@uaem.mx (G.N.-V.); saragarcia@uaem.mx (S.G.-J.); tjcd_ff@uaem.mx (C.T.-J.)

² Immunology Department, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Tlalpan, Mexico City 14080, Mexico; fausto22@yahoo.com (F.S.-M.); raspringall@yahoo.com (R.S.d.V.); adrian.hernandez.diaz@hotmail.com (A.H.-D.)

³ Pathology Laboratory, Hospital del Niño Morelense, Cuernavaca 62275, Mexico; carlos.mojica.cardoso@gmail.com

* Correspondence: gbernal@uaem.mx; Tel.: +52-777-329-7089



Citation: Castillo-Salazar, M.; Sánchez-Muñoz, F.; Springall del Villar, R.; Navarrete-Vázquez, G.; Hernández-DíazCoudet, A.; Mojica-Cardoso, C.; García-Jiménez, S.; Toledano-Jaimes, C.; Bernal-Fernández, G. Nitazoxanide Exerts Immunomodulatory Effects on Peripheral Blood Mononuclear Cells from Type 2 Diabetes Patients. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1817. <https://doi.org/10.3390/biom11121817>

Academic Editor: Yuxiang Sun

Received: 8 November 2021

Accepted: 30 November 2021

Published: 2 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Background: Type 2 diabetes (T2D) is a low-grade inflammatory condition with abnormalities in the immune response mediated by T lymphocytes and macrophages. Drug repositioning for immunomodulatory molecules is an attractive proposal for treating T2D. Nitazoxanide (NTZ) is a broad-spectrum drug with promising immunomodulatory effects. Thus, we investigated the immunomodulatory effect of NTZ on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with T2D. Methods: Fifty patients with T2D were selected, and the proliferative response of T lymphocytes and the M1/M2 ratio of macrophages post cell culture were evaluated by flow cytometry, as well as measuring the concentration of cytokines by ELISA and the relative expression of microRNAs (miRNAs) related to the immune response by real-time PCR. Results: NTZ exerts an inhibitory effect on the cell proliferation of T lymphocytes stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies without modifying cell viability, and significant decreases in the supernatant concentrations of interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, and IL-12. Furthermore, NTZ negatively regulates the relative expression of miR-155-5p without changes in miR-146a-5p. The M1/M2 ratio of monocytes/macrophages decreased the M1 and increased the M2 subpopulation by NTZ. Conclusions: Our results suggest that NTZ exerts immunomodulatory effects on PBMCs from T2D patients, and shows potential alternative therapeutic benefits.

Keywords: immunomodulation; nitazoxanide; inflammation; T2D; miRNAs

1. Introduction

Type 2 diabetes (T2D) is a chronic degenerative inflammatory disorder characterized by insulin dysfunction and chronic hyperglycemia [1]. In 2019, the International Diabetes Federation (IDF) reported 463 million people with diabetes worldwide, with a prevalence of more than 9%, 1 in 2 cases of which had not yet been diagnosed, and it is projected that there will be 700 million cases in 2045. T2D represents 90% of all the cases of diabetes, and its inadequate control leads to cardiovascular disease, kidney failure, neuropathy, and lower limb amputation, resulting in frequent hospitalizations and premature death [2]. Although there are many pharmacological strategies for treating T2D, new therapies are still needed. Chronic systemic inflammation is recognized as a causative factor of the pathogenesis in T2D [3,4], producing abnormalities in the immune response [5], such as proliferation and activation of T lymphocytes and macrophages; functional deterioration of B lymphocytes and natural killer cells; and decreased chemotaxis, phagocytosis, and

opsonization [6]. The activation of T cells plays a role in promoting and maintaining inflammatory processes [7]. Chronic hyperglycemia has been reported to deregulate the function of T cells [8], resulting in a significant loss to the natural regulatory mechanism mediated by T regulatory cells (Treg) in T2D, which further exacerbates the activation and inflammation for T cells [9]. Furthermore, an increase in proinflammatory cytokines is associated with poor glycemic control and disease complications [10]. It is widely accepted that macrophage activation is affected by T cells [11]. Patients with T2D have been reported to have a significant increase in M1 proinflammatory macrophages and a decrease in M2 anti-inflammatory macrophages [12,13]. M1 macrophages induce an inflammatory and insulin resistance state through the inhibition of insulin signaling, indirectly produced by TNF- α , IL-6, and IL-1 β [14,15], while M2 macrophages protect against insulin resistance by an IL-10-dependent mechanism [16]. The cytokines secreted by immune cells are dominant regulators of pathological inflammation in T2D; therefore, macrophage signaling also affects polarization of the adaptive immune system to maintain a chronic T cell response [17]. Recently, miRNAs have been recognized as key regulators of the immune response, i.e., more than 100 different miRNAs are expressed by the cells of the immune system [18], which together influence the pathways that control cell development and function for innate and adaptive immune responses, which regulate cellular responses by targeting multiple components of a biological pathway [19,20]. The miR-155-5p and miR-146a-5p are transcriptionally regulated by NF- κ B and have multiple functions. The expression of miR-155-5p has been shown to be essential for the development and function of T cells and macrophages, enhancing the inflammatory response, while miR-146a-5p functions as an anti-inflammatory regulator in various types of immune cells, suppressing the inflammatory process. These miRNAs both form a unique regulatory network to ensure precise inflammatory responses by regulating the activity of NF- κ B, essential to control cell growth, proliferation, and differentiation, as well as the cytokine synthesis, whereas its dysregulation leads to the development of chronic inflammation in T2D [21,22]. Due to high failure rates, elevated costs, and the slowness in discovering and developing new drugs, the repositioning of existing drugs is an attractive proposal that involves the use of risk-free compounds, with lower overall development costs and shorter delivery timelines for the treatment of various types of diseases [23]. Nitazoxanide (NTZ) is a thiazolide-type drug synthesized by amidation from acetylsalicylic chloride acid and 2-amino-5-nitrothiazole with a broad spectrum of anti-infective effects that notably modulate the survival, growth, and proliferation of a variety of extracellular and intracellular protozoa, helminths, anaerobic, and microaerophilic bacteria, as well as viruses [24–26]. NTZ is rapidly hydrolyzed by esterases present in plasma to an active metabolite, i.e., tizoxanide via deacetylation. Tizoxanide is a very polar molecule with low cell permeability, which is the reason why NTZ is administered as its prodrug [27]. Moreover, a few studies have reported that NTZ has prominent immunomodulatory functions, exerting inhibitory effects in the production of IL-6 by RAW264.7 cells and lipopolysaccharide-stimulated peritoneal macrophages, indicating its regulatory role at the transcriptional level [28]. Previously, NTZ was proposed as an agonist of PPAR- γ receptors [29], as well as a cytokine inhibitor, emphasizing its potential role against the “cytokine storm” in COVID-19 [30]. Therefore, new approaches must be developed for the treatment of T2D that investigate alternative mechanisms for regulating important immune functions. NTZ is an interesting drug candidate for the treatment of meta-inflammation that characterizes T2D. Thus, the objective of this study was to evaluate the immunomodulatory effects of NTZ in cultured PBMCs from patients with T2D without complications, when stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies.

2. Materials and Methods

2.1. Nitazoxanide Isolation from Commercial Tablets

Tablets containing 500 mg of NTZ were used. The covers were removed, and the tablet cores were gently disintegrated and reduced to powder using a mortar. NTZ was

isolated from excipients using a heterogeneous extraction with acetone and filtration at room temperature, and NTZ was isolated from the mother liquor by evaporation, with a yield of 72%. The purity of the isolated NTZ was confirmed by melting point comparison of spectroscopic, spectrometric, and elemental analysis data. The melting point of the sample obtained experimentally was 202 °C, which correlated with that reported in the literature (202 °C) [31,32]. In addition, the nuclear magnetic resonance analysis of the isolated sample provided the following data: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.18 (s, 3H, CH₃); 7.27 (dd, 1H, H-3'); 7.60 (td, 1H, H-4'); 7.28–7.30 (m, 1H, H-5'); 8.16 (dd, 1H, H-6'); 8.74 (s, 1H, H-4); 10.81 (s, 1H, N-H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 20.9 (CH₃), 117.8 (C-3'), 125.4 (C-5'), 131.4 (C-4'), 132.1 (C-6'), 132.9 (C-1'), 139.4 (C-5), 149.9 (C-2'), 153.2 (C-4), 162.3 (C-2), 163.2 (NHC=O), and 170.5 (OC=O) ppm. MS (FAB+): *m/z* 308 (M+H)⁺. The data collections matched with those reported in the literature [33]. The elemental analysis confirmed ≥95% sample purity (±0.3% of the calculated value): Anal. Calcd. for C₁₂H₉N₃O₅S: C, 43.90; H, 2.95; N, 13.67; S, 10.44. Found: C, 46.71; H, 2.94; N, 13.71; S, 10.39 [34].

2.2. Study Population

The sample size was obtained through a statistical adjustment, considering the design of the study. The calculations were carried out by means of statistical adjustments when determining variables and parameters previously evaluated by other research groups [35]; similar studies have used a sample size similar to that used in this study [36,37]. Fifty consecutive, randomized, and willing-to-participate patients with a clinical diagnosis of T2D without complications were invited to attend an external medical consultation at the Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” in Mexico City. Patients with a diagnosis of T2D equal to or less than ten years, with pharmacological treatment, and without complications were included in our study. Patients with infectious diseases, cancer, hemoglobinopathies, or advanced chronic complications were excluded. Sociodemographic, lifestyle, physical activity, and nutritional data were obtained using a questionnaire at the time of inclusion. The protocol was approved by the research and bioethics committees of the Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” (No. 20-1183). All participants signed an informed consent to participate.

2.3. Isolation and Culture of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)

After 8–10 h of fasting, for all patients, 15 mL of peripheral blood was obtained by venipuncture with EDTA collector tubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). The HbA_{1c} percentage was determined using a Cobas C111 analyzer (Roche, Basel, Switzerland). The PBMCs were obtained by centrifugation in Ficoll (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 1500 rpm for 30 min. Phosphate-buffered saline (PBS) washes were performed, and viability was evaluated using trypan blue (0.04%) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A total of 5×10^5 PBMCs/well were cultured in sterile 24-well culture plates (clear, polystyrene, and flat bottom) (Corning, New York, NY, USA) with RPMI-1640 medium supplemented with L-glutamine, 1% of penicillin/streptomycin, and β-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 10% fetal bovine serum (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA).

2.4. Cell Proliferation Assays

For the cell proliferation assays, 5×10^5 PBMCs exposed to different treatments were labeled with CPDF-670 fluorophore (Cell Proliferation Dye eFluor, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA), which was used to monitor individual cell divisions by binding to any cellular protein containing primary amines; then, the dye was equally distributed among daughter cells, measured as a successive halving of the fluorescence intensity of the dye up to 6 generations [38]. Cells without monoclonal antibody stimulation and without treatment with NTZ formed the control treatment; cells treated with 100 μM NTZ formed the NTZ treatment; cells stimulated with 100 ng/mL of anti-CD3 (mouse IgG2a, clone OKT3) (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) and 500 ng/mL

of anti-CD28 antibodies (mouse IgG1, clone CD28.2) (BioLegend, San Diego, CA, USA) formed the Abs treatment; cells stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies treated with 100 μ M NTZ formed the Abs + NTZ treatment.

The NTZ concentration was selected based on research by Seong Keung Hong et al. [28] and our previous standardization of the methodology, in which we found similar effects between NTZ 100 μ M and higher concentrations. For the cell cultures, NTZ was dissolved as a 100 mM stock solution in dimethyl sulfoxide (DMSO), and titrations were made by 1:10 dilutions with PBS until reaching a concentration of 100 μ M. The final concentration of DMSO in culture media was less than 0.1%. Once the PBMCs were cultured, the anti-CD3 and anti-CD28 antibodies used for the stimulation of T cells and NTZ 100 μ M were added simultaneously. In the case of the different controls used in the study, only the NTZ or antibodies were added immediately after cultivating the PBMCs. Proliferation tests were performed in all the applied treatments. To ensure the activation of T cells through the stimulation system with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies (4 days or more) [39,40], and because miRNAs involved in an immune response are differentially expressed after T cell stimulation (3–7 days) [41], we selected 120 h of cell culture at 37 °C and 5% carbon dioxide (CO₂) in a humid atmosphere. The samples were measured and quantified by flow cytometry (FACS Aria, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) through the incorporation of the fluorophore CPDF-670. The cell viability assay was performed by staining and counting live or dead cells with trypan blue dye (0.04%) to evaluate the integrity of the cell membrane.

2.5. Cytokine Levels in Supernatants of Cell Cultures

Supernatants of all treated cell cultures were collected and concentrations of IL-1 β (900-K95), IL-2 (900-K12), IL-4 (900-K14), IL-6 (900-K16), IL-10 (900-K21), and IL-12 (900-K96) were determined by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) using commercial kits (PeproTech, Inc., Cranbury, NJ, USA), following the manufacturer's instructions.

2.6. RNA Isolation from PBMCs and miRNA Determination by RT-qPCR

The total RNA was extracted from PBMCs by the QIAzol method, following the manufacturer's protocol (QIAGEN, Hilden, Germany). The RNA concentration and purity were evaluated using a Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). The miR-155-5p and miR-146a-5p expressions were determined using an RT primer assay and hydrolysis probes (Applied Biosystems, CA, USA). The miRNAs were determined using a two-step RT-qPCR with an RT primer specific assay in combination with TaqMan probes (Applied Biosystems, CA, USA). Each RT reaction used 2.5 μ L (30 ng of RNA) from the 14 μ L eluted RNA using a TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, CA, USA). The miRNAs were detected and quantified using miRNA assays for miR-155-5p (assay ID 463509_mat, Applied Biosystems, CA, USA), miR-146a-5p (assay ID 001187, Applied Biosystems, CA, USA), and U6 as reference gene (assay ID 001973, Applied Biosystems, CA, USA); 1.5 μ L of RT reaction was amplified in 10 μ L reactions. PCR was performed using a LightCycler TM 480 II System (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) with a LightCycler 480 Probes Master kit (Roche Applied Science). The miRNA relative concentrations were normalized with the Ct values of U6, and values were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

2.7. Determination of M1 and M2 Monocyte/Macrophage Subpopulations by Flow Cytometry

For each patient, 1×10^5 of antibody-stimulated PBMCs (Abs), as well as those stimulated cells treated with NTZ (Abs NTZ) were cultured under the same conditions. After 120 h, cells were harvested and washed with supplemented PBS with 1% fetal bovine serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) and 0.1% sodium azide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and then stained with PE-Cy7 Mouse Anti-Human CD-14 (#557742), FITC Mouse Anti-Human CD-16 (#555406), and PE Mouse Anti-Human CD-163 (#556018) monoclonal antibodies (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

The expression of CD-163 was used to determine the presence of M2 or M1 populations. Unlabeled cells and isotype control antibodies were used as references (controls). Cell subpopulations were quantified on an FACS Aria cytometer (BD Biosciences), using FACS Diva software (BD Biosciences) and FlowJo 7.6.2 program (Three Star, Ashland, OR, USA).

2.8. Statistical Analysis

Data are expressed as median. Friedman's test followed by a Tukey's test were used for multiple sample analysis. Correlations between variables were determined by Pearson's test. $p < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analyzes were performed with the GraphPad Prism v7.0 (GraphPad Inc., La Jolla, CA, USA) and SPSS v15.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results

3.1. Description of the Population

The study population consisted of 38 women (76%) and 12 men (24%), with a median age of 53 years. According to the self-report questionnaire, the referred patients presented with the following: hypertension (56%), heart disease (20%), alcohol consumption (less than 21 standard drink units/week) (24%), frequent consumption of sugar and/or soft drinks (1000 mL minimum weekly) (50%), smoking (12%), moderate physical activity (3 to 6 MET) (58%), balanced diet (consistent 2000 kcal/day intake) (56%), and metformin as an antihyperglycemic treatment (84%).

At the blood sample collection, 45 (90%) patients (35 women and 10 men) were overweight or obese (body mass index ≥ 25.0 kg/m²) and 43 (86%) patients (35 women and 8 men) had an increased waist-to-hip ratio (>0.84 for women and >0.94 for men). According to the percentage of HbA1c and the American Diabetes Association (ADA) guidelines, 15 (30%) patients were controlled, and 35 (70%) patients were uncontrolled, with an average of 5.49% and 10.15%, respectively.

3.2. NTZ Inhibits CD3- and CD28-Induced T Cell Proliferation

As shown in Figure 1, the percentage of cell proliferation of antibody-stimulated cells treated with NTZ (Abs + NTZ) was three times lower as compared with the percentage found in the antibody-stimulated cells (antibodies) ($p < 0.0001$) and was similar to the control group.

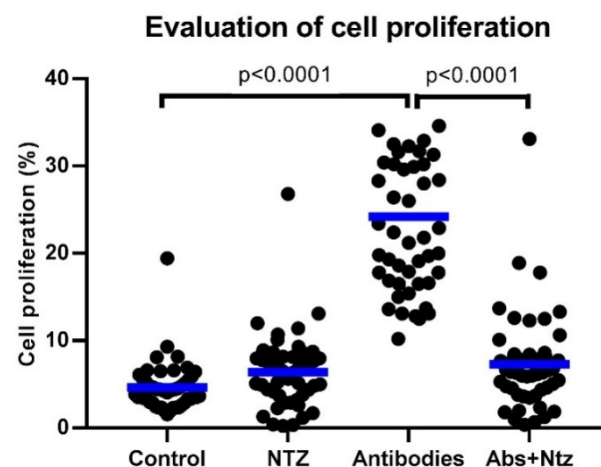


Figure 1. NTZ inhibits cell proliferation induced by anti-CD3 and anti-CD28 in PBMCs. Cell proliferation was evaluated after 5 days using CPDF-670 in PBMCs with RPMI-1640 cell media (Control), treated with NT Z100 μ M (NTZ), stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies (Antibodies), and antibodies plus NTZ (Abs + NTZ). The scattered dot plot shows individual measurements, and the bar represents the median. Friedman test for paired samples $p < 0.05$, Tukey's DHS post hoc, and exact p values for individual tests are shown.

Furthermore, cell viability was similar in all the evaluated conditions: control 91%, antibodies 95%, NTZ 87%, and Abs + NTZ 89%. Figure 2 shows the histograms of cell proliferation obtained by flow cytometry.

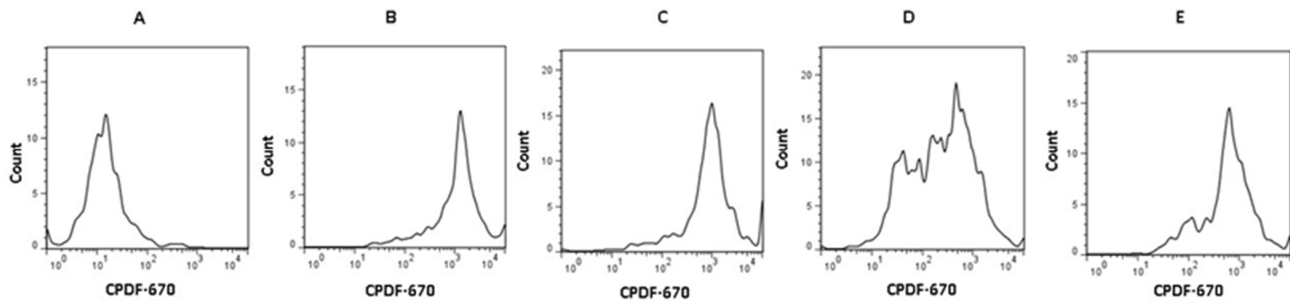


Figure 2. NTZ suppresses T cell proliferation. Histograms of flow cytometry analyses showing CPDF-670 unlabeled cells cultured in the absence of stimulus or treatments (A), CPDF-670 labeled PBMCs cultured without stimulus or treatments (B), following CPDF-670 labeled PBMCs with treatment NTZ 100 μ M (C), CPDF-670 labeled PBMCs and stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 (D), and CPDF-670 labeled PBMCs with CPDF-670 and PBMCs stimulated with antibodies anti-CD3, anti-CD28 and treatment with NTZ 100 μ M (E).

3.3. NTZ Lowers Proinflammatory Cytokines in PBMC Supernatants

As compared with the cytokine levels produced by cells without treatment (control), the cells treated with NTZ showed significant decreases in IL-1 β ($p = 0.0291$), IL-2 ($p = 0.0417$), and IL-6 ($p = 0.0320$) concentrations, while cells stimulated with antibodies showed significant increases in IL-2 ($p = 0.0155$), IL-6 ($p = 0.0462$), IL-10 ($p = 0.0318$), and IL-12 ($p = 0.0035$) concentrations. However, those increments were inhibited when antibody-stimulated cells were treated with NTZ (IL-2, $p < 0.0001$; IL-6, $p < 0.0001$; IL-10, $p < 0.0001$; and IL-12, $p = 0.0155$), re-establishing the concentration levels to those similarly detected in cells treated with only NTZ, demonstrating the inhibitory effects of NTZ on the production of cytokines induced by antibodies in PBMCs. Interestingly, concentrations of IL-4 were not altered by any treatment, while IL-1 β concentration levels were decreased with NTZ ($p = 0.0291$) and did not show changes when treated with antibodies or Abs + NTZ (Figure 3).

3.4. NTZ Downregulates miR-155-5p Expression in PBMCs

PBMCs treated with NTZ showed lower relative levels of miR-155-5p than unstimulated cells (control) ($p < 0.0001$). Conversely, PBMCs stimulated with antibodies showed higher levels of miR-155-5p expression as compared with the untreated cells (control) ($p = 0.0032$). Moreover, the downregulation of the relative expression of miR-155-5p was found in cells treated with antibodies plus NTZ (Abs + NTZ) as compared with PBMCs stimulated only with antibodies ($p < 0.0001$). The relative expression of miR-146a-5p did not show any differences between all evaluated conditions (Figure 4).

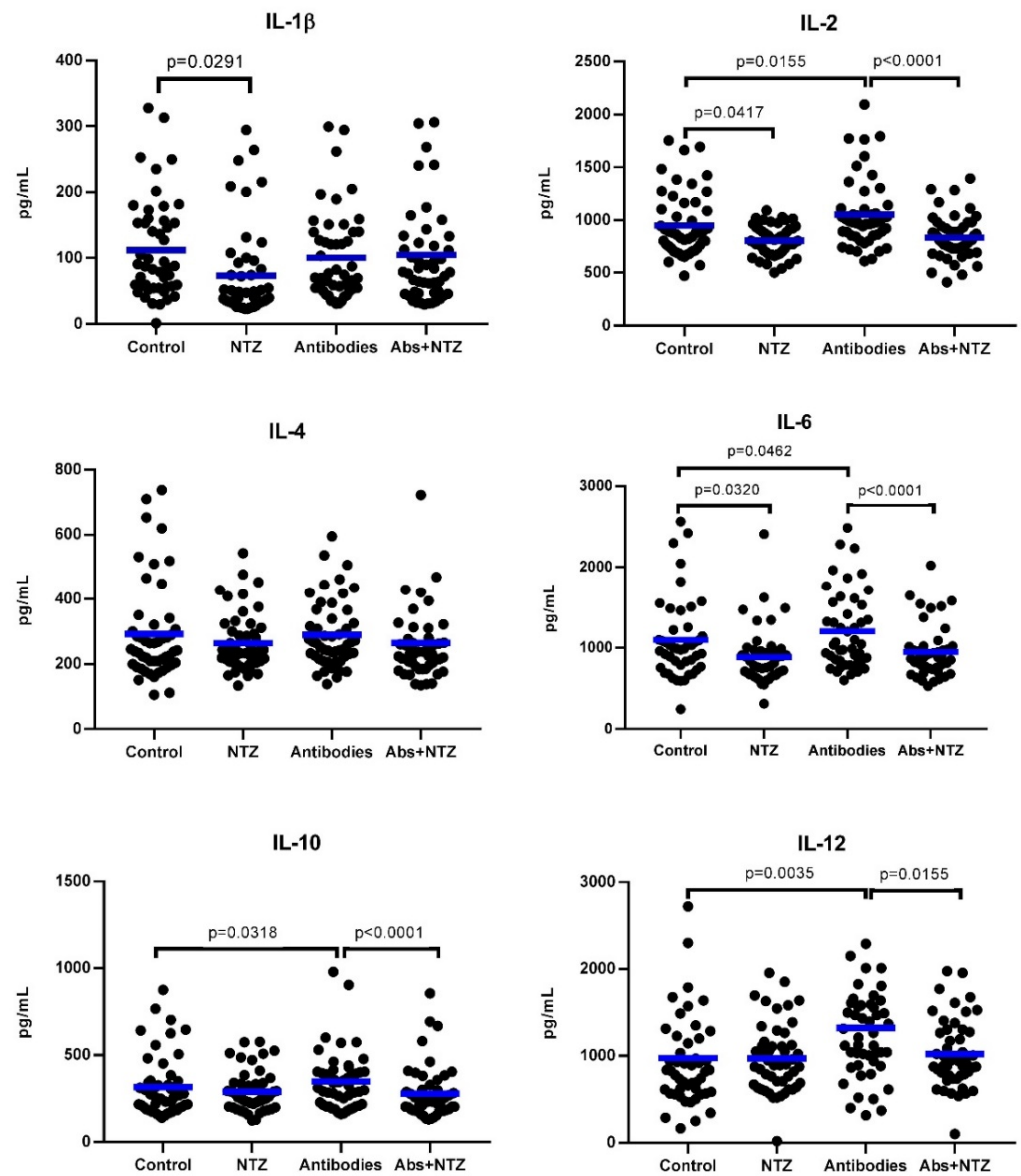


Figure 3. NTZ reduces levels of IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, and IL-12 cytokines in the PBMC cell supernatant. The measurement was made after 5 days of cell culture using the ELISA assay, and the cytokines were evaluated according to the type of treatment carried out on the PBMCs: cells with RPMI-1640 cell medium (Control), treated with NTZ 100 μ M (NTZ), stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies (Antibodies), and antibodies plus NTZ (Abs + NTZ). The scattered dot plot shows individual measurements, and the bar represents the median. Friedman's test for paired samples $p < 0.05$, Tukey's DHS post hoc, and exact p values for individual tests are shown.

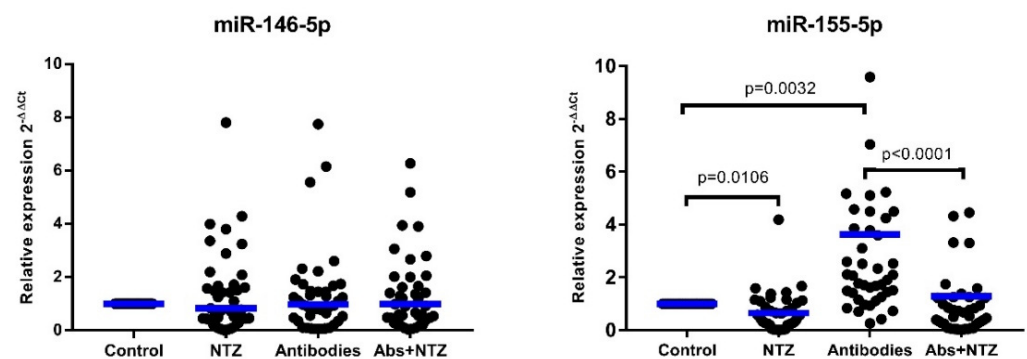


Figure 4. NTZ regulates the expression of miR-155-5p without causing changes in the expression of miR-146a-5p in PBMCs. Total RNA was extracted from PBMCs in culture cells by QIAzol method, and miRNAs were determined using two-step RT-qPCR with RT-primer specific assay in combination with TaqMan probes. The expression of miRNAs in PBMCs was performed by RT-qPCR using U6 as reference, miRNAs' relative concentrations were normalized with Ct values of U6, and values were calculated using $2^{-\Delta\Delta Ct}$ and $2^{-\Delta Ct}$ formulas. The evaluations carried out were cells with RPMI-1640 cell medium (Control), treated with 100 μ M NTZ, stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies, and Abs + NTZ. The scattered dot plot shows individual measurements, and the bar represents the mean. Friedman's test for paired samples $p < 0.05$, Tukey's DHS post hoc, and exact p values for individual tests are shown.

3.5. NTZ Lowers the M1/M2 Ratio in PBMCs Stimulated with Anti-CD3 and Anti-CD28

PBMCs stimulated with antibodies and treated with NTZ (Abs + NTZ) showed lower proinflammatory M1 monocytes/macrophages than cells stimulated only with antibodies ($p = 0.005$), in addition to a concomitant increase in those anti-inflammatory M2 monocytes/macrophages ($p = 0.007$), resulting in a significant decrease in the M1/M2 ratio (Abs vs. Abs + NTZ, $p < 0.001$) (Figures 5 and 6).

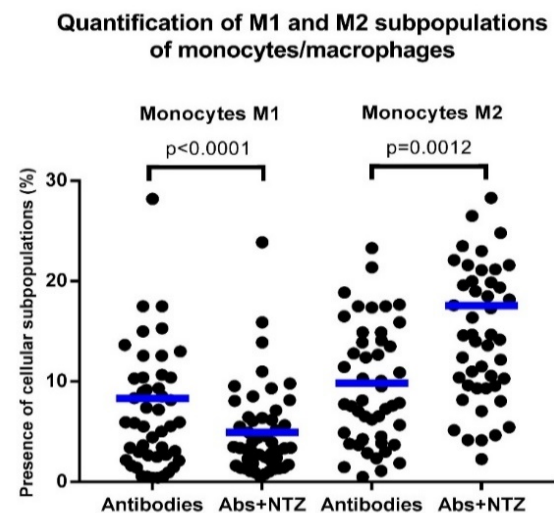


Figure 5. NTZ modifies the abundance M1 and M2 monocytes/macrophages. The quantification of proinflammatory M1 macrophages ($CD14^+$, $CD16^+$, and $CD163^-$) and anti-inflammatory M2 macrophages ($CD14^+$, $CD16^+$, and $CD163^+$) was made after 5 days of cell culture according to the type of treatment carried out on the PBMCs: cells stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies and Abs + NTZ. The scattered dot plot shows individual measurements, and the bar represents the mean. Friedman's test for paired samples $p < 0.05$, Tukey's DHS post hoc, and exact p values for individual tests are shown.

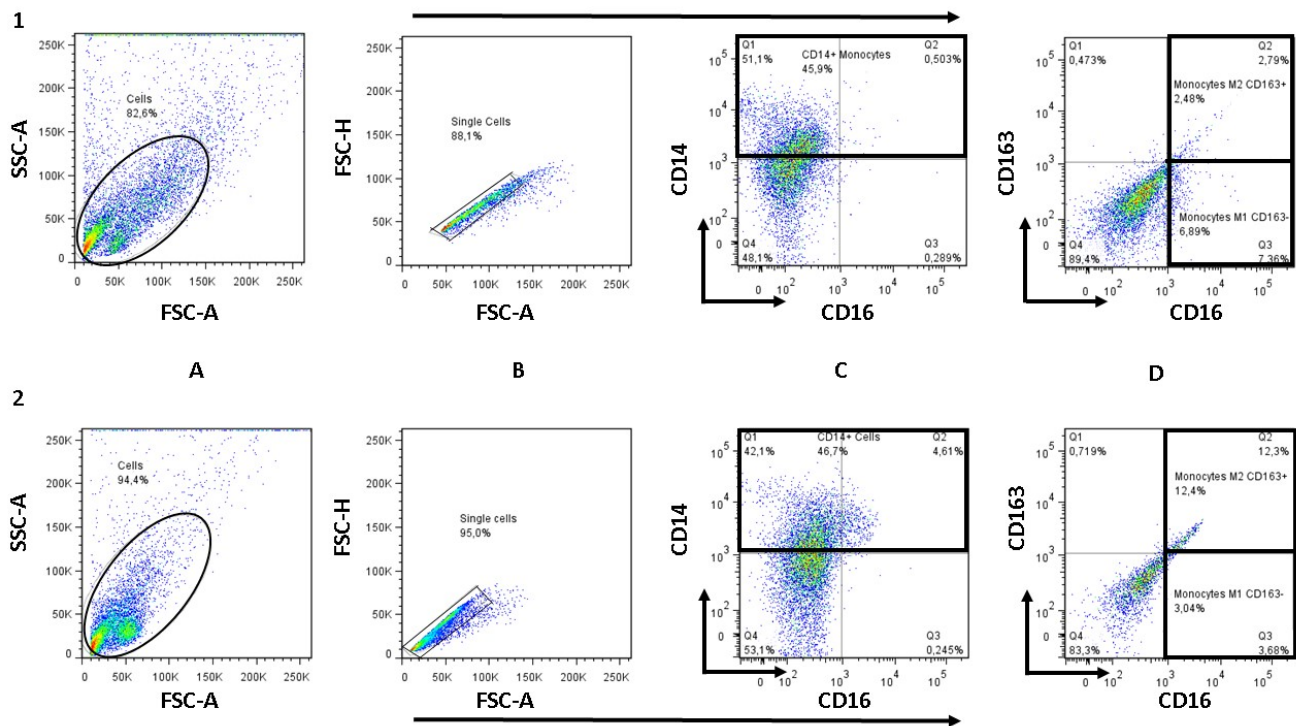


Figure 6. Strategy for the determination of monocytes/macrophages M1 and M2 by flow cytometry. (A) FSC (A) vs. SSC (A) plot: cells on forward scatter area/side scatter area plot. (B) FSC (A) vs. FSC (H): gating the cells that have an equal area and height: doublet exclusion gate. (C) CD16 vs. CD14 plot: gating to select monocytes based on their markers: selection of the CD14⁺ and CD16⁺ subpopulation gate. (D) CD16 vs. CD163 plot: gating to determine and quantify M1 (CD14⁺, CD16⁺, CD163⁻) and M2 (CD14⁺, CD16⁺, CD163⁺) monocytes/macrophages. For (A–D), the color represents cell density: from high density (red) to low density (blue). Sequence above: cells stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies (Antibodies). Sequence below: cells stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies and treated with 100 μ M NTZ (Abs + NTZ).

Regarding glycemic control, no significant changes were observed between controlled and uncontrolled patients with respect to the variables evaluated in this research.

4. Discussion

In the current study, we found evidence for repurposing NTZ as an immunomodulatory drug because it has been shown to exert immunomodulatory effects in PBMCs of patients with T2D which show high proinflammatory cytokines [42], as well as increase circulating proinflammatory T lymphocytes and alterations in their proliferative capacity as compared with healthy subjects [43]. Our main findings are that NTZ inhibited cell proliferation induced by anti-CD3 and anti-CD28 antibodies, reduced the concentration of proinflammatory cytokines in cell culture supernatants, negatively regulated the expression of miR-155-5p without causing changes in miR-146a-5p concentration levels, and decreased the M1/M2 ratio of monocytes/macrophages (Figure 7). It is important to mention that the selection of subjects for this study included consecutive, randomized, and willing-to-participate patients. It has been reported that women have a greater concern for their medical care, which led to significantly greater use of health services and visits to clinics and primary care services for diagnosis as compared with men [44,45], which would explain why considerably more women than men participated in the study.

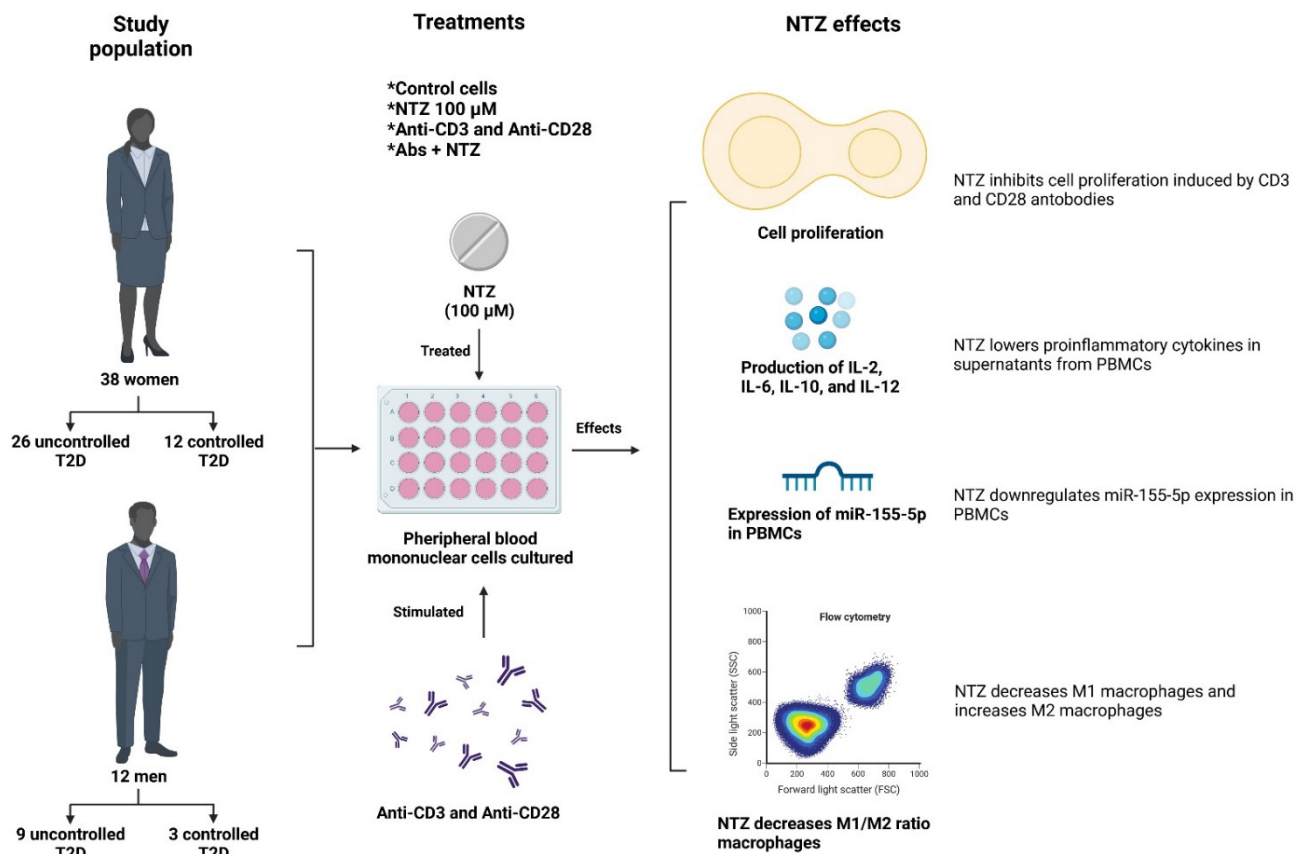


Figure 7. Nitazoxanide exerts immunomodulatory effects on peripheral blood mononuclear cells from type 2 diabetes patients. Fifty consecutive, randomized, and willing-to-participate patients with a clinical diagnosis of T2D without complications were selected [38]. Cells without monoclonal antibodies stimulation and without treatment with NTZ formed the control treatment; cells treated with 100 μ M NTZ formed the NTZ treatment; cells stimulated with anti-CD3/anti-CD28 antibodies formed the Antibodies treatment, cells stimulated with anti-CD3/anti-CD28 antibodies treated with 100 μ M NTZ formed the Abs + NTZ treatment. NTZ exerts an inhibitory effect on the cell proliferation of T cells stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies without modifying cell viability and significant decreases in the supernatant concentrations of cytokines IL-2, IL-6, IL-10, and IL-12. Furthermore, NTZ negatively regulates the relative expression of miR-155-5p without changes in miR-146a-5p. The M1/M2 ratio of monocytes/macrophages decreased the M1 and increased the M2 subpopulation by NTZ.

Although treatment with NTZ did not induce cytotoxic effects on PBMCs, it induced an inhibitory effect on cell proliferation. Cell viability and cell toxicity assays are both important tools for evaluating cellular responses to experimental compounds of interest [46,47]. Our results reinforce the findings described by Giacometti et al., who reported the absence of cytotoxicity by using different concentrations (1.6, 6.5, and 26 mmol/L) of NTZ (cytotoxicity from 8.9 to 11.2%) and NTZ together with antibiotics (cytotoxicity from 6.5 to 8.4%) in A-549 cell cultures [48]. Another study focused on evaluating NTZ cytotoxicity in cell lines of human glioblastoma (LN229, A172, and U87) and reported that concentrations of 1–20 μ g/mL resulted in cell viability greater than 90% [33]. Furthermore, it has been described that exposure to NTZ (100 μ M) in cultured HepG 2.2.15 cells did not induce cytotoxicity [49], indicating that this immunomodulatory effect of NTZ could be of clinical relevance. In our study, the immunomodulatory effect of NTZ was observed with a significant decrease in IL-2 levels with or without the stimuli of antibodies. This was expected because IL-2 is produced by activated T lymphocytes and is essential for growth, proliferation, differentiation, and survival of T cells. IL-2 is also crucial for the production of IL-6 for maintenance of the inflammatory process, inducing other cytokines synthesis also involved in T lymphocytes proliferation, independently of the expression/secretion

of the IL-2 gene [50]. Our findings also show that NTZ produced a significant decrease in the level of IL-6 supernatants from cultured PBMCs, while the concentration of IL-6 was re-established with antibodies.

IL-6 is a pleiotropic cytokine that is considered to be a biomarker of inflammation [51] and a therapeutic target for the treatment of T2D [52]; thus, it is possible that IL-6 may act in a similar way to IL-12, determining the differentiation of naive CD4 T cells toward effector cells [53]. NTZ has also been shown to limit increased IL-12 production induced with or without antibody stimulation. IL-6 deficiency has been reported to lead to IL-12 depletion, resulting in a reduction in the inflammatory response, necessary to provide proliferation and survival signals to murine CD4 + T cells through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway [54], which could explain the effect of NTZ on both cytokines [55]. In addition, IL-1 β is required as a T-cell-stimulating molecule for its activation and inflammation induction, although the mechanism has not yet been elucidated [56]. Our study found that NTZ reduced IL-1 β secretion in cell-culture PBMCs. With respect to anti-inflammatory cytokines, NTZ did not modify IL-4 levels, while it re-established IL-10 baseline levels in the antibody-stimulated PBMCs. Thus, it suggested that NTZ was not involved in Th2 polarization because NTZ did not modify IL-4 production by exposed PBMCs, possibly due to its inhibitory effects on IL-6 synthesis, depressed by the effects of NTZ. However, previous studies had demonstrated that IL-6 induced an upregulation of IL-4 after short preincubations (5 min) of T cells stimulated with anti-CD3/anti-CD28, whereas with longer preincubation periods with IL-6 (12 and 24 h), the effect on IL-4 production gradually disappeared [57], without inducing alterations in IL-4 levels, reinforcing the results obtained in this study.

It is worth mentioning that the IL-6 levels in the supernatant of antibody-stimulated PBMCs correlated positively with BMI ($r = 0.363$, $p = 0.001$) and with the waist/hip ratio ($r = 0.252$, $p = 0.007$). These results also support the notion that the secretion of IL-6 in obesity is proportional to the expansion of fat mass [58]. The immunomodulatory effects of NTZ on cytokine concentrations are relevant because individual cytokine modulators are frequently used for severe inflammatory diseases, such as tocilizumab (IL-6 inhibitor) in rheumatoid arthritis [59], daclizumab (IL-2 inhibitor) in multiple sclerosis [60], and anakinra (IL-1 inhibitor) in other autoimmune diseases [61]. According to our findings, NTZ could become a potential candidate for anti-inflammatory treatment.

T cells have important functions in an acquired immune response; miRNAs regulate this immune response by targeting the miRNAs of genes involved in T cell development, proliferation, differentiation, and function. The miRNA expression changes during T cell activation highlight that their function can be constrained by a specific spatiotemporal frame related to the signals that induce T-cell-based effector functions [41]. T cell activation is dependent on TCR and co-stimulatory molecules (such as CD28). After that, T cells proliferate vigorously, leading to clonal expansion; miR-155-5p and miR-146a-5p are involved in the regulation of T cell proliferation. Our findings show that NTZ significantly decreased the concentration of miR-155-5p expression in cultured PBMCs, while diminished at baseline, increased levels resulted when cells were stimulated with antibodies, suggesting a transcriptional activity of NTZ in the NF- κ B response. It is well known that miR-155-5p and miR-146a-5p are transcriptionally regulated by NF- κ B [62] and coordinate inflammation, resulting in a defined inflammatory response [21]. We also found that NTZ treatment did not modify the expression of miR-146a-5p. Recently, studies have reported a significant decrease in miR-146a-5p expression as well as an increase in miR-155-5p expression in the blood serum of patients with T2D [63,64], causing loss in the suppressive effects of the Treg cells as a consequence of STAT1 overexpression [65] without repression in the expression of IRAK1 and TRAF6, which are adapter kinases of essential pathways such as MyD88 [66] for the maintenance of inflammation. The results obtained in this study confirm the overexpression of miR-155-5p in T2D and that NTZ could modulate the effects of miR-155-5p in PBMCs by repressing inositol-polyphosphate 5-phosphatase1 (SHIP1) or via the suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1), attenuating the activity of NF- κ B

and avoiding a proliferative state, which are crucial in the development of the immune response [67] and in the synthesis of immune effector molecules, e.g., cytokines. However, the molecular targets of NTZ related to the expression of miR-155-5p have not yet been elucidated.

Several studies have provided compelling evidence that microRNAs play pivotal roles in modulating macrophage activation, polarization, tissue infiltration, and resolution of inflammation and form a complex network that exerts widespread regulation of inflammatory pathways by targeting multiple components of the TLR signaling pathway and thus affects the profile of downstream-induced inflammatory cytokines [68]. The above-mentioned studies have shown that an increase in the expression of miR-155-5p promoted polarization toward M1 macrophages while that of miR-146a-5p induced polarization toward M2 macrophages in murine and human by targeting various transcription factors and adapter proteins involved in IRF/STAT pathways [69]. This is important because treatments that act on miRNAs and that modulate macrophage polarization may have therapeutic potential in the treatment of inflammatory diseases. For the determination of M1 and M2 monocyte/macrophage subpopulations, CD163 can be used as a differential marker, which is expressed on the cell surface of activated monocytes/macrophages, exerting anti-inflammatory functions such as IL-10 production [70,71], and is cleaved from its surface in response to inflammatory stimuli (M1 macrophages) [72], suggesting that it could be used as a biomarker of meta-inflammation [73]. Interestingly, NTZ likely exerts immunomodulatory effects by decreasing the M1 proinflammatory subpopulation and increasing the M2 anti-inflammatory subpopulation of monocytes/macrophages, influencing, importantly, the M1/M2 ratio balance in favor of limiting the inflammatory process developed in T2D. Related to this result, peripheral blood monocytes from obese patients with T2D, as reported previously, were less susceptible to differentiating into an alternative phenotype, therefore contributing to a dysregulated and persistent inflammatory condition [74]. Our study revealed that NTZ could regulate the differentiation and activity of the M1 and M2 macrophages. The above is important because the development of M2 macrophages depends on the STAT-6 transcription factor [75], favoring glucose tolerance and reducing meta-inflammation [76], possibly being a therapeutic target of NTZ, and therefore more related studies are needed.

NTZ has been proposed to be an agonist of PPAR- γ receptors, with agonistic post-transcriptional effects capable of improving the glycemic profile in T2D [29]. Previously, Diana Kovács et al. (2013) used the unidimensional drug profile matching (oDPM) method to find possible PPAR γ agonists [77]. It is worth mentioning that it is also possible that additional independent mechanisms of PPARs allow NTZ to exert its immunomodulatory effects.

In addition, the pharmacokinetics of NTZ reveal that its metabolite could reach a C_{max} of 1.9 mg/L (7.1 mM) [27,78]; therefore, the 0.1 mM concentration used in our experiment could be easily reachable in the blood following drug administration, a result that is relevant for the evaluation of its effect as an immunomodulatory agent in *in vivo* models.

5. Conclusions

NTZ is positioned as a new approach for the treatment of T2D by regulating important immune functions. Our findings reveal the potential immunomodulatory and anti-inflammatory effects of NTZ by inhibiting cell proliferation, significantly reducing the serum levels of proinflammatory cytokines, decreasing the expression of miR-155-5p, and regulating the M1/M2 ratio balance in monocytes/macrophages. However, more studies are needed to reveal additional immunomodulatory effects of NTZ as well as its potential targets. These findings suggest alternative therapeutic benefits that could contribute to the future repositioning of NTZ, given the importance of the necessity for an immune-regulatory and adjuvant drug for treating T2D and other chronic and inflammatory diseases.

Author Contributions: Conceptualization, M.C.-S., G.B.-F. and G.N.-V.; methodology, M.C.-S., G.B.-F., C.M.-C., C.T.-J., S.G.-J., R.S.d.V. and F.S.-M.; software M.C.-S., C.M.-C. and A.H.-D.; validation, M.C.-S., G.N.-V., F.S.-M., G.B.-F. and R.S.d.V.; formal analysis, M.C.-S., F.S.-M., C.M.-C. and A.H.-D.; investigation, M.C.-S., G.B.-F., F.S.-M. and G.N.-V.; resources, G.B.-F., C.M.-C., S.G.-J., R.S.d.V. and F.S.-M.; data curation, M.C.-S., G.B.-F., A.H.-D. and F.S.-M.; writing—original draft preparation, M.C.-S., G.B.-F., R.S.d.V. and G.N.-V.; writing—review and editing, M.C.-S., G.B.-F., R.S.d.V., G.N.-V., A.H.-D. and F.S.-M.; visualization, M.C.-S., G.B.-F., R.S.d.V. and F.S.-M.; supervision, G.B.-F., R.S.d.V. and F.S.-M.; project administration, G.B.-F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received financial support from a scholarship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 473485) was received by Mauricio Castillo-Salazar. The costs of cell cultures were covered by Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Finally, the costs of RT-qPCR experiments were covered by the Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the Instituto Nacional de Cardiología (Protocol No. 29-1183).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: Castillo-Salazar M. received a Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. (CONACYT, Mexico) scholarship (473485) to carry out Doctoral studies. The authors thank Pharmacy Faculty, UAEM, and Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chavez” for providing some research supplies for this study. Investigation was taken in part from the Ph.D. thesis of M.C.-S.

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationship that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. Zhang, C.; Xiao, C.; Wang, P.; Xu, W.; Zhang, A.; Li, Q.; Xu, X. The alteration of Th1/Th2/Th17/Treg paradigm in patients with type 2 diabetes mellitus: Relationship with diabetic nephropathy. *Hum. Immunol.* **2014**, *75*, 289–296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Saeedi, P.; Petersohn, I.; Salpea, P.; Malanda, B.; Karuranga, S.; Unwin, N.; Colagiuri, S.; Guariguata, L.; Motala, A.A.; Ogurtsova, K.; et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2019**, *157*. [[CrossRef](#)]
3. Caballero, A.E. Endothelial dysfunction, inflammation, and insulin resistance: A focus on subjects at risk for type 2 diabetes. *Curr. Diabetes Rep.* **2004**, *4*, 237–246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Pickup, J.C. Inflammation and Activated Innate Immunity in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **2004**, *27*, 813–823. [[CrossRef](#)]
5. Kintscher, U.; Hartge, M.; Hess, K.; Foryst-Ludwig, A.; Clemenz, M.; Wabitsch, M.; Fischer-Posovszky, P.; Barth, T.F.E.; Dragun, D.; Skurk, T.; et al. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: A primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2008**, *28*, 1304–1310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Berbudi, A.; Rahmadika, N.; Tjahjadi, A.I.; Ruslami, R. Type 2 Diabetes and its Impact on the Immune System. *Curr. Diabetes Rev.* **2019**, *16*, 442–449. [[CrossRef](#)]
7. Xia, C.; Rao, X.; Zhong, J. Role of T Lymphocytes in Type 2 Diabetes and Diabetes-Associated Inflammation. *J. Diabetes Res.* **2017**, *2017*, 6494795. [[CrossRef](#)]
8. Francisco, C.O.; Catai, A.M.; Moura-Tonello, S.C.G.; Arruda, L.C.M.; Lopes, S.L.B.; Benze, B.G.; Del Vale, A.M.; Malmegrim, K.C.R.; Leal, A.M.O. Cytokine profile and lymphocyte subsets in type 2 diabetes. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2016**, *49*. [[CrossRef](#)]
9. Nyambuya, T.M.; Dlodla, P.V.; Nkambule, B.B. T cell activation and cardiovascular risk in type 2 diabetes mellitus: A protocol for a systematic review and meta-analysis. *Syst. Rev.* **2018**, *7*, 167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Dandona, P.; Aljada, A.; Bandyopadhyay, A. Inflammation: The link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol.* **2004**, *25*, 4–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Baltimore, D.; Boldin, M.P.; O’Connell, R.M.; Rao, D.S.; Taganov, K.D. MicroRNAs: New regulators of immune cell development and function. *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 839–845. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Lumeng, C.N.; Bodzin, J.L.; Saltiel, A.R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 175–184. [[CrossRef](#)]
13. Makki, K.; Froguel, P.; Wolowczuk, I. Adipose Tissue in Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance: Cells, Cytokines, and Chemokines. *ISRN Inflamm.* **2013**, *2013*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

14. Chawla, A.; Nguyen, K.D.; Goh, Y.P.S. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2011**, *11*, 738–749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Donath, M.Y.; Shoelson, S.E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2011**, *11*, 98–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Caspar-Bauguil, S.; Cousin, B.; Galinier, A.; Segafredo, C.; Nibbelink, M.; André, M.; Casteilla, L.; Pénicaud, L. Adipose tissues as an ancestral immune organ: Site-specific change in obesity. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 3487–3492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Ouchi, N.; Parker, J.L.; Lugus, J.J.; Walsh, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2011**, *11*, 85–97. [[CrossRef](#)]
18. Kloosterman, W.P.; Plasterk, R.H.A. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev. Cell* **2006**, *11*, 441–450. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Raisch, J.; Darfeuille-Michaud, A.; Nguyen, H.T.T. Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer. *World J. Gastroenterol.* **2013**, *19*, 2985–2996. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Mehta, A.; Baltimore, D. MicroRNAs as regulatory elements in immune system logic. *Nat. Rev. Immunol.* **2016**, *16*, 279–294. [[CrossRef](#)]
21. Mann, M.; Mehta, A.; Zhao, J.L.; Lee, K.; Marinov, G.K.; Garcia-Flores, Y.; Baltimore, D. An NF- κ B-microRNA regulatory network tunes macrophage inflammatory responses. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 851. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Testa, U.; Pelosi, E.; Castelli, G.; Labbaye, C. miR-146 and miR-155: Two key modulators of immune response and tumor development. *Non-Coding RNA* **2017**, *3*, 22. [[CrossRef](#)]
23. Pushpakom, S.; Iorio, F.; Eyers, P.A.; Escott, K.J.; Hopper, S.; Wells, A.; Doig, A.; Williams, T.; Latimer, J.; McNamee, C.; et al. Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *18*, 41–58. [[CrossRef](#)]
24. Hemphill, A.; Mueller, J.; Esposito, M. Nitazoxanide, a broad-spectrum thiazolide anti-infective agent for the treatment of gastrointestinal infections. *Expert Opin. Pharmacother.* **2006**, *7*, 953–964. [[CrossRef](#)]
25. Singh, N.; Narayan, S. Nitazoxanide: A broad spectrum antimicrobial. *Med. J. Armed Forces India* **2011**, *67*, 67–68. [[CrossRef](#)]
26. Rossignol, J.F. Nitazoxanide: A first-in-class broad-spectrum antiviral agent. *Antiviral Res.* **2014**, *110*, 94–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Shou, J.; Wang, M.; Cheng, X.; Wang, X.; Zhang, L.; Liu, Y.; Fei, C.; Wang, C.; Gu, F.; Xue, F.; et al. Nitazoxanide induces autophagy by inhibiting PI3K/Akt/mTOR pathway in RAW264.7 macrophage cells. *Arch. Pharm. Res.* **2020**, *43*, 257–270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Hong, S.K.; Kim, H.J.; Song, C.S.; Choi, I.S.; Lee, J.B.; Park, S.Y. Nitazoxanide suppresses IL-6 production in LPS-stimulated mouse macrophages and TG-injected mice. *Int. Immunopharmacol.* **2012**, *13*, 23–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Elaidy, S.M.; Hussain, M.A.; El-Kherbetawy, M.K. Time-dependent therapeutic roles of nitazoxanide on high-fat diet/streptozotocin-induced diabetes in rats: Effects on hepatic peroxisome proliferator-activated receptor- γ receptors. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2018**, *96*, 485–497. [[CrossRef](#)]
30. Mahmoud, D.B.; Shitu, Z.; Mostafa, A. Drug repurposing of nitazoxanide: Can it be an effective therapy for COVID-19? *J. Genet. Eng. Biotechnol.* **2020**, *18*, 35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Glisoni, R.J.; Sosnik, A. Encapsulation of the antimicrobial and immunomodulator agent nitazoxanide within polymeric micelles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2014**, *14*, 4670–4682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Nitazoxanide | C12H9N3O5S. Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nitazoxanide> (accessed on 8 December 2020).
33. Malesuik, M.D.; Gonalves, H.M.L.; Garcia, C.V.; Trein, M.R.; Nardi, N.B.; Schapoval, E.E.S.; Steppe, M. Identification, characterization and cytotoxicity in vitro assay of nitazoxanide major degradation product. *Talanta* **2012**, *93*, 206–211. [[CrossRef](#)]
34. Abbasalipourkabir, R.; Fallah, M.; Sedighi, F.; Maghsood, A.H.; Javid, S. Nanocapsulation of nitazoxanide in solid lipid nanoparticles as a new drug delivery system and in vitro release study. *J. Biol. Sci.* **2016**, *16*, 120–127. [[CrossRef](#)]
35. Bhalerao, S.; Kadam, P. Sample size calculation. *Int. J. Ayurveda Res.* **2010**, *1*, 55. [[CrossRef](#)]
36. Guzmán-Flores, J.M.; Ramírez-Emiliano, J.; Pérez-Vázquez, V.; López-Briones, S. Th17 and regulatory T cells in patients with different time of progression of type 2 diabetes mellitus. *Cent. J. Immunol.* **2020**, *45*, 29–36. [[CrossRef](#)]
37. Guzman-Flores, J.M.; Cortez-Espinosa, N.; Cortés-García, J.D.; Vargas-Morales, J.M.; Cataño-Cañizalez, Y.G.; Rodríguez-Rivera, J.G.; Portales-Perez, D.P. Expression of CD73 and A2A receptors in cells from subjects with obesity and type 2 diabetes mellitus. *Immunobiology* **2015**, *220*, 976–984. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. eBioscience™ Cell Proliferation Dye eFluor™ 670. Available online: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/65-0840-85> (accessed on 22 November 2021).
39. Trickett, A.; Kwan, Y.L. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *J. Immunol. Methods* **2003**, *275*, 251–255. [[CrossRef](#)]
40. Riddell, S.R.; Greenberg, P.D. The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells. *J. Immunol. Methods* **1990**, *128*, 189–201. [[CrossRef](#)]
41. Rodríguez-Galán, A.; Fernández-Messina, L.; Sánchez-Madrid, F. Control of immunoregulatory molecules by miRNAs in T cell activation. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2148. [[CrossRef](#)]
42. Jagannathan-Bogdan, M.; McDonnell, M.E.; Shin, H.; Rehman, Q.; Hasturk, H.; Apovian, C.M.; Nikolajczyk, B.S. Elevated Proinflammatory Cytokine Production by a Skewed T Cell Compartment Requires Monocytes and Promotes Inflammation in Type 2 Diabetes. *J. Immunol.* **2011**, *186*, 1162–1172. [[CrossRef](#)]

43. Mahabadi-Ashtiyani, E.; Sheikh, V.; Borzouei, S.; Salehi, I.; Alahgholi-Hajibehzad, M. The increased T helper cells proliferation and inflammatory responses in patients with type 2 diabetes mellitus is suppressed by sitagliptin and vitamin D3 in vitro. *Inflamm. Res.* **2019**, *68*, 857–866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Redondo-Sendino, A.; Guallar-Castillón, P.; Banegas, J.R.; Rodríguez-Artalejo, F. Gender differences in the utilization of health care. *BMC Public Health* **2006**, *6*, 155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Wexler, D.J.; Grant, R.W.; Meigs, J.B.; Nathan, D.M.; Cagliero, E. Sex disparities in treatment of cardiac risk factors in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **2005**, *28*, 514–520. [[CrossRef](#)]
46. Borra, R.C.; Lotufo, M.A.; Gaglioti, S.M.; de Mesquita Barros, F.; Andrade, P.M. A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. *Braz. Oral Res.* **2009**, *23*, 255–262. [[CrossRef](#)]
47. Adan, A.; Kiraz, Y.; Baran, Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2016**, *17*, 1213–1221. [[CrossRef](#)]
48. Giacometti, A.; Cirioni, O.; Barchiesi, F.; Ancarani, F.; Scalise, G. Activity of nitazoxanide alone and in combination with azithromycin and rifabutin against *Cryptosporidium parvum* in cell culture. *J. Antimicrob. Chemother.* **2000**, *45*, 453–456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Hu, Y.; Zhu, W.; Tang, G.; Mayweg, A.V.; Yang, G.; Wu, J.Z.; Shen, H.C. Novel Therapeutics in Discovery and Development for Treatment of Chronic HBV Infection. *Ann. Rep. Med. Chem.* **2013**, *48*, 265–281. [[CrossRef](#)]
50. Lotz, M.; Jirik, F.; Kabouridis, P.; Tsoukas, C.; Hirano, T.; Kishimoto, T.; Carson, D.A. B cell stimulating factor 2/interleukin 6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **1988**, *167*, 1253–1258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Vainer, N.; Dehlanderoff, C.; Johansen, J.S. Systematic literature review of IL-6 as a biomarker or treatment target in patients with gastric, bile duct, pancreatic and colorectal cancer. *Oncotarget* **2018**, *9*, 29820–29841. [[CrossRef](#)]
52. Unver, N.; McAllister, F. IL-6 family cytokines: Key inflammatory mediators as biomarkers and potential therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2018**, *41*, 10–17. [[CrossRef](#)]
53. Rincón, M.; Anguita, J.; Nakamura, T.; Fikrig, E.; Flavell, R.A. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* **1997**, *185*, 461–469. [[CrossRef](#)]
54. Yoo, J.K.; Cho, J.H.; Lee, S.W.; Sung, Y.C. IL-12 Provides Proliferation and Survival Signals to Murine CD4 + T Cells Through Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathway. *J. Immunol.* **2002**, *169*, 3637–3643. [[CrossRef](#)]
55. Leal, I.S.; Smedegård, B.; Andersen, P.; Appelberg, R. Interleukin-6 and interleukin-12 participate in induction of a type 1 protective T-cell response during vaccination with a tuberculosis subunit vaccine. *Infect. Immun.* **1999**, *67*, 5747–5754. [[CrossRef](#)]
56. Nambu, A.; Nakae, S.; Iwakura, Y. IL-1 β , but not IL-1 α , is required for antigen-specific T cell activation and the induction of local inflammation in the delayed-type hypersensitivity responses. *Int. Immunol.* **2006**, *18*, 701–712. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Heijink, I.H.; Vellenga, E.; Borger, P.; Postma, D.S.; De Monchy, J.G.R.; Kauffman, H.F. Interleukin-6 promotes the production of interleukin-4 and interleukin-5 by interleukin-2-dependent and -independent mechanisms in freshly isolated human T cells. *Immunology* **2002**, *107*, 316–324. [[CrossRef](#)]
58. Khaodhiar, L.; Ling, P.R.; Blackburn, G.L.; Bistran, B.R. Serum levels of interleukin-6 and C-reactive protein correlate with body mass index across the broad range of obesity. *J. Parenter. Enter. Nutr.* **2004**, *28*, 410–415. [[CrossRef](#)]
59. Kaneko, A. Tocilizumab in rheumatoid arthritis: Efficacy, safety and its place in therapy. *Ther. Adv. Chronic Dis.* **2013**, *4*, 15–21. [[CrossRef](#)]
60. Bielekova, B. Daclizumab therapy for multiple sclerosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2019**, *9*, a034470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Cavalli, G.; Dinarello, C.A. Anakinra therapy for non-cancer inflammatory diseases. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 1157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Taganov, K.D.; Boldin, M.P.; Chang, K.J.; Baltimore, D. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 12481–12486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Baldeón R, L.; Weigelt, K.; de Wit, H.; Ozcan, B.; van Oudenaren, A.; Sempértegui, F.; Sijbrands, E.; Grosse, L.; Freire, W.; Drexhage, H.A.; et al. Decreased Serum Level of miR-146a as Sign of Chronic Inflammation in Type 2 Diabetic Patients. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e115209. [[CrossRef](#)]
64. Mensà, E.; Giuliani, A.; Matakchione, G.; Gurău, F.; Bonfigli, A.R.; Romagnoli, F.; De Luca, M.; Sabbatinelli, J.; Olivieri, F. Circulating miR-146a in healthy aging and type 2 diabetes: Age- and gender-specific trajectories. *Mech. Ageing Dev.* **2019**, *180*, 1–10. [[CrossRef](#)]
65. Lu, L.F.; Boldin, M.P.; Chaudhry, A.; Lin, L.L.; Taganov, K.D.; Hanada, T.; Yoshimura, A.; Baltimore, D.; Rudensky, A.Y. Function of miR-146a in Controlling Treg Cell-Mediated Regulation of Th1 Responses. *Cell* **2010**, *142*, 914–929. [[CrossRef](#)]
66. Hou, J.; Wang, P.; Lin, L.; Liu, X.; Ma, F.; An, H.; Wang, Z.; Cao, X. MicroRNA-146a Feedback Inhibits RIG-I-Dependent Type I IFN Production in Macrophages by Targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. *J. Immunol.* **2009**, *183*, 2150–2158. [[CrossRef](#)]
67. O’Connell, R.M.; Taganov, K.D.; Boldin, M.P.; Cheng, G.; Baltimore, D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 1604–1609. [[CrossRef](#)]
68. Curtale, G.; Rubino, M.; Locati, M. MicroRNAs as molecular switches in macrophage activation. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Essandoh, K.; Li, Y.; Huo, J.; Fan, G.C. MiRNA-mediated macrophage polarization and its potential role in the regulation of inflammatory response. *Shock* **2016**, *46*, 122–131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Buechler, C.; Ritter, M.; Orsó, E.; Langmann, T.; Klucken, J.; Schmitz, G. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and anti-inflammatory stimuli. *J. Leukoc. Biol.* **2000**, *67*, 97–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

71. Moniuszko, M.; Bodzenta-Lukaszyk, A.; Kowal, K.; Lenczewska, D.; Dabrowska, M. Enhanced frequencies of CD14⁺⁺CD16⁺, but not CD14⁺CD16⁺, peripheral blood monocytes in severe asthmatic patients. *Clin. Immunol.* **2009**, *130*, 338–346. [[CrossRef](#)]
72. Thomsen, J.H.; Etzerodt, A.; Svendsen, P.; Moestrup, S.K. The haptoglobin-cd163-heme oxygenase-1 pathway for hemoglobin scavenging. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, *2013*, 523652. [[CrossRef](#)]
73. Kawarabayashi, R.; Motoyama, K.; Nakamura, M.; Yamazaki, Y.; Morioka, T.; Mori, K.; Fukumoto, S.; Imanishi, Y.; Shioi, A.; Shoji, T.; et al. The Association between Monocyte Surface CD163 and Insulin Resistance in Patients with Type 2 Diabetes. *J. Diabetes Res.* **2017**, *2017*, 6549242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Bories, G.; Caiazzo, R.; Derudas, B.; Copin, C.; Raverdy, V.; Pigeyre, M.; Pattou, F.; Staels, B.; Chinetti-Gbaguidi, G. Impaired alternative macrophage differentiation of peripheral blood mononuclear cells from obese subjects. *Diabetes Vasc. Dis. Res.* **2012**, *9*, 189–195. [[CrossRef](#)]
75. Ricardo-Gonzalez, R.R.; Eagle, A.R.; Odegaard, J.I.; Jouihan, H.; Morel, C.R.; Heredia, J.E.; Mukundan, L.; Wu, D.; Locksley, R.M.; Chawla, A. IL-4/STAT6 immune axis regulates peripheral nutrient metabolism and insulin sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 22617–22622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Wu, D.; Molofsky, A.B.; Liang, H.E.; Ricardo-Gonzalez, R.R.; Jouihan, H.A.; Bando, J.K.; Chawla, A.; Locksley, R.M. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science* **2011**, *332*, 243–247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Kovács, D.; Simon, Z.; Hári, P.; Málnási-Csizmadia, A.; Hegedus, C.; Drimba, L.; Németh, J.; Sári, R.; Szilvássy, Z.; Peitl, B. Identification of PPAR γ ligands with one-dimensional drug profile matching. *Drug Des. Dev. Ther.* **2013**, *7*, 917–928. [[CrossRef](#)]
78. Stockis, A.; Deroubaix, X.; Lins, R.; Jeanbaptiste, B.; Calderon, P.; Rossignol, J.F. Pharmacokinetics of nitazoxanide after single oral dose administration in 6 healthy volunteers. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **1996**, *34*, 349–351. [[PubMed](#)]

**VOTO APROBATORIO PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Mauricio Castillo Salazar

Título de la tesis: “Caracterización del efecto inmunomodulador de nitazoxanida en el proceso inflamatorio de pacientes con DM2”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Samuel Enoch Estrada Soto

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:
La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto

Firma del miembro del jurado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO | Fecha:2022-04-05 22:00:01 | Firmante

uVlv3Mt6nWZ9Qx+0T0lLdPJbyxEv3eh+OiTX2QPwO/7iRnOPBdr0A7QgkUdG1T5W45RQZFd1WTFkPW4t/HkqTckYyTGxc2hu3G1k9RPM8WjllKmnEa9nkyzONrZJCAhPoVfy/YJZC9WDn0zLA4DM9vEkrPfkXsrzVGZMzF/F2p/UVTw7M3UeNAALI7ugwudvKMz1+DCRS06vGiqmja8gwTf4EvtB3kwBdCWmWibokfghXTQpKTHtDbqk0j/h3lNCF1rzGmmofzMWTX7UlyZuXW7get3KO0qnFTgnE3ef1wXobzz6ia/PvDxV/854ll60DIDJBJtJvZe4bfxi107yZA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



B1mHo3th0

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/hcAGh7Ddd5yJk0FNGqNgSIZ1AGzhhw8T>



**VOTO APROBATORIO PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Mauricio Castillo Salazar

Título de la tesis: “Caracterización del efecto inmunomodulador de nitazoxanida en el proceso inflamatorio de pacientes con DM2”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Cairo David Toledano Jaimes

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:
La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Dr. Cairo David Toledano Jaimes

Firma del miembro del jurado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

CAIRO DAVID TOLEDANO JAIMES | Fecha:2022-04-05 18:59:50 | Firmante

emQZHJh121LdD+vSlmYFRdjvxf+niRx+NUHcKEnqwcz8QE+jql44mtLSMM4ExBhESZepY6tJRD8A7E+Qlp99gzEiSNOOsSzmMqzPuWbkkF79UOoXivVA+2rDPsiNv0e67flzaiK
mVaVqYAYLyKgEd7TnlngNGNrEQXWYyESUrfGj3S5DHFT6B39paUYaroulrlwbydpka6icBZ3kDntpAh5McQAlpPz6MXwY/1S/bmlwEU28bXKIUgIh+nIVVfOp8175m3tuteBDHHR6x
joNI2VnmDqviWE8JwD1eXm0QoO40POWZypiJzwEJ6Ad3L4KIM2ISQ3XE9zXmqHIJFctg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



8xjBHqn9l

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/BkRkuMUwZsmPhd1nNQNYDedIWRf6N1wH>



**VOTO APROBATORIO PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Mauricio Castillo Salazar

Título de la tesis: “Caracterización del efecto inmunomodulador de nitazoxanida en el proceso inflamatorio de pacientes con DM2”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: **Dr. Fausto Sánchez Muñoz**

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:
La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Dr. Fausto Sánchez Muñoz

Firma del miembro del jurado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

FAUSTO SÁNCHEZ MUÑOZ | Fecha:2022-04-05 18:20:07 | Firmante

FyWSbB/VcW33FCRRdAaUuyMpBLFrEuPFIQ76CKMP4ihLVmjaKcXtN5C2P8OmeRARBF9+przKIjBN/R2jxRJ4mns47ZsIYPRbxDxWLPNaKqUD8eQRhRjBLiNLCvaT4JjCif5rUJ71oROIUjwi88HYVdf1D/BWBb1z8NHHS1SEZF04hqZfitKG3a/QfU7T7w+6N/kvXfNIV959IGUQy68MPH2RsNHHK1MIsCnF2+sdnUt2fAX+jMEpXTrLfCA3uLjpswL/UyfUZd2hbVEipRr9j8jqwbsh5RzXcWY2cSIL8UylysXavIMuXurLdrCOBtEGdaWZuOjPGH0V6Gnt2dAQoA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[rtMoCPDbE](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/7ISdQ94dgOe6HAzk9FgM58QIHSZRbMx>



**VOTO APROBATORIO PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Mauricio Castillo Salazar

Título de la tesis: “Caracterización del efecto inmunomodulador de nitazoxanida en el proceso inflamatorio de pacientes con DM2”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. María de Lourdes Rodríguez Fragoso

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:
La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Dra. María de Lourdes Rodríguez Fragoso

Firma del miembro del jurado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA DE LOURDES RODRIGUEZ FRAGOSO | Fecha:2022-04-05 18:01:39 | Firmante

FLQ8pOcT+ErO8cpv4zFtr2hCf2IXExXkj8C128Z/vkLppcRjGVy6qhwTslBjDG0k3h9OviQgulhc/Ly3q6K3r8ikjYcGh1wY4m+mOQpFn2uymctmR2AnQV6wtkxkCyLwnpaTZs4DKB2V8xNFRcWjbeeNxByBXnadFi1goFUeoRJ1sZ1LWEyKoE1GRk1vTINSJCjflPGQNUuQz0eHs1eZwYXKdqHkH9XIN79qQTtalOnywGnJVAhvYkdznJCBcm6S8fJ+tQzdVyxMNIC+wzQ+bi4VG53GBFAUmP0drumPmF6Eol942rQDvizF2XOANPOWa5Z/6t756wmFUfGwYd40w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[URk5QjVdo](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/FCxn5UVxMoLzdwicyMw9leZsRDG46AzY>



**VOTO APROBATORIO PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Mauricio Castillo Salazar

Título de la tesis: “Caracterización del efecto inmunomodulador de nitazoxanida en el proceso inflamatorio de pacientes con DM2”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Julio César Almanza Pérez

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:
La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Dr. Julio César Almanza Pérez

Firma del miembro del jurado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JULIO CESAR ALMANZA PEREZ | Fecha:2022-04-05 19:01:32 | Firmante

TBB3keT3Fqhv2dQABUNe50DoA2oR1FmWIYE5oqDWbLtO3l45ad8nDSn4Eg9W3ch0dsYuOKvYS+KgPkHgMKgA7ad1/wcQCrhAV0AILvQHH36iM0G11IBeg1DYXNWxcW8bQ
EoBB6DScYnKNqkv35CTAJ7q7Md1TdwRaOaeEZZ/OPon50zzRXjbp0yFIS6Yn3NNNzLVaH+K6TX8UsoSOJDwt4lpWk/S8hZRvRM+VHAzgz4oHRqtSt20w7Z5Tity7yg/knFHv
bwWr3AZDiK47MTHnMNDtD6XPswTbOW/wH78aJ4V7TfRHE9RYIhzUdWWWUSZ2+xGSDIEW4Tn7xiswieng==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[vjnlUKGBZ](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/yMdyxlvGi8AiZQWWOLlu7VFozUu0BN8>



**VOTO APROBATORIO PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Mauricio Castillo Salazar

Título de la tesis: “Caracterización del efecto inmunomodulador de nitazoxanida en el proceso inflamatorio de pacientes con DM2”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. María Rashidi Springall del Villar

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:
La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Dra. María Rashidi Springall del Villar

Firma del miembro del jurado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA RASHIDI SPRINGALL DEL VILLAR | Fecha:2022-04-06 09:55:25 | Firmante

TbnaxuApz92nWIDQUpxg1PLRd6PKK+YSPNNezdKokkdlS70SZMzfDit7TquJI+e4bxq+Tdwd5eh1k7ICitMvfCYddw7/XlwUXBfQdxTaqF+wlxkhA8XYUUDmquWRkhQVpT/MD9ErO/ICNo2kmR5GKLaKJGLIFocQkOnmU1aX5SFdTrsq3LIGPmoR9dgt7pJKd7m4VnQmEDgeQ32FQEpXNQOpVw14fVUrDL5glArhvAWSV5U0sTIEbLO+Ou/Myu2aDLQ84/qLit z0IPfbKVUWc5vk0mgcFigU+oB1AsBQYaCJvKARA+RksMtpKWAZSLRc1y163twyAgecq6tbXXZfg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[sYFPIbDkW](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/hB67IEGcY4cS3Q8iVRo8wxel53Wn9JKh>



**VOTO APROBATORIO PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Mauricio Castillo Salazar

Título de la tesis: “Caracterización del efecto inmunomodulador de nitazoxanida en el proceso inflamatorio de pacientes con DM2”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Germán Bernal Fernández

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:
La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Dr. Germán Bernal Fernández

Firma del miembro del jurado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

GERMAN BERNAL FERNANDEZ | Fecha:2022-04-06 09:50:58 | Firmante

sLjq5H1EM5BpqWVTsWUjIAZKstbt8/PPugtLtyj4zrSST4Ekp4vUh5oOMZxvNtCipF4CVSZRrHNmUfM9Kg4vCOtOuYZ3ZLtoTUNnnoPPW0JqRCzTPa/8Mh9sB5pBK2MWBSOf+9WLXXppsxyDLL7Fzt/NRXYpTNZOE+2Hh+HH0zkUZQ3eeicyZOSu1cCW7oUu/cdBOuXuuBLb7up0O5ACWgMvLXKARtUauf4d3PZ2Ke5il35lOdlgM82YXi2EW1jz/2K0fujCaRIS+j9ryxfB+jaJqsIjP1dXTPfgmNyo+13xSa1f4LIZTz8CFmy/n/XW1dk1px4qBZKo6FDXqQR+Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[rsdjpTgSA](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/c8mAyMyJH7GxiB5wFKIWYzzjumMx9BN>

